



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS ABIÓTICOS PARA LA PRODUCCIÓN  
DE *Bacillus subtilis* CTPX S2-1 A ESCALA PILOTO

AUTORA

Diana Carolina Paredes Torres

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS ABIÓTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE  
*Bacillus subtilis* CTPX S2-1 A ESCALA PILOTO

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

Diana Carolina Paredes Torres

Año

2017

## **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 PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Raquel Meléndez Jácome

Diplome d'études specialisees en Phytopharmacie et Phytatrie

C. I. 1709384067

## **DECLARACIÓN DE AUTORIA 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".

---

Diana Carolina Paredes Torres

C. I. 1721746541

## **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” y a la Dirección General de Investigación de la Universidad de Las Américas por el aporte logístico y económico brindado para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Viviana Yáñez, a la Ing. Gabriela Samaniego y al Ing. Paúl Sotaminga por brindarme sus conocimientos y apoyarme en el desarrollo de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la fuerza para continuar cada día. A mis abuelos Fabián, María Teresa y a mi hermana Karina, por todo su cariño y apoyo incondicional.

## RESUMEN

Investigaciones previas con la bacteria *Bacillus subtilis* demuestran que la cepa Ctpx S2-1 tiene una eficiente capacidad como agente de control biológico para reducir la infección causada por *Colletotrichum acutatum* en el cultivo y en las semillas de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en poscosecha. Actualmente, la falta de efectividad en los tratamientos químicos y la falta de oferta de productos de control biológico, hacen que los estudios para que esta bacteria se desarrolle de manera rápida y eficiente sean fundamentales. El objetivo de este trabajo fue optimizar los parámetros abióticos que influyen en la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 a escala piloto, utilizando un bioreactor de 5 litros. Para esto, se elaboró un diseño Plackett-Burman en el cual se establecieron las combinaciones de los factores abióticos a evaluar en el bioreactor relacionadas a la variación en las concentraciones de la bacteria en función del tiempo. Posteriormente estos resultados se analizaron en un modelo de matriz de superficie de respuesta para determinar las combinaciones óptimas abióticas para la producción de la bacteria y sus compuestos. Los resultados demostraron que los factores abióticos de agitación y temperatura fueron los más influyentes en la producción de biomasa y metabolitos de la bacteria y que sus valores óptimos variaron entre 160 a 200 rpm y de 35°C a 40°C, respectivamente. Adicionalmente, se demostró la efectividad *in vitro* de la biomasa y de los metabolitos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1, producidos en el medio con parámetros abióticos optimizados, para la inhibición de la germinación de *Colletotrichum acutatum*. Los resultados obtenidos demostraron que los metabolitos tuvieron el mayor potencial inhibitorio de la germinación de *C. acutatum* con un total de germinación del 38% comparado con el 80% de germinación del control. De esta manera, se concluye que la efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 como agente de biocontrol, se mantiene luego de un proceso de producción en donde se varían las condiciones abióticas.



## ABSTRACT

Previous research with the bacterium *Bacillus subtilis* demonstrate that the strain Ctpx S2-1 is efficient as biological control agent for reducing infections in culture and postharvest of lupine seeds (*Lupinus mutabilis* Sweet) caused by *Colletotrichum acutatum*. Lack of effectiveness in chemical treatments and the limited supply of biological control products, make essential to develop studies in which this bacterium grows quickly and efficiently. The objective of this work was to optimize the abiotic parameters that influenced the production of biomass and metabolites of *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 in pilot scale, using a 5 liter bioreactor. For this procedures, a Plackett-Burman design was used to evaluate the combinations of abiotic factors in the bioreactor. These combinations were related to variation in the concentrations of bacteria in UFC mL<sup>-1</sup> versus time. These results were analyzed in a response surface matrix model to determine optimal abiotic combinations for the production of the bacterium and its compounds. The results showed that the abiotic factors like agitation and temperature were the most influential in the production of biomass and metabolites of the bacteria. Optimum values varied between 160 to 200 rpm and 35°C to 40°C, respectively. The medium obtained with optimized abiotic parameters was used to demonstrate the effectiveness in vitro of *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 biomass and metabolites against *Colletotrichum acutatum* germination. Results showed that metabolites had a greater inhibitory potential with a total germination of *C. acutatum* of 38% compared to 80% germination of the control. In this way, it was concluded that the effectiveness of *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 as biocontrol agent, is maintained after a bigger scale production process where the abiotic conditions are modified.

# ÍNDICE

1. CAPITULO I. Introducción .....	1
1.1. Objetivo General.....	2
1.2. Objetivos específicos.....	3
2. CAPÍTULO II. Marco teórico .....	3
2.1. Control biológico: Antecedentes y definición.....	3
2.2. Situación actual de los programas de producción y formulación industrial de bioproductos no alimentarios.....	4
2.3. Perspectivas de industrialización de bio pesticidas (bna) a nivel mundial y en Ecuador .....	4
2.4. <i>Bacillus subtilis</i> y su potencial como agente de biocontrol.....	5
2.4.1. Producción de biomoléculas activas .....	6
2.4.2. Producción de endosporas .....	7
2.4.3. Modo de acción .....	8
2.5. Aplicación en ramas de alimentarios y no alimentarios (bioprosesos).....	9
2.6. Procesos de producción y formulación de agentes de biocontrol .....	9
2.7. Modelos matemáticos de optimización.....	13
3. CAPÍTULO III. Métodos .....	14
3.1. Mantenimiento y conservación de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 .....	14
3.2. Modelización del crecimiento.....	15
3.3. Evaluación de parámetros abióticos en diseños Plackett-Burman para optimización de crecimiento .....	16
3.3.1. Diseño de matrices Plackett-Burman.....	16
3.4. Optimización de parámetros abióticos en biorreactor .....	17

3.5.	Producción de células totales y endosporas de la bacteria obtenida en condiciones optimizadas.....	19
3.6.	Extracción y caracterización de lipopéptidos .....	19
3.7.	Ensayos de efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 contra germinación de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	20
4.	CAPÍTULO IV. Resultados y discusión .....	21
4.1.	Mantenimiento y conservación de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 .....	21
4.2.	Validación del crecimiento de <i>B. subtilis</i> en bioreactor.....	22
4.3.	Optimización de parámetros abióticos en diseños Plackett-Burman.....	23
4.4.	Producción de células totales y endosporas de la bacteria obtenida en condiciones optimizadas.....	30
4.5.	Caracterización de metabolitos antifúngicos.....	31
4.6.	Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> Ctpx S2-1 sobre la germinación de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	33
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	36
5.1.	Conclusiones.....	36
5.2.	Recomendaciones .....	37
	REFERENCIAS .....	39
	ANEXOS .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas y factores en el desarrollo de un bioproducto .....	10
Figura 2. Esquema del proceso de producción en bioreactor. Etapas de escalado de producción.....	12
Figura 3. Evolución de la biomasa (■) de <i>Bacillus subtilis</i> cepa S2-1 en Log UFC mL <sup>-1</sup> .....	23
Figura 4. Evolución de la biomasa (■) de <i>Bacillus subtilis</i> cepa S2-1 en Log UFC mL <sup>-1</sup> , pH (▲), Oxígeno disuelto DO <sub>2</sub> (◆), Temperatura (*) y Agitación (o).....	25
Figura 5. Evolución de la biomasa (■) de <i>Bacillus subtilis</i> cepa S2-1 en Log UFC mL <sup>-1</sup> , pH (▲), Oxígeno disuelto DO <sub>2</sub> (◆), Temperatura (*) y Agitación (o).....	26
Figura 6. Superficie de respuesta tridimensional estimada para la optimización de parámetros abióticos (Temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto) en la producción de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1. ....	28
Figura 7. Gráfica de los componentes principales que afectan al crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1. ....	29
Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizado que evalúa cuál parámetro abiótico (temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto) tiene más influencia en el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1. ....	29
Figura 9. Producción de células totales (□) y endosporas (■) de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 en medio de bajo costo HSC40-ME2. ....	31
Figura 10. Análisis cromatográfico en capa fina HPTLC y medida del factor de retención (R <sub>f</sub> ) de extractos lipopeptídicos de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1, obtenidos en medio de bajo costo HSC40-ME2 a las 20 horas de desarrollo de la bacteria. ....	32
Figura 11. Prueba conjunta HPTLC-bioautografía de extractos lipopeptídicos de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 contra <i>Colletotrichum acutatum</i> . ....	33

Figura 12. Efectividad de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 obtenida en medio HSC40- ME2 contra germinación de *Colletotrichum acutatum* evaluada a las 2, 4 y 6 horas. .... 35

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primer Diseño Plackett-Burman para el estudio de optimización de parámetros abióticos en la producción de biomasa y metabolitos de <i>B. subtilis</i> con nueve experimentos. ....	16
Tabla 2. Segundo Diseño Plackett-Burman para el estudio de optimización de parámetros abióticos en la producción de biomasa y metabolitos de <i>B. subtilis</i> con dos experimentos. ....	16
Tabla 3. Matriz de la primera repetición de los factores que se evaluarán en el bioreactor.....	17
Tabla 4. Matriz de la segunda repetición de los factores que se evaluarán en el bioreactor.....	18
Tabla 5. Tratamientos utilizados para evaluar efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 contra germinación de <i>Colletotrichum acutatum</i> . ....	21
Tabla 6. Resultados en Log UFC mL <sup>-1</sup> del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en bioreactores de la primera repetición durante 20 horas. ....	24
Tabla 7. Resultados en Log UFC mL <sup>-1</sup> del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en bioreactores de la segunda repetición durante 20 horas. ....	27

## 1. CAPITULO I. Introducción

*Bacillus subtilis* es un microorganismo ampliamente utilizado en la agricultura y en diversas industrias por su capacidad para producir una gran variedad de moléculas bioactivas con propiedades antifúngicas, baja toxicidad y alta biodegradabilidad que tienen múltiples aplicaciones en manejo agrícola, elaboración de productos biológicos, medicinas, cosméticos y alimentos (Yáñez, 2012). Más del 50% de productos biológicos disponibles en el mercado se formulan a base de *Bacillus subtilis* (Yáñez, 2012).

Debido a esto, se realizan investigaciones orientadas al desarrollo de programas de producción de este microorganismo de una manera rápida y eficiente. En el desarrollo de procesos eficientes para la producción de *Bacillus subtilis*, la optimización de parámetros bióticos y los abióticos deben ser obligatoriamente analizados (Yáñez, 2012). Los parámetros abióticos modifican la estructura y los mecanismos de funcionamiento de la bacteria, estos factores extrínsecos, que incluyen temperatura, pH, tensión superficial de oxígeno y agitación, influyen en el crecimiento de la bacteria y la adaptan para que pueda sobrevivir en condiciones adversas (Yáñez, 2012).

Para la producción de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos como agente de control biológico, es fundamental considerar los factores bióticos y abióticos que influyen directamente en la obtención de cantidades considerables de un microorganismo sin que este pierda su efectividad antagónica. Para optimizar estos parámetros existen diversas herramientas como los modelos multivariantes de matrices Plackett-Burman y las matrices de superficie de respuesta, las mismas que permiten definir las condiciones óptimas en la producción de un microorganismo (Yáñez, 2012). En 1999, Jacques et al., optimizaron la producción de lipopéptidos biosurfactantes de *Bacillus subtilis* S499 bajo un diseño multivariante de matrices Plackett-Burman.

Como parte de la especie *Bacillus subtilis* se encuentra la cepa CtpxS2-1; la cual fue aislada del suelo y filósfera de zonas con cultivos de chocho (*Lupinus mutabilis*) ubicadas en el cantón Salcedo, perteneciente a la provincia de Cotopaxi (Yáñez, Falconí, Grijalva, Oliva y Castañeda, 2015). Estos estudios han demostrado que esta cepa tiene un alto poder antagónico para inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos del chocho, especialmente *C.acutatum* causante de la antracnosis (Yáñez et al., 2015).

En base a esta probada capacidad de biocontrol, Samaniego (2016) optimizó los factores bióticos en la producción de *Bacillus subtilis* cepa CtpxS2-1 relacionados con el diseño de medios de cultivo de bajo costo. En base a estos resultados, en el presente estudio se realizará como siguiente paso una optimización de los factores abióticos a escala piloto, en la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1.

Este estudio pretende optimizar los parámetros abióticos de temperatura, pH, agitación y cantidad de oxígeno en la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis*, para de esta manera lograr una producción eficiente de altas concentraciones de este microorganismo, tanto en biomasa como en metabolitos. Con este estudio se brindará un impacto positivo a las diversas industrias, al hacer más rentable la producción de este microorganismo a nivel industrial y por ende lograr que sea más fácil y viable su comercialización.

### **1.1. Objetivo General**

Optimizar cuatro parámetros abióticos en la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1.



## 1.2. Objetivos específicos

- Optimizar los parámetros de temperatura, agitación, pH y cantidad de oxígeno en la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 bajo un modelo Plackett-Burman.
- Cuantificar la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis* sometido a las diferentes variantes de factores abióticos.

## 2. CAPÍTULO II. Marco teórico

### 2.1. Control biológico: Antecedentes y definición

Actualmente, la demanda por alimentos de calidad se encuentra en crecimiento, esto quiere decir que los consumidores buscan alimentos exentos de enfermedades y de residuos químicos agresivos para la salud, especialmente en las frutas frescas y en sus procesados (*National Research Council*, 1987). Según Yáñez-Mendizábal (2012), se está buscando alternativas para disminuir o reemplazar el uso de productos químicos sintéticos en el control de enfermedades poscosecha. Alternativas como el control biológico y los tratamientos térmicos están tomando fuerza en este campo (Palou, Smilanick, Fresno, Usall y Viñas, 2001; Usall, Teixidó, Torres, Ochoa de Eribe y Viñas, 2001; Lima, De Curtis, Piedimonte, Spina y De Cicco, 2006; Torres et al., 2007).

El control biológico se basa en utilizar agentes antagónicos aislados de superficies de material vegetal o de frutos, para que éstos actúen sobre el patógeno, reduciendo así la aparición de enfermedades poscosecha (Barkai-Golan, 2001). En el 2016 se realizaron estudios con algunas cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Rhodococcus* para el control biológico de enfermedades causadas por los patógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum sp* y *Macrophomina phaseolina* en granos como el fréjol (Corrêa, Moura, Denardin, Soares y Schäfer, 2008; El-Bendary, Hamed, y Moharam, 2016; Toghueoa et al., 2016).

La investigación para el uso de microorganismos como agentes de control biológico para enfermedades poscosecha ha ido aumentando en las dos últimas décadas (Droby, Wisniewski, Macarisin y Wilson, 2009). Estudios realizados por Yáñez et al., en el 2015, demostraron que gran cantidad de cepas pertenecientes al género *Bacillus* son efectivas para reducir enfermedades de poscosecha ocasionadas por patógenos en semillas, en el caso del chocho se logró una efectividad del 100% en la reducción de la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* (ensayos realizados in vitro e in vivo).

## **2.2. Situación actual de los programas de producción y formulación industrial de bioproductos no alimentarios**

En la actualidad, se encuentran de manera comercial los siguientes bioproductos no alimentarios: Bio-Save® 10 y 11 LP (Jet Harvest Solutions, Longwood, Florida USA) (Janisiewicz y Korsten, 2002) elaborados con *Pseudomonas syringae* para controlar la podredumbre que afecta a peras, cítricos, manzanas y cerezas. Estos productos fueron registrados por la Environmental Protection Agency (EPA) en USA. Otro es Boni Protect® (BioFem GmbH, Alemania), formulado a base de *Aureobasidium pullulans* para controlar podredumbre en frutas de pepita. También se pueden encontrar bio productos formulados en base a levaduras para controlar la podredumbre en frutas de hueso y pepita, uva, cítricos y fresas, como por ejemplo Shemer WGD (AgroGreen Minrav, Israel y en proceso por Bayer Cropscience) formulado en base a *Metschnikowia fructicola* (Kurtzman y Droby, 2001); por último, formulado en base a *Candida oleophila* existe Nexy (BioNext sprl, Bélgica), el cual está autorizado para el control de podredumbre en pera y manzana (Yáñez, 2012).

## **2.3. Perspectivas de industrialización de bio pesticidas (bna) a nivel mundial y en Ecuador**

A nivel mundial, se ha desarrollado una gran cantidad de investigaciones en los últimos 20 años, en cuanto a temas sobre el uso microorganismos efectivos y

sus componentes en la disminución de la podredumbre de las frutas en etapa de postcosecha; han sido pocos los microorganismos que se han aplicado a nivel comercial y contrastando con la investigación acerca de sistemas biológicos para controlar patógenos del suelo, este campo sigue siendo muy nuevo (Droby et al., 2009; Teixidó et al., 2011).

En el Ecuador existe una oferta limitada de bio productos no alimentarios (bna), principalmente los que están formulados con *Bacillus subtilis*, a pesar de la creciente tendencia del mercado hacia el consumo de alimentos saludables sin la aplicación de productos químicos como los pesticidas (Samaniego, 2016).

#### **2.4. *Bacillus subtilis* y su potencial como agente de biocontrol**

*Bacillus subtilis* es una rizobacteria que en condiciones naturales se localiza en el suelo, asociada a las raíces de las plantas. Las características biológicas principales de esta especie corresponden principalmente a la formación de bacilos Gram positivos, esporulados, aerobios estrictos (aún cuando se ha demostrado que pueden sobrevivir en ausencia de oxígeno) y productores de moléculas activas (Yáñez, 2012). Cuando se cultiva en placa, se observa que el crecimiento de sus colonias son de forma y elevación irregular (en forma de costras) y con un color blanquecino (Yáñez, 2012).

En la agroindustria la importancia de *B. subtilis* se relaciona principalmente con su capacidad para producir una gran variedad de moléculas bioactivas, con propiedades antifúngicas, baja toxicidad y alta biodegradabilidad que tienen múltiples aplicaciones en manejo agrícola, elaboración de productos biológicos, medicinas, cosméticos y alimentos (Chen et al., 2008). Además, su capacidad de formación de endosporas permite que esta bacteria sea un candidato atractivo para la elaboración de productos biológicos microbianos (Errington, 2003; Ongena, Henry y Thonart, 2009).

Algunas especies del género *Bacillus*, especialmente *B. subtilis*, representan casi la mitad de los bioplaguicidas que se puede encontrar en el mercado mundial, disponibles de manera comercial (Fravel, 2005). En Estados Unidos, se ha clasificado a *B. subtilis* como una sustancia GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) y se lo puede encontrar en varios productos como por ejemplo el Serenade®, el cual tiene como principio activo a *B. subtilis* cepa QST 713 (AgraQuest Inc., California, USA) y se lo utiliza para controlar enfermedades fúngicas en diferentes variedades de frutas, vegetales y frutos secos; Serenade® es comercializado en Europa por la BASF (Ludwigshafen, Alemania; Yáñez, 2012).

La primera especie bacteriana en ser descrita como microorganismo de control biológico para la podredumbre marrón, ocasionada por *Monilinia fructicola* en el melocotón, fue *B. subtilis* (Pusey y Wilson, 1984). En las dos últimas décadas, estos estudios sirvieron como base para los principios del uso de microorganismos como control biológico. En la actualidad, se está estudiando y probando algunas cepas de *B. subtilis* en poscosecha de fruta a nivel piloto y comercial (Obagwu y Korsten, 2003; Arrebola, Sivakumar, Bacigalupo y Korsten, 2010; Casals et al. 2010; Osman, Sivakumar y Korsten, 2011). También se está probando el potencial del producto Serenade® para controlar podredumbre en melocotón (Restuccia et al., 2006) y otros productos como Kodiak® (*B. subtilis* cepa GB03) y Epic® (*B. subtilis* cepa GB07) para controlar la podredumbre en naranjas causada por *P. digitatum* (Zhang y Dou, 2002).

#### **2.4.1. Producción de biomoléculas activas**

La mayor parte de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, especialmente *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, producen una gran variedad de compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos (Stein, 2005). Esto se debe a que parte del genoma de *B. subtilis*, entre el 4% y 5%, se dedica a la producción de moléculas bioactivas de estructura química compleja con capacidad antibiótica y antifúngica (Stein, 2005; Ongena y

Jacques, 2008). Los principales grupos de estos compuestos bioactivos corresponden a lipopéptidos antifúngicos (Ongena y Jacques, 2008), como kanosamina (Stabb, Jacobson y Handelsman, 1994) y zwittermicin-A (He, Silosuh y Handelsman, 1994; Hsieh, Lin, Meng, y Kao, 2008). De estos grupos, los más estudiados por su gran capacidad biocida y su alto potencial para el control biológico, son los lipopéptidos (Chen et al., 2008).

Desde el punto de vista bioquímico, los lipopéptidos son proteínas cíclicas que se sintetizan a partir de complejos multienzimáticos largos (Stein, 2005). Estos se agrupan en tres familias de isómeros: iturinas, surfactinas y fengicinas (Peypoux et al., 1978; Razafindralambo et al., 1993; Peypoux, Bonmatin y Wallach, 1999). Las iturinas son heptapéptidos que poseen una alta capacidad inhibitoria del crecimiento de ciertos hongos patógenos de plantas (Romero, de Vicente, Olmos, Dávila, y Pérez-García, 2007a). Las surfactinas, son heptapéptidos surfactantes con propiedades espumantes y emulsificantes con aplicaciones en biotecnología y también para bioremediación (Jacques, 2011). Las fengicinas son decapéptidos, no son tan conocidos como los otros dos grupos, sin embargo, tienen una fuerte actividad contra los hongos filamentosos (Vanittanakom, Loeffler, Koch y Jung, 1986; Romero et al., 2007b).

#### **2.4.2. Producción de endosporas**

Otra de las características del género *Bacillus* es la capacidad para producir endosporas como forma de supervivencia a condiciones ambientales extremas y en períodos de tiempo muy largos (Nicholson, Munakata, Horneck, Melosh y Setlow, 2000). *B. subtilis* es la bacteria productora de endosporas más estudiada; su esporulación es importante porque ayuda a entender algunos procesos que tiene la bacteria como por ejemplo el ciclo celular a nivel molecular (Errington, 2003; Madigan y Martinko, 2006). Desde el punto de vista biológico, las endosporas producidas por *B. subtilis* son estructuras de reposo (no reproductivas) que tienen un estado metabólico prácticamente detenido (Henriques y Morán, 2007).

La esporogénesis es un grupo de complicados cambios estructurales, genéticos y metabólicos que ocurren cuando las células vegetativas pasan por condiciones extremas para su supervivencia (Sharp y Pogliano, 2002). Este proceso encamina al interior de estas células a la diferenciación (se genera la endospora). La célula vegetativa que la generó se autolisa y una vez que se ha liberado la endospora, esta puede permanecer en estado durmiente durante décadas o incluso siglos hasta que se vuelva a activar (Sharp y Pogliano, 2002). La endospora empieza su germinación y vuelve a iniciar su proceso metabólico cuando se dispersa en el aire y cae en un medio líquido, como por ejemplo el agua; así cada endospora origina una nueva célula vegetativa con capacidad de hacer división binaria (Sharp y Pogliano, 2002).

Cuando se tiene cultivos líquidos o sólidos, en condiciones artificiales de crecimiento, si los nutrientes están por debajo de un límite se produce una señal bioquímica que hace que las células vegetativas protejan su supervivencia al iniciar una serie de procesos genéticos y fisiológicos para formar endosporas (Errington, 2003). Para la biotecnología, este proceso es muy importante debido a que permite la conservación de la bacteria durante tiempos prolongados (Zhang y Dou, 2002).

#### **2.4.3. Modo de acción**

El modo de acción más estudiado de *B. subtilis* contra los patógenos es a través de los lipopéptidos antifúngicos (Ongena et al., 2005a, 2005b). Sin embargo, algunas investigaciones indican que *B. subtilis* y los lipopéptidos que éste produce no sólo actúan inhibiendo el crecimiento de hongos patógenos (antagonistas), sino que también pueden actuar bloqueando su crecimiento por medio de la competencia por espacio o reforzando la resistencia del huésped (Ongena et al., 2005a).

## **2.5. Aplicación en ramas de alimentarios y no alimentarios (bioprocesos)**

En cuanto a las aplicaciones de *B. subtilis* en el campo agroindustrial son muy diversas, principalmente para la elaboración y diversificación continua de productos alimentarios y no alimentarios como se indica a continuación: En el área de alimentos se usa para la elaboración de suplementos alimenticios como enzimas, prebióticos y probióticos; también se usa para la producción de medicinas en el área de la salud (Cutting, 2011). Actualmente, *B. subtilis* ha sido ampliamente utilizado en otras industrias como en la farmacológica para la elaboración de jabones surfactantes y cosméticos. Según Ongena y Jacques (2008), una de las aplicaciones más importantes es el desarrollo de bioproductos utilizados en el campo agrícola para bioremediación, control biológico, al igual que biofilms.

## **2.6. Procesos de producción y formulación de agentes de biocontrol**

El uso de agentes microbianos para controlar enfermedades causadas por diversos patógenos como los hongos ha ido aumentando con el tiempo debido a la efectividad antagónica que estos microorganismos poseen, como lo corroboraron Droby y colaboradores en el 2009. Debido a esto, los procesos de producción y formulación de agentes de biocontrol se han vuelto una parte fundamental para su uso comercial. El proceso de producción de un microorganismo consiste en incrementar la producción de biomasa y/o metabolitos controlando los factores bióticos y abióticos. En el caso de *B. subtilis* se busca la producción de biomasa y metabolitos (Yáñez, 2012). Madigan y Martinko (2006), sustentan que el crecimiento de un microorganismo, en un medio de cultivo, está relacionado con incremento de la cantidad de sus células como resultado de su división celular.

Cuando se realiza la producción de microorganismos generalmente se utilizan condiciones artificiales, por lo que su crecimiento va a depender de su habilidad para aprovechar los diversos nutrientes que tiene el medio de cultivo y

transformarlos en compuestos moleculares que puedan ser utilizados para la supervivencia y reproducción de la bacteria, como lo mencionan Waites, Morgan, Rockey y Higton, 2001.

En la Figura 1 se indican las diferentes etapas y factores en el desarrollo de un bioproducto. Se inicia con un proceso de aislamiento y selección dentro del cual se encuentran cuatro subprocesos que abarcan: Identificación y caracterización del modo de acción del agente microbiano, pruebas piloto, pruebas comerciales y bioensayos *in vitro* e *in vivo*. Después de aislar la cepa seleccionada, se empieza con los procesos de escalado de producción y formulación, ensayos toxicológicos, patente y registro para uso del bioproducto.

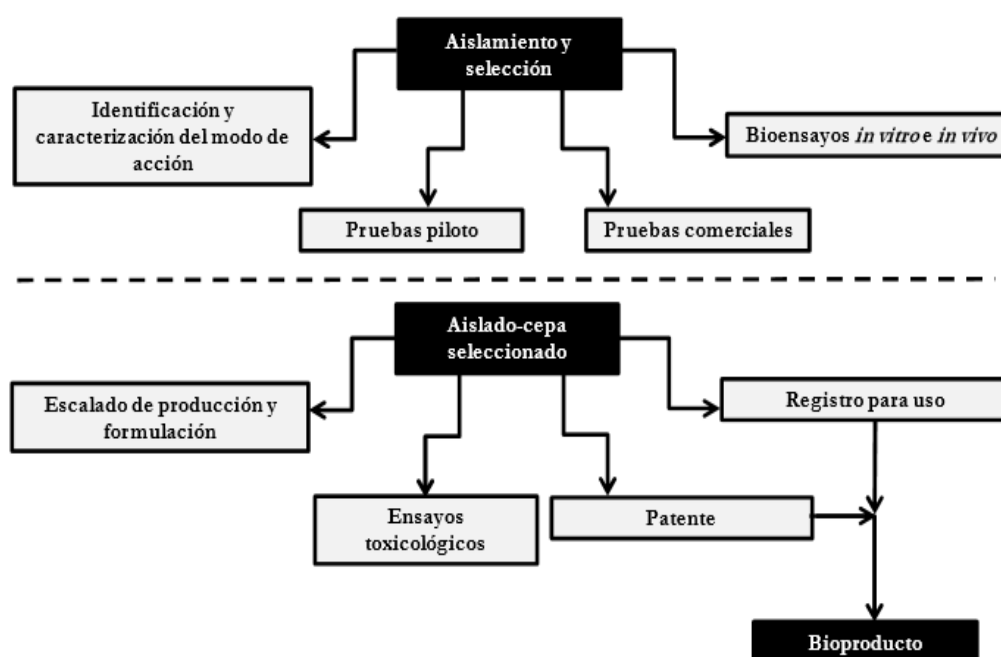


Figura 1. Etapas y factores en el desarrollo de un bioproducto.  
Adaptado de (Droby et al., 2009)

Las etapas o pasos en el desarrollo del proceso de producción son: Crecimiento del inóculo, crecimiento en bioreactor a escala piloto, crecimiento a nivel industrial y por último obtención del producto final y evaluación de su efectividad (Yáñez, 2012), mismas que se detallan a continuación:



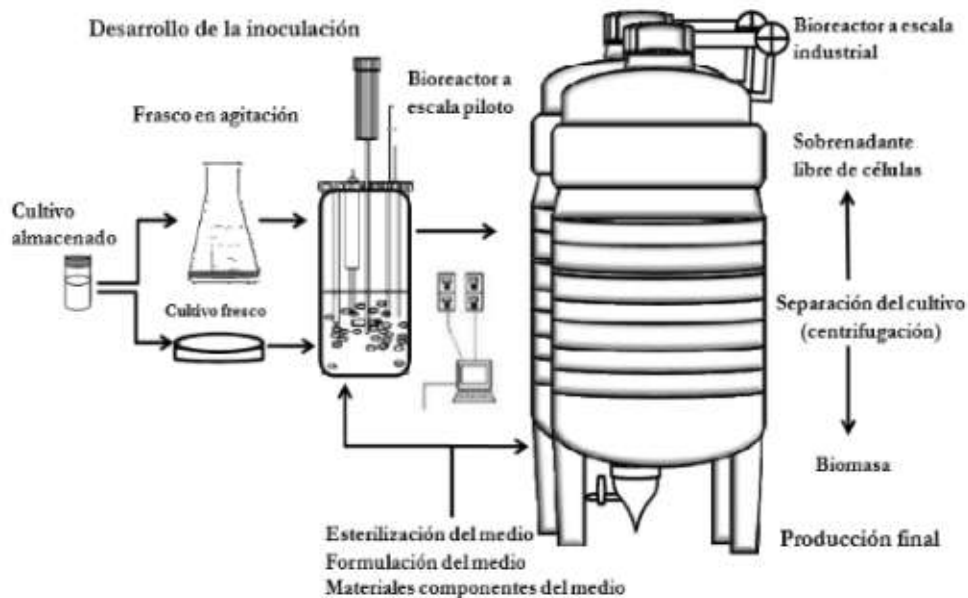
**Crecimiento del inóculo:** Se inicia con un cultivo bacteriano puro, el cual puede estar en refrigeración (4°C) o en criocongelación (-80°C). Este cultivo se siembra en medio sólido o líquido para poder obtener el inóculo fresco o cultivo iniciador (Yáñez, 2012).

**Crecimiento en bioreactor a escala piloto:** Esta etapa empieza con el crecimiento de un cultivo puro, previamente aislado, en un medio determinado con el fin de obtener un starter o inóculo. Es una etapa experimental en la cual se realizan los procesos de optimización de las condiciones de crecimiento del microorganismo como medios de cultivo, factores bióticos y abióticos (Yáñez, 2012). El bioreactor permite obtener altos niveles de biomasa viable (con las características adecuadas para ser usada como inóculo) con velocidades de crecimiento aceleradas. Algunos de los factores abióticos que se pueden evaluar en un bioreactor son: Cantidad de oxígeno disuelto, pH, temperatura y agitación. Se utilizan las condiciones y los medios iguales o parecidos a los que serán utilizados a nivel industrial (Ward, 1991; Waites et al., 2001).

**Crecimiento a nivel industrial:** Etapa en la cual se utilizan medios y condiciones de crecimiento que ya han sido optimizadas, para así obtener altas producciones de biomasa y metabolitos (Ward, 1991; Waites et al., 2001).

**Obtención del producto final y su efectividad:** Después de que se han producido los compuestos necesarios, estos se pueden recuperar o separar mediante procesos de filtración o de centrifugación (Hernández, 2003). Es importante para los agentes de biocontrol que se compruebe que la bacteria y sus compuestos siguen teniendo la misma efectividad contra el patógeno (Yáñez, 2012).

A continuación se muestra en la Figura 2 un esquema de las etapas del desarrollo del proceso de producción.



*Figura 2.* Esquema del proceso de producción en bioreactor. Etapas de escalado de producción.  
Tomado de (Yáñez, 2012)

Existen diferentes factores tanto bióticos como abióticos, que afectan al crecimiento de una bacteria o microorganismo en general (Ward, 1991). Estos factores o parámetros deben ser evaluados y optimizados en la etapa piloto del proceso de producción.

Entre los factores bióticos, se puede considerar a los elementos base que forman parte del medio de cultivo en el que se desarrolla el microorganismo. Estos factores son fuentes de carbono y nitrógeno, agua, oligoelementos, entre los más importantes debido a su alta influencia en el crecimiento del agente microbiano (Forbes, 2007; García, 2004).

Los factores abióticos que se van a evaluar en este trabajo son: Temperatura, pH, cantidad de oxígeno y agitación. En cuanto a la temperatura, las bacterias se desarrollan entre el punto de ebullición y congelación del agua (Ward, 1991). En 1999, se realizaron estudios por Jacques *et al.*, en los cuales se demostró que, en medio líquido, *B. subtilis* usa una temperatura ideal entre 25 y 37°C.

Por el uso de oxígeno, este microorganismo ha sido catalogado como aerobio estricto; sin embargo, estudios recientes demostraron que puede desarrollarse de manera anaerobia utilizando electrones aceptores como los nitratos o nitritos (Nakano y Zuber, 2002). En cuanto al pH, cada microorganismo posee un pH óptimo bien definido. Según Jacques et al. (1999), el pH 7 es el ideal para *B. subtilis*. De igual manera, la agitación es un factor importante que influye en el crecimiento del microorganismo.

## **2.7. Modelos matemáticos de optimización**

Existen varios modelos matemáticos de optimización; entre estos se encuentra el diseño Plackett-Burman de superficies de respuesta, el cual es una herramienta de la rama de la estadística que se utiliza para la optimización de ciertos componentes que tiene un medio de cultivo (Becerra, 2007). Algunas de las aplicaciones para la superficie de respuesta son: determinación de condiciones óptimas, generación de ecuaciones polinómicas y controlar el rango de las variables. Kim y Bhowmik (2007) manifiesta que de igual manera se la utiliza para tener una estimación de las variables que se están controlando y los resultados que se han obtenido.

En el diseño de Plackett-Burman, cada factor se coloca a 2 niveles y el número de experimentos  $N$  es múltiplo de 4. En este diseño se utilizan variables de dos tipos: cualitativa y cuantitativa (Rojas, Tripaldi, y Dután, 2010). Los niveles se expresan como  $-1$  y  $+1$ , pero también se los puede escribir de esta manera:  $(-)$  y  $(+)$ . Cuando se construye una matriz para el diseño Plackett-Burman, es importante considerar que generalmente ya se encuentra establecida la primera línea de signos y las restantes se obtienen mediante permutaciones, a excepción de la última, en la que se coloca todos con este signo  $(-)$  (Rojas et al., 2010).

El diseño Plackett-Burman se utiliza para establecer todas las combinaciones posibles de los factores que se van a evaluar en la etapa experimental. Los resultados obtenidos en esta etapa son analizados con la herramienta

estadística de matrices de superficies de respuesta para compararlos entre sí y determinar mediante una curvatura en esta matriz cuáles fueron las combinaciones óptimas de los factores detallados en el diseño Plackett-Burman (Yáñez, 2012).

La matriz de superficies de respuesta es una “agrupación de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que permiten visualizar mejor y optimizar la respuesta” (Minitab Inc, 2016). Si se quiere mejorar los modelos después de haber determinado los factores relevantes mediante el uso de diseños factoriales, se utiliza esta metodología de superficies de respuesta, especialmente si se supone que existe curvatura en la superficie de respuesta (Minitab Inc, 2016).

Modelar la curvatura en la respuesta, sirve para: Establecer o visualizar una fracción de una superficie de respuesta. “Las ecuaciones de este tipo de diseño modelan la manera en que los cambios en las variables afectan una respuesta de interés” (Minitab Inc, 2016). “Identificar los niveles de las variables que optimizan una respuesta y elegir las condiciones operativas para cumplir las especificaciones” (Minitab Inc, 2016).

### 3. CAPÍTULO III. Métodos

#### 3.1. Mantenimiento y conservación de *B. subtilis* CtpxS2-1

*Bacillus subtilis* CtpxS2-1 fue mantenido rutinariamente en un medio NYDA (extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, caldo nutritivo 8 g L<sup>-1</sup>, agar 20 g L<sup>-1</sup> y dextrosa 10 g L<sup>-1</sup>). Cultivos frescos de la bacteria fueron activados para cada experimento mediante siembra en triple estría e incubación durante 24 horas a 30°C. Para la conservación a largo plazo se mantuvo la bacteria en criocultivos (Copan Diagnostics INC, CryoBank™), en el banco de cepas de agentes de control biológico a -80°C en criobolas acorde a los métodos descritos en el Anexo 1.

### 3.2. Modelización del crecimiento

La modelización del crecimiento se realizó de acuerdo a los protocolos diseñados por Yáñez-Mendizábal et al., (2011) para *Bacillus subtilis* en medio de cultivo líquido. El crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en 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> se evaluó durante 0 a 20 horas con muestreos cada 2 horas a 30°C y 200 rpm. La modelización se realizó con un diseño completamente al azar con un tratamiento y dos repeticiones. Para cada tiempo de evaluación se determinó la producción de biomasa en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>) mediante dilución y plating en medio NYDA (Samaniego, 2016).

Los datos obtenidos en UFC mL<sup>-1</sup> se transformaron a logaritmo en base diez (Log UFC mL<sup>-1</sup>). Para modelizar la curva de crecimiento se utilizó el modelo matemático de crecimiento sigmoideo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), en base al cual se especificó la variación de concentraciones Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> en función del tiempo. Para el análisis de los datos se usó el software ComBase® y las ecuaciones:

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

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

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

Donde **y(t)** es el logaritmo natural de la concentración de células en el tiempo **t(h)**; **y<sub>0</sub>** es el logaritmo natural de la concentración de células en tiempo 0; **μ<sub>max</sub>** es la tasa máxima de crecimiento específico (h<sup>-1</sup>); **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<sub>max</sub>** es el logaritmo natural de la máxima

concentración de células,  $q_0$  es el estado fisiológico de la célula al tiempo 0 y es la duración de la fase de latencia.

### 3.3. Evaluación de parámetros abióticos en diseños Plackett-Burman para optimización de crecimiento

#### 3.3.1. Diseño de matrices Plackett-Burman

Para los Diseños Plackett-Burman se evaluaron los factores temperatura y agitación. Cada factor tuvo tres niveles de variación: bajo, medio y alto. En las Tablas 1 y 2 se detallan los factores evaluados en las matrices Plackett-Burman con sus respectivos niveles, para la primera y segunda repetición respectivamente.

Tabla 1.

*Primer Diseño Plackett-Burman para el estudio de optimización de parámetros abióticos en la producción de biomasa y metabolitos de B. subtilis con nueve experimentos.*

Factores	Símbolo	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Ensayos experimentales								
		(-)	0	(+)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temperatura	T	30°C	35°C	40°C	-	-	-	+	0	0	0	+	+
Agitación		100 rpm	150 rpm	200 rpm	-	0	+	-	-	0	+	0	+

Tabla 2.

*Segundo Diseño Plackett-Burman para el estudio de optimización de parámetros abióticos en la producción de biomasa y metabolitos de B. subtilis con dos experimentos.*

Variables	Símbolo	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Ensayos experimentales	
		(-)	0	(+)	1	2
Temperatura	T	30°C	35°C	40°C	0	+
Agitación		100 rpm	150 rpm	200 rpm	+	-

### 3.4. Optimización de parámetros abióticos en biorreactor

Para la optimización de parámetros abióticos, en base a la distribución de las matrices Plackett-Burman se montaron experimentos consecutivos en bioreactor de 5 L con el control de los parámetros con el software eZ Control-aplikon® biotechnology; Holanda). Para cada evaluación se montaron diferentes bioprocesos con 5 litros de medio de cultivo de bajo costo, de igual forma para cada evaluación. Las sondas de pH y oxígeno disuelto se calibraron según las especificaciones del bioreactor como indica el manual de operación del equipo. Se colocó el cabezal, el cinturón, todos los tapones, pinzas y filtros como corresponde a cada manguera, luego se esterilizó el fermentador a 121°C durante 20 min. Una vez que la esterilización finalizó, se conectó el fermentador con sus respectivas sondas y se fijó las condiciones de temperatura (30°C, 35°C y 40°C) y agitación (100 rpm, 150 rpm y 200 rpm) correspondientes; por último, se calibró la sonda de oxígeno disuelto (DO<sub>2</sub>) y se inició el proceso (Samaniego, 2016).

En las Tablas 3 y 4 se indican las matrices con los bioreactores que se realizaron de la primera y segunda repetición respectivamente.

Tabla 3.

*Matriz de la primera repetición de los factores que se evaluarán en el bioreactor.*

<b>Combinación bioreactores (Repetición 1)</b>		
<b>Número</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Agitación</b>
<b>1</b>	30°C	100 rpm
<b>2</b>	30°C	150 rpm
<b>3</b>	30°C	200 rpm
<b>4</b>	35°C	100 rpm
<b>5</b>	35°C	150 rpm
<b>6</b>	35°C	200 rpm
<b>7</b>	40°C	100 rpm

<b>8</b>	40°C	150 rpm
<b>9</b>	40°C	200 rpm

Tabla 4.

*Matriz de la segunda repetición de los factores que se evaluarán en el bioreactor.*

<b>Combinación bioreactores (Repetición 2)</b>		
<b>Número</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Agitación</b>
<b>1</b>	35°C	200 rpm
<b>2</b>	40°C	100 rpm

Para ambos experimentos se prepararon inóculos de *B. subtilis* CtpxS2-1 siguiendo la metodología descrita por Samaniego (2016). A partir de cultivos puros de la bacteria en NYDA y almacenados a 4°C se prepararon triples estrías de 24 h de crecimiento y a partir de éste, una suspensión bacteriana concentrada (inóculo) en 10 mL de tampón fosfato o PBS (70 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M, 30 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M y 300 mL de agua destilada, v/v/v, pH 6.5). La cantidad deseada de inóculo en mililitros se calibró, para obtener una concentración inicial en el bioreactor de  $2 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> en el bioreactor con volumen de trabajo de 5 L (Samaniego, 2016). La concentración final se calculó con dilución y plateo en NYDA.

El crecimiento de *B. subtilis* CtpxS2-1, expresado en los cambios en las concentraciones de UFC mL<sup>-1</sup> se cuantificaron durante 20 horas. La toma de muestras se realizó a las 0 horas, 16 horas, 18 horas y 20 horas. Por cada hora antes mencionada, se tomaron muestras por duplicado o triplicado y las concentraciones de la bacteria se cuantificaron por dilución y plateo en placas con NYDA como se describió anteriormente. De cada muestra tomada del bioreactor se hicieron bancos de dilución dobles. Los datos recolectados para cada tiempo de crecimiento en UFC mL<sup>-1</sup> se transformaron a Log 10 UFC mL<sup>-1</sup>, para modelizar la curva se utilizó el modelo matemático de Baranyi y Roberts y



se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento en relación al tiempo como se describió anteriormente.

### **3.5. Producción de células totales y endosporas de la bacteria obtenida en condiciones optimizadas**

Para la cuantificación de producción de endosporas y células vegetativas se utilizó los protocolos descritos por Jacques et al., (1999) y Yáñez-Mendizábal et al., (2011) para la cuantificación de bacterias productoras de endosporas en medios líquidos en UFC mL<sup>-1</sup>.

Se partió de cultivos bacterianos de 24, 48 y 72 horas en medio de bajo costo, obtenidos a 30°C y 150 rpm (High Performance Shaking Incubator Labnet International 311DS ®). En cada período se tomaron muestras de cada tiempo. Las concentraciones de células totales se cuantificaron mediante dilución y plateo en medio NYDA. Para endosporas, se siguió el mismo procedimiento con un tratamiento previo de choque térmico de las muestras en baño maría a 80°C, 15 – 20 minutos para eliminar las células vegetativas. Los resultados obtenidos en UFC mL<sup>-1</sup> se transformaron a Log UFC mL<sup>-1</sup> como se describió anteriormente.

Los datos se van a analizar 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% (Samaniego, 2016).

### **3.6. Extracción y caracterización de lipopéptidos**

Se utilizaron cultivos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 obtenidos en 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) se separó 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 debe ser separado de la fracción acuosa y se debe cuantificar su volumen, se deja evaporar en agitación (Cabina extractora de gases BIOBASE® FH 1800) y posteriormente debe ser resuspendido en metanol absoluto calidad HPLC en proporción 1:10 metanol - sobrenadante. El extracto de lipopéptidos concentrado debe ser almacenado en tubos Falcon a 4°C.

### **3.7. Ensayos de efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 contra germinación de *Colletotrichum acutatum*.**

La bacteria crecida en el medio optimizado de bajo costo y bajo los parámetros abióticos optimizados se utilizó para verificar que mantiene su efectividad contra la germinación de *Colletotrichum acutatum*. Se preparó una suspensión acuosa de *C. acutatum* a partir de cultivos esporulados de 10 días en PDA comercial. Las esporas se colectaron y se suspendieron en 70 mL de agua destilada estéril y su concentración se ajustó a  $5 \times 10^5$  esporas/mL usando un hematocitómetro. Para los tratamientos se utilizó la biomasa y el sobrenadante de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 obtenidos del bioreactor. Se calculó la concentración de las células totales (UFC/mL) dilución y plateo en NYDA. En los tratamientos se mezcló 4.5 mL de la suspensión de *C. acutatum* con 0.5 mL de la suspensión de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL (Yáñez, 2012).

Posteriormente, se colocó gotas de 10 µl de la mezcla en platos de PDA por triplicado y para cada tiempo ensayado, se incubó a 25°C por 2, 4 y 6 h. Al final de cada tiempo de incubación, se removió tres discos de agar (con las gotas) de cada repetición, usando un taladro de corcho y se los colocó en una placa Petri (Yáñez, 2012).

Se detuvo la germinación de las esporas añadiendo 1 mL de amoníaco (NH<sub>3</sub>) al 25% en un papel filtro ubicado en las tapas de las placas Petri. Luego, se cerró

las placas Petri y se almacenó a  $4\pm 1^\circ\text{C}$  durante la noche hasta la evaluación en el microscopio. Se examinó 50 conidias individuales por disco (150 por repetición; 450 por tratamiento) (Yáñez, 2012).

Se consideró como esporas germinadas a las que tuvieron el tubo germinal igual o más largo que el diámetro más pequeño de la espora. Se calculó el porcentaje de germinación de las esporas con diferentes tratamientos y tiempos de incubación (Yáñez, 2012).

Tabla 5.

*Tratamientos utilizados para evaluar efectividad de Bacillus subtilis CtpxS2-1 contra germinación de Colletotrichum acutatum.*

Tratamiento	Descripción
CK	Inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ esporas $\text{mL}^{-1}$ .
T1	Inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ esporas $\text{mL}^{-1}$ + biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 de 20 horas, $2 \times 10^7$ UFC $\text{mL}^{-1}$ .
T2	Inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ esporas $\text{mL}^{-1}$ + sobrenadante filtrado de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 de 20 horas, $2 \times 10^7$ UFC $\text{mL}^{-1}$ .

#### 4. CAPÍTULO IV. Resultados y discusión

##### 4.1. Mantenimiento y conservación de *B. subtilis* CtpxS2-1

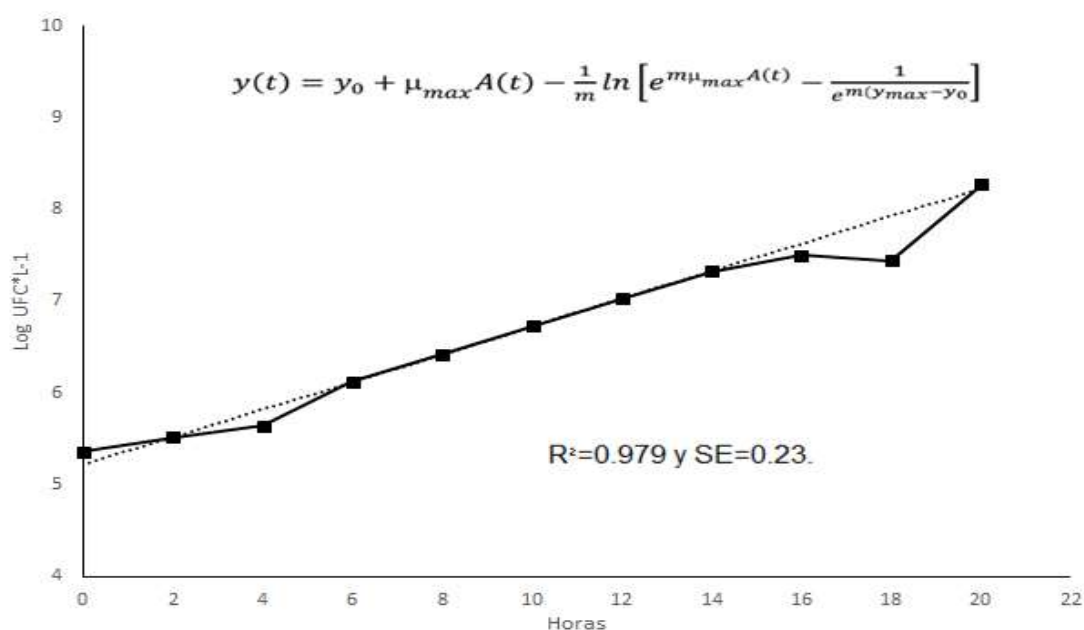
Para la recuperación de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 de las criobolas, primero se retiró el tubo CRYOBANK™ del congelador ( $-80^\circ\text{C}$ ). En la cabina de bioseguridad se abrió el vial y se retiró una criobola utilizando una aguja o pinza estéril a través del orificio. Se depositó la criobola en medio NYDA (Extracto de levadura  $5 \text{ g L}^{-1}$ , caldo nutritivo  $8 \text{ g L}^{-1}$ , agar  $20 \text{ g L}^{-1}$  y dextrosa  $10 \text{ g L}^{-1}$ ). Se cerró

el tubo con el resto de las criobolas y se puso en el congelador lo más rápido posible para evitar que estas se descongelen.

La criobola en el medio NYDA se dispersó en toda la caja Petri con un asa microbiológica y se dejó crecer a la bacteria durante 24 horas a 30°C en la incubadora. Después de este tiempo, se cerró la caja Petri con papel Parafilm y se guardó en el refrigerador (4°C) con su debida etiqueta. Para la obtención de biomasa fresca, se hizo triples estrías de la caja Petri con la criobola, de igual manera en medio NYDA, y se siguió el mismo procedimiento de conservación. Para que la siembra de esta bacteria no se contamine, se realizó el procedimiento en la cabina de bioseguridad con todo material limpio y autoclavado. Como resultado, se observó que no hubo contaminación en la caja Petri y que el crecimiento de esta bacteria fue con colonias de color blanquecino a manera de costras, es decir que tienen una forma y elevación irregular.

#### **4.2. Validación del crecimiento de *B. subtilis* en bioreactor**

Se validó el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en bioreactor con el medio de bajo costo y las condiciones utilizadas por Samaniego (2016) como base para optimizar los parámetros abióticos. Como se indica en la Figura 3, se puede observar el crecimiento de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 (Log UFC mL<sup>-1</sup>) en medio HSC40-ME2 en bioreactor de 5 litros (escala piloto). La concentración de células de la cepa aumentó de 5.36 a 8.27 Log UFC mL<sup>-1</sup> durante las 20 horas de crecimiento. Basándose en el modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994), se realizó un análisis y ajuste de los valores obtenidos, con estos datos se obtuvo un crecimiento sigmoideo, lo cual es característico de la bacteria; se calculó los parámetros de crecimiento con una tasa máxima de crecimiento ( $\mu$  max) 0.15 (Log UFC mL<sup>-1</sup>) h<sup>-1</sup>, máxima concentración de células (MPD) 8.27 Log UFC mL<sup>-1</sup>, coeficiente de relación (R<sup>2</sup>) 0.979 y desviación estándar (SE) 0.23.



**Figura 3.** Evolución de la biomasa (■) de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>.

Los datos corresponden a las concentraciones de células vegetativas y endosporas crecidas en medio de bajo costo 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> y sales de MOLP) con las condiciones de 30°C y 200 rpm durante 20 horas. La curva de crecimiento (...) se determinó utilizando el modelo creado en 1994 por Baranyi y Roberts. Se muestra el coeficiente de relación ( $R^2$ ) 0.979 y la desviación estándar (SE) 0.23.

#### 4.3. Optimización de parámetros abióticos en diseños Plackett-Burman

Los resultados de la optimización realizada con los 9 bioreactores indican que los de parámetros abióticos sí influyen en el crecimiento o incremento de biomasa de *Bacillus subtilis*. Las combinaciones que dieron una mayor concentración de biomasa total fueron: Bioreactor 6 (35°C, 200 rpm) y bioreactor 7 (40°C y 100 rpm), con una concentración inicial de células de 4.61 y 4.56 Log UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente, y que después de 20 horas del bioproceso se llegó a una concentración final de células de 8.01 y 7.73 Log UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente.

En lo que se refiere a oxígeno disuelto, se pudo observar que este disminuyó progresivamente hasta que existió una completa ausencia del mismo entre las horas 4 y 6 del bioproceso. Comparando esta ausencia de oxígeno con el

desarrollo del crecimiento de *Bacillus subtilis*, se puede evidenciar que la bacteria a pesar de ser considerada como aerobia, es capaz de crecer en condiciones de ausencia de oxígeno (anaeróbicas) como lo corroboran investigaciones realizadas en 1998 por Nakano y Zuber.

En cuanto al pH, se pudo observar en todos los bioprocesos que este varió entre 5 y 6, con excepción de los bioreactores 5 y 6, los cuales indican que el pH varió entre 4 y 5. Según Jacques et al. (1999), el pH ideal para el crecimiento de *Bacillus subtilis* es de 7. Sin embargo, el crecimiento de la bacteria no se vio afectado al realizar el bioproceso con valores de pH más bajos (de 4 a 6).

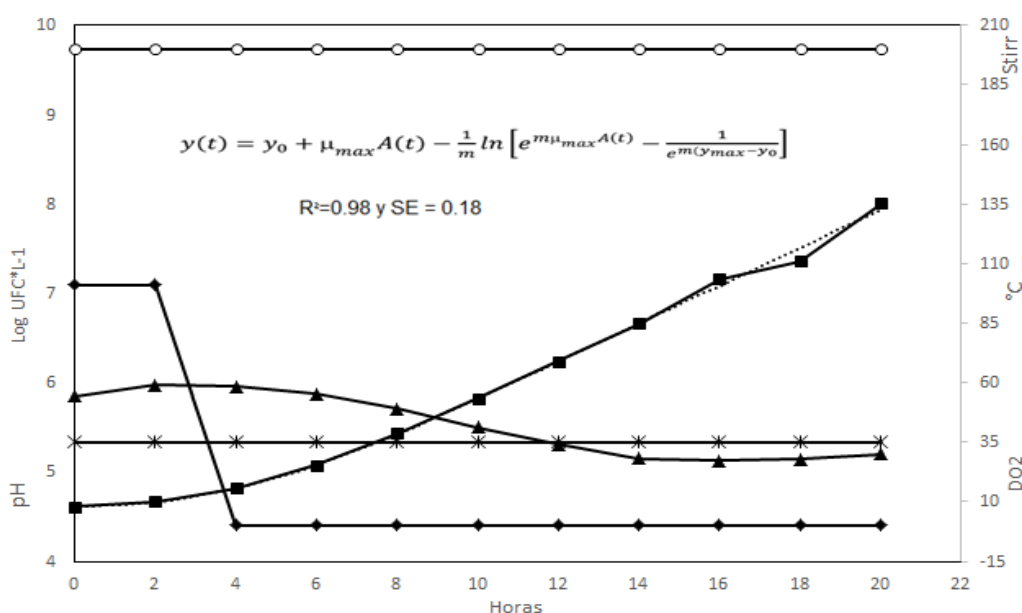
Tabla 6.

*Resultados en Log UFC mL<sup>-1</sup> del crecimiento de Bacillus subtilis en bioreactores de la primera repetición durante 20 horas.*

<b>Combinación bioreactores (Repetición 1)</b>			
<b>Número</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Agitación</b>	<b>Log UFC mL<sup>-1</sup></b>
1	30°C	100 rpm	7,46
2	30°C	150 rpm	7,05
3	30°C	200 rpm	7,50
4	35°C	100 rpm	7,26
5	35°C	150 rpm	7,33
6	35°C	200 rpm	8,01
7	40°C	100 rpm	7,73
8	40°C	150 rpm	7,31
9	40°C	200 rpm	7,67

La Figura 4 representa el crecimiento de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 (Log UFC mL<sup>-1</sup>) en medio HSC40-ME2 en bioreactor de 5 litros (Escala piloto) comparado

con las variables de pH, DO<sub>2</sub>, Temperatura y Agitación. La concentración de células de la cepa aumentó de 4.61 a 8.01 Log UFC mL<sup>-1</sup> durante las 20 horas de crecimiento. Basándose en el modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994), se realizó un análisis y ajuste de los valores obtenidos, con estos datos se obtuvo un crecimiento sigmoideo; se calculó los parámetros de crecimiento con tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) 0.21 (Log UFC mL<sup>-1</sup>) h<sup>-1</sup>, máxima concentración de células (MPD) 8.01 Log UFC mL<sup>-1</sup>, coeficiente de relación (R<sup>2</sup>) 0.98 y desviación estándar (SE) 0.18.



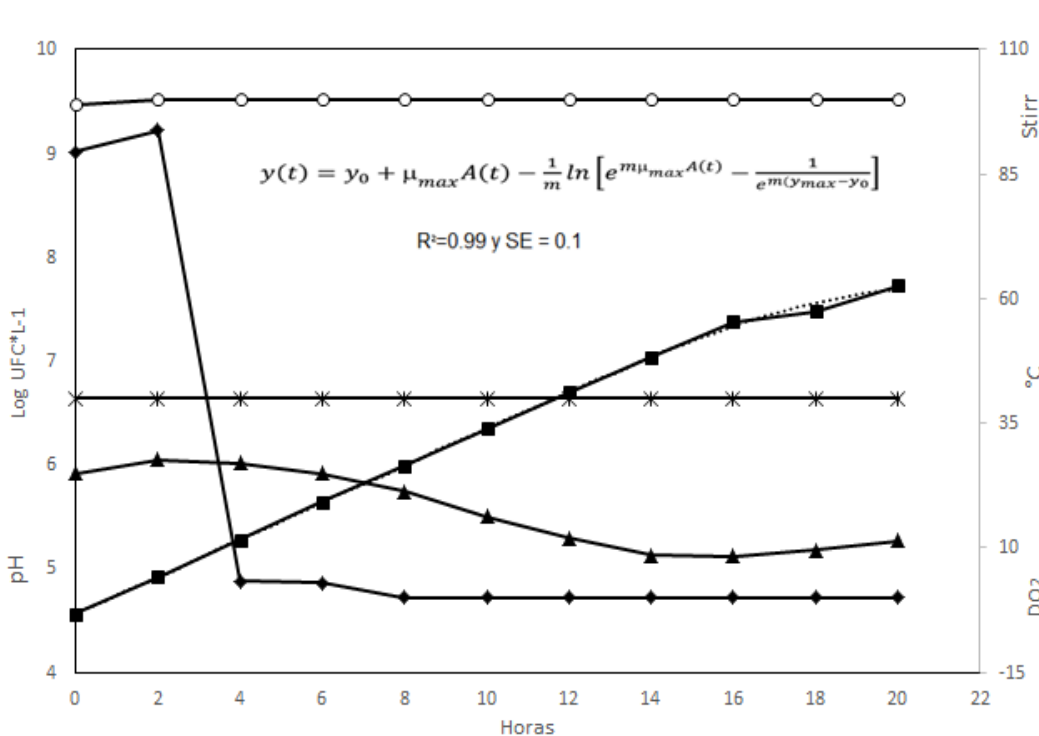
**Figura 4.** Evolución de la biomasa (■) de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>, pH (▲), Oxígeno disuelto DO<sub>2</sub> (◆), Temperatura (\*) y Agitación (o).

Los datos corresponden a las concentraciones de células vegetativas y endosporas crecidas en medio de bajo costo 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> y sales de MOLP), se realizó en bioreactor de 5 L a 35°C y 200 rpm durante 20 horas.

La curva de crecimiento (...) se determinó y dibujó utilizando el modelo de Baranyi y Roberts (1994). Se muestra el coeficiente de correlación R<sup>2</sup> = 0.98 y SE = 0.18. Los parámetros estimados fueron  $\mu_{max}$  = 0.21 (Log UFC mL<sup>-1</sup>) h<sup>-1</sup> y MPD = 8.01 Log UFC mL<sup>-1</sup>.

La Figura 5 representa el crecimiento de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 (Log UFC mL<sup>-1</sup>) en medio HSC40-ME2 en bioreactor de 5 litros (Escala piloto). La concentración de células de la cepa aumentó de 4.56 a 7.73 Log UFC mL<sup>-1</sup> durante las 20 horas de crecimiento. Basándose en el modelo matemático de

Baranyi y Roberts (1994), se realizó un análisis y ajuste de los valores obtenidos, con estos datos se obtuvo un crecimiento sigmoideo; se calculó los parámetros de crecimiento con una tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ )  $0.17$  (Log UFC mL<sup>-1</sup>) h<sup>-1</sup>, máxima concentración de células (MPD)  $7.73$  Log UFC mL<sup>-1</sup>, coeficiente de relación ( $R^2$ )  $0.99$  y desviación estándar (SE)  $0.1$ .



**Figura 5.** Evolución de la biomasa (■) de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>, pH (▲), Oxígeno disuelto DO<sub>2</sub> (◆), Temperatura (\*) y Agitación (o).

Los datos corresponden a las concentraciones de células vegetativas y endosporas crecidas en medio de bajo costo 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> y sales de MOLP), se realizó en bioreactor de  $5$  L a  $40^{\circ}\text{C}$  y  $100$  rpm durante  $20$  horas. La curva de crecimiento (...) se determinó y dibujó utilizando el modelo de Baranyi y Roberts (1994). Se muestra el coeficiente de correlación  $R^2 = 0.99$  y  $SE = 0.1$ . Los parámetros estimados fueron  $\mu_{max} = 0.17$  (Log UFC mL<sup>-1</sup>) h<sup>-1</sup> y MPD =  $7.73$  Log UFC mL<sup>-1</sup>.

Los resultados de los bioreactores que se obtuvieron en la segunda repetición demostraron que, efectivamente la combinación de factores abióticos que generaron una mayor cantidad de células totales fue de  $35^{\circ}\text{C}$  y  $200$  rpm con una concentración final de células totales de  $7.97$  Log UFC mL<sup>-1</sup> y en segundo lugar la combinación de  $40^{\circ}\text{C}$  y  $100$  rpm, la cual tuvo un resultado de  $7.78$  Log UFC



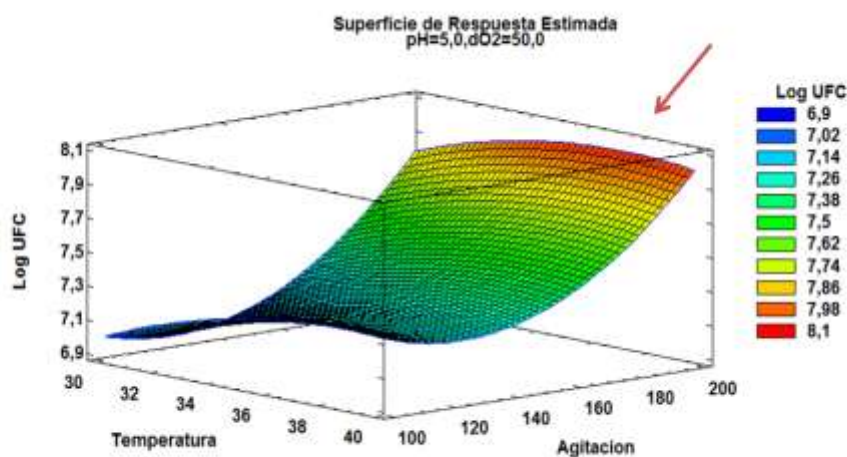
mL<sup>-1</sup>. Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos en la primera repetición con las mismas condiciones de temperatura y agitación.

Tabla 7.

*Resultados en Log UFC mL<sup>-1</sup> del crecimiento de Bacillus subtilis en bioreactores de la segunda repetición durante 20 horas.*

<b>Combinación bioreactores (Repetición 2)</b>			
<b>Número</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Agitación</b>	<b>Log UFC mL<sup>-1</sup></b>
<b>10</b>	35°C	200 rpm	7,97
<b>11</b>	40°C	100 rpm	7,78

Con los datos de la optimización de parámetros abióticos obtenidos en el bioreactor, se realizó una matriz de superficie de respuesta tridimensional, en la cual se evaluó la influencia de los parámetros de temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>. En la Figura 6 se indican todas las combinaciones realizadas en el bioreactor con sus respectivos resultados en una escala de colores, desde el color azul, el cual representa el crecimiento más bajo de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>, hasta el color rojo, que representa los mejores resultados en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>. Los resultados de la optimización de parámetros abióticos indican que las mejores condiciones para que exista un crecimiento óptimo de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 son de 35°C a 40°C con una agitación que varía entre 160 y 200 rpm. Según Jacques et al. (1999), la temperatura de crecimiento ideal para *Bacillus subtilis*, en medio líquido, va de 30°C a 37°C, lo cual es similar a los resultados obtenidos en el bioreactor.



**Figura 6.** Superficie de respuesta tridimensional estimada para la optimización de parámetros abióticos (Temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto) en la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1. La flecha indica las mejores condiciones en las que se obtuvo una mayor concentración de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en Log UFC mL<sup>-1</sup>

En la Figura 7 se indica un gráfico de componentes principales, en el cual se comparan los cuatro parámetros abióticos evaluados en el bioreactor; este gráfico da como resultado que los parámetros que más influyen en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 son en primer lugar la agitación y en segundo lugar la temperatura; en cambio, los parámetros que casi no tienen influencia en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 son el pH y la cantidad de oxígeno disuelto.

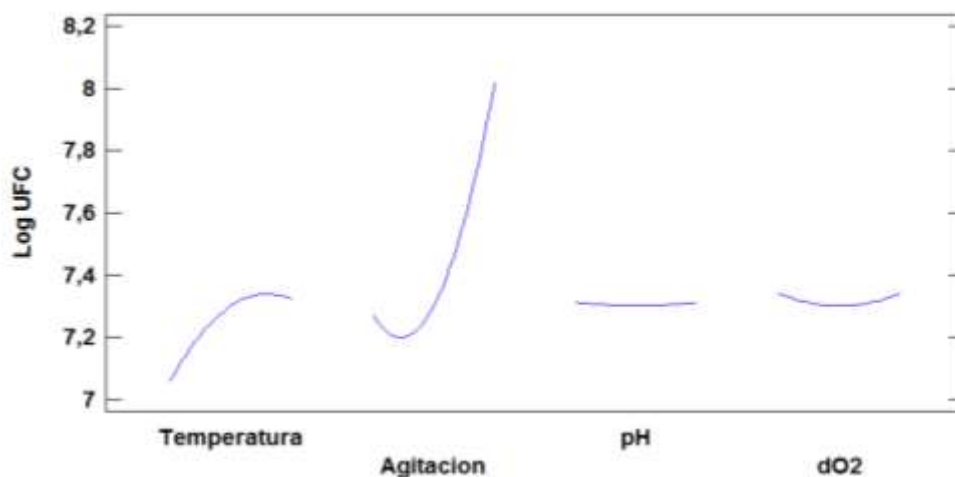


Figura 7. Gráfica de los componentes principales que afectan al crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1.

En la Figura 8 se indica un diagrama de Pareto estandarizado, en el cual también se evalúa cuál de los cuatro parámetros abióticos tuvo mayor influencia en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1; el resultado demuestra que el parámetro que tiene una mayor influencia en el crecimiento de esta bacteria es la agitación, este resultado es similar al de la Figura 7.

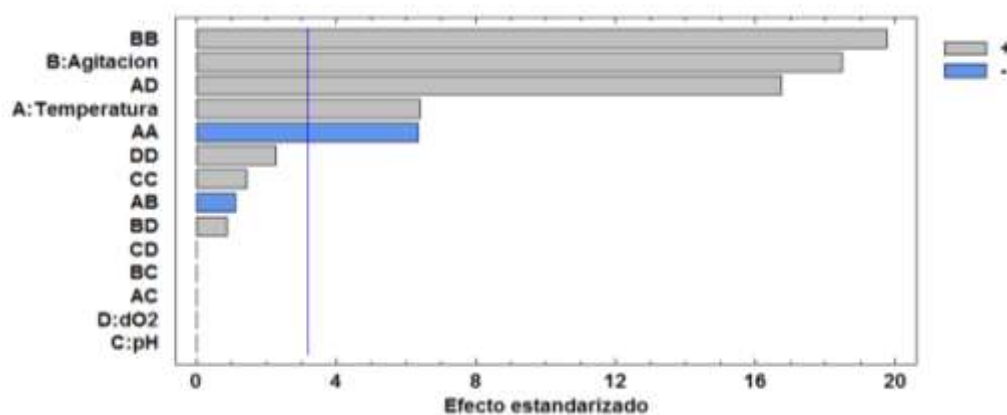


Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizado que evalúa cuál parámetro abiótico (temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto) tiene más influencia en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1.

#### 4.4. Producción de células totales y endosporas de la bacteria obtenida en condiciones optimizadas

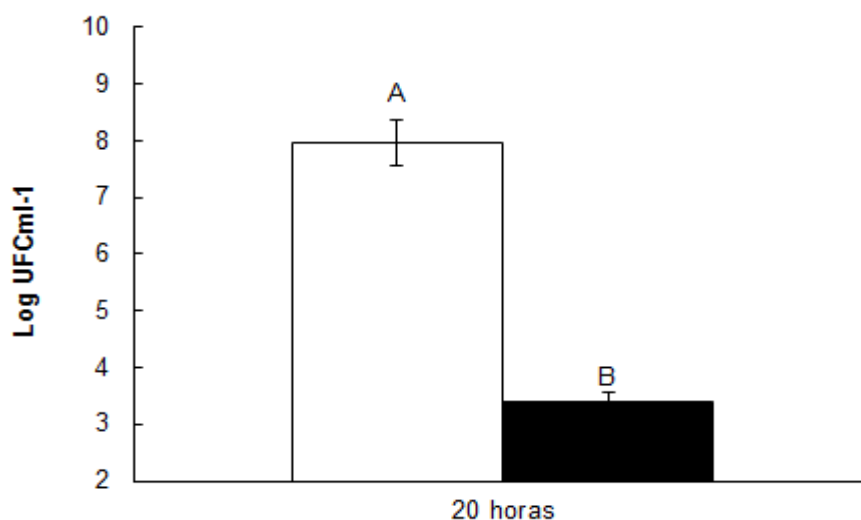
La cuantificación de producción de endosporas y células totales de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en bioreactor con condiciones de 35°C y 200 rpm, indicó que a las 20 horas se obtuvo una producción de células totales de 7.97 Log UFC mL<sup>-1</sup> y una producción de endosporas de 3.41 Log UFC mL<sup>-1</sup> como se muestra en la Tabla 8. Al comparar los resultados estadísticamente, se demostró mediante la prueba de SNK que sí existe una diferencia significativa entre las concentraciones tanto de células totales como de endosporas, así se indica en la Figura 9.

Investigaciones realizadas por Rahman, Ano y Shoda en el 2006, indican que las bacterias producen endosporas como mecanismo de protección frente a la ausencia o disminución de nutrientes y que esta producción se intensifica desde las 48 horas. Los resultados obtenidos de la producción de endosporas a las 20 horas son tan bajos debido a que en ese tiempo, la bacteria no se ha puesto en mecanismo de defensa ya que aún tiene disponibilidad de nutrientes.

Tabla 8.

*Resultados en Log UFC mL<sup>-1</sup> de la producción de células totales y endosporas de Bacillus subtilis en bioreactor en medio de bajo costo durante 20 horas.*

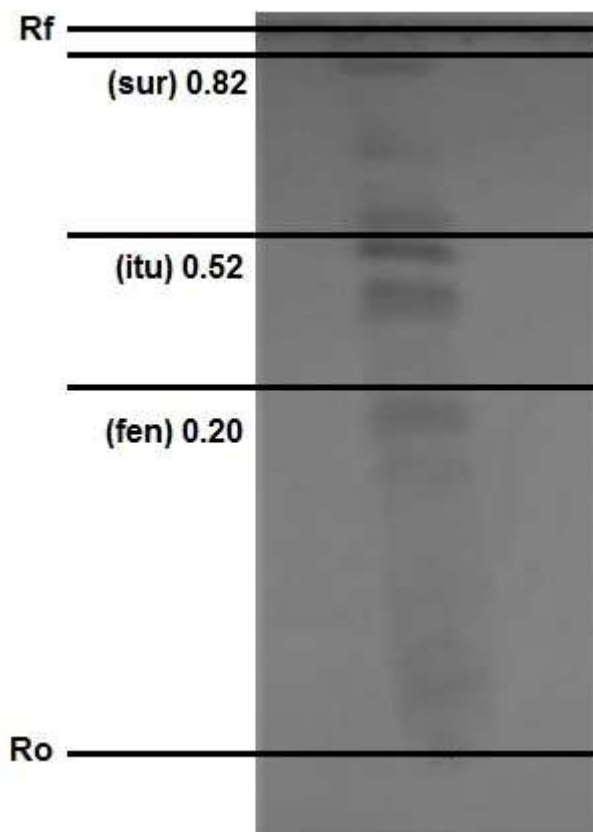
Células totales - Endosporas en medio HSC40 <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1				
Tiempo (h)	Veg+Endosp	SD	Endosporas	SD
20 horas	7,97	0,04	3,41	0,27



**Figura 9.** Producción de células totales (□) y endosporas (■) de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en medio de bajo costo HSC40-ME2. Las diferentes letras en cada barra representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba SNK ( $p < 0.05$ ) que se especifica en el Anexo 3.

#### 4.5. Caracterización de metabolitos antifúngicos

Los extractos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 obtenidos a las 20 horas de desarrollo de la bacteria en medio de bajo costo HSC40-ME2, indican que esta bacteria posee tres familias diferentes de lipopéptidos antifúngicos, clasificadas a través de un análisis cromatográfico en capa fina (HPTLC) como: Surfactinas, con un factor de retención (Rf) de 0.82; iturinas con un factor de retención (Rf) de 0.52 y fengicinas con un factor de retención (Rf) de 0.20; las mismas que se indican en la Figura 10. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Samaniego (2016) con la misma cepa en el medio de bajo costo, los mismos que fueron (Rf) de 0.86 para surfactinas, (Rf) de 0.52 para iturinas y (Rf) de 0.19 para fengicinas.

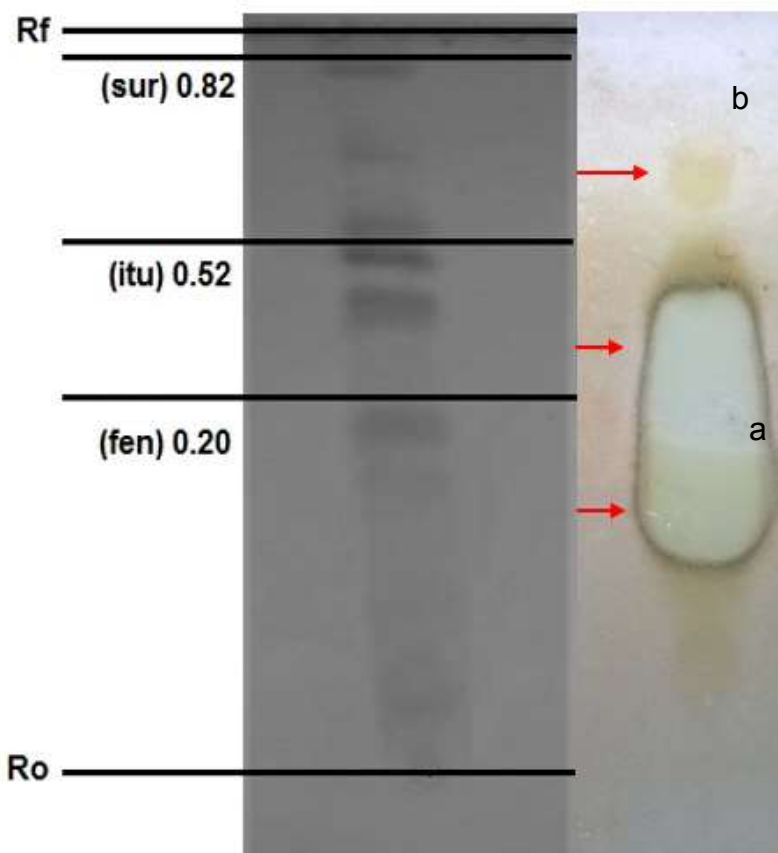


*Figura 10.* Análisis cromatográfico en capa fina HPTLC y medida del factor de retención (Rf) de extractos lipopeptídicos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1, obtenidos en medio de bajo costo HSC40-ME2 a las 20 horas de desarrollo de la bacteria. **sur** (*surfactinas*), **itu** (*iturinas*) y **fen** (*fengicinas*).

Posteriormente, se realizó una prueba conjunta de HPTLC+bioautografía (se indica en la Figura 11) en la cual se obtuvo como resultado que la familia correspondiente a las fengicinas mostró una alta inhibición de crecimiento del micelio del patógeno, con un factor de retención (Rf) de 0.20, al igual que la familia de las iturinas con un factor de retención (Rf) de 0.52. En cambio, las surfactinas, tuvieron un factor de retención de 0.82 con baja inhibición de crecimiento del micelio

Investigaciones realizadas por Yáñez et al., en el 2012, indican que la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol se basa en la producción de lipopéptidos como fengicinas y que su potencial de inhibición aumenta progresivamente conforme al tiempo de incubación de la bacteria; como lo corroboran estos resultados, similares a los obtenidos en otros trabajos,

la inhibición del crecimiento en la familia de las fengicinas e iturrinas fue alto, sin embargo, se infiere que su inhibición sería mayor con un tiempo de incubación de la bacteria de 72 horas.



**Figura 11.** Prueba conjunta HPTLC-bioautografía de extractos lipopeptídicos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 contra *Colletotrichum acutatum*.

a. Extractos producidos en medio de bajo costo HSC40-ME2 a las 20 horas de desarrollo de la bacteria.

b. Las flechas señalan las zonas de inhibición.

#### 4.6. Efecto de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 sobre la germinación de *Colletotrichum acutatum*

Estudios anteriores corroboran que la germinación de *Colletotrichum acutatum* alcanza el 80% a las 6 horas de inocular las esporas en PDA (Agar papa dextrosa); debido a esto, los tratamientos se evaluaron en el mismo período de

tiempo. El primer tratamiento evaluado con la biomasa obtenida del bioreactor, demostró que *Colletotrichum acutatum* tiene un menor porcentaje de germinación comparado con el control; de igual manera, el segundo tratamiento evaluado con el sobrenadante libre de células demostró tener un alto potencial inhibitorio en cuanto a la germinación de las esporas de este hongo.

Al hacer una comparación de los resultados, se obtuvo que la mayor efectividad, en cuanto a la inhibición de la germinación de esporas de *Colletotrichum acutatum*, fue con el segundo tratamiento realizado, es decir, que el sobrenadante libre de células tuvo un mayor poder inhibitorio que la biomasa obtenida en el bioreactor. En la Figura 12 se puede observar los distintos porcentajes de germinación de las esporas del hongo durante 2, 4 y 6 horas con el control y los dos tratamientos evaluados. De igual manera, se realizó un análisis estadístico que demuestra que a las 6 horas los dos tratamientos no tienen diferencias significativas entre sí.



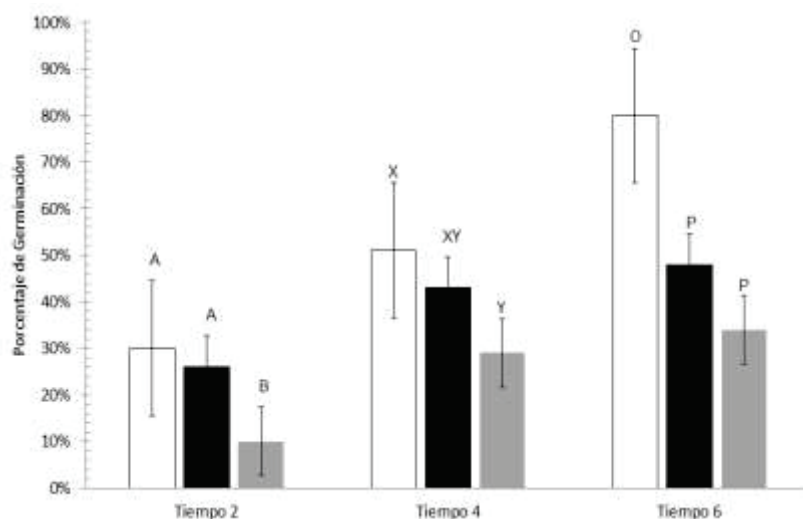


Figura 12. Efectividad de **Bacillus subtilis** cepa S2-1 obtenida en medio HSC40- ME2 contra germinación de *Colletotrichum acutatum* evaluada a las 2, 4 y 6 horas.

a. Porcentaje de germinación de esporas de *Colletotrichum acutatum*, control (□), T1 (■) y T2 (▣)

b. Los tratamientos se especifican en el apartado 2.7.

c. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones por cada tratamiento. Las letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba estadística SNK ( $p < 0.05$ ) que se especifica en los Anexos 5, 6 y 7.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Optimización de los parámetros de temperatura, agitación, pH y cantidad de oxígeno en la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 bajo un modelo Plackett-Burman.

De acuerdo al modelo Plackett-Burman y al análisis en la matriz de superficie de respuesta realizados, se concluye que sí es posible realizar una optimización de los parámetros abióticos para la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1. De acuerdo a los resultados de la producción de biomasa en el bioreactor, se obtuvo que las condiciones óptimas para el crecimiento de esta bacteria son de 35°C a 40°C, con una agitación que varía entre 160 y 200 rpm.

A pesar de que se puede realizar una optimización de los cuatro factores abióticos (temperatura, agitación, pH y cantidad de oxígeno), únicamente dos de estos factores tienen una influencia significativa en el crecimiento de esta bacteria y estos son: en primer lugar la agitación y en segundo lugar la temperatura. Los dos factores restantes (pH y cantidad de oxígeno disuelto), no tienen una gran influencia en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1

Cuantificación de la producción de biomasa y metabolitos de *Bacillus subtilis* sometido a las diferentes variantes de factores abióticos.

Los resultados de la cuantificación de la producción de biomasa o células totales y de endosporas de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en bioreactor indicaron que, a las 20 horas, con condiciones de 35°C y 200 rpm, se obtuvo una producción de células totales de 7.97 Log UFC mL<sup>-1</sup> y una producción de endosporas de 3.41 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Se concluye que la cantidad de endosporas es mucho mayor a partir de las 72 horas de crecimiento de la bacteria, esto sucede debido a la

ausencia de nutrientes que se va presentando conforme aumenta el tiempo de crecimiento.

Según los resultados del análisis cromatográfico HPTLC y del análisis unificado HPTLC+bioautografía, se comprueba que la producción de metabolitos secundarios como los lipopéptidos, son la base para que *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 tenga una actividad antifúngica muy efectiva; los lipopéptidos que tienen un mayor potencial de inhibición son las fengicinas y las iturrinas. La producción de lipopéptidos se relaciona de manera directa con la producción de endosporas.

Los resultados de la efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 contra la germinación de *Colletotrichum acutatum* in vitro, demostraron que tanto la biomasa como el sobrenadante libre de células obtenidos en el medio de bajo costo (HSC40-ME2), actúan inhibiendo la germinación de las esporas de este hongo; sin embargo, el tratamiento evaluado con el sobrenadante libre de células demostró tener una mayor efectividad que la biomasa.

De esta manera, se concluye que la efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 como agente de biocontrol, se mantiene luego de un proceso de producción en donde se varían las condiciones abióticas y que su efectividad se relaciona a la producción de metabolitos secundarios, los cuales se producen en mayor cantidad a partir de las 72 horas de crecimiento de la bacteria; su crecimiento está directamente influenciado por factores bióticos y abióticos, los mismos que condicionan la cantidad y la rapidez con la que se producen estos compuestos.

## **5.2. Recomendaciones**

Se recomienda realizar una optimización de los parámetros abióticos más influyentes en el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 con los rangos óptimos establecidos en este trabajo de agitación y temperatura, pero con un tiempo de crecimiento de la bacteria en el bioreactor de 72 horas, que es cuando la bacteria tiene la mayor cantidad de metabolitos secundarios.

Es recomendable usar *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 como agente de biocontrol, en el tiempo preciso (a partir de las 48 horas de crecimiento de la bacteria) en el cual tiene una máxima producción de metabolitos secundarios, para así asegurar una máxima efectividad contra el patógeno que se quiera inhibir.

Para obtener lipopéptidos de manera más pura y eficaz, se recomienda hacer un estudio comparando varios métodos de extracción de lipopéptidos para así evaluar cuál es el método más eficiente para obtener estos compuestos y con los menores costos.

Acorde a los resultados obtenidos sobre la efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 como un agente de biocontrol, obtenido a escala piloto en el medio de bajo costo HSC40-ME2, se recomienda realizar estudios para desarrollar formulaciones que conserven la misma efectividad y características de la bacteria para poder ser usada en campo.

## REFERENCIAS

- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R. y Korsten, L. (2010). *Combined application of antagonist Bacillus amyloliquefaciens and essential oils for the control of peach postharvest diseases. Crop Prot, 29, 369-377.*
- Baranyi, J. y Roberts, T. (1994). *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 23(3-4), 277- 294.*
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control.* Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Becerra, C. (2007). Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo bananero de Urabá-antioquia. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016, de [https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/402/CamiloAndres\\_BecerraMejia\\_2007.pdf;jsessionid=84724DAAD3F70297D33CEAE08DA46B2F?sequence=1](https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/402/CamiloAndres_BecerraMejia_2007.pdf;jsessionid=84724DAAD3F70297D33CEAE08DA46B2F?sequence=1)
- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., Lamarca, N. y Usall, J. (2010). Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Eur J Plant Pathol, 128, 51-63.*
- Copan Diagnostics, Inc. (2016). *Cryobank Guide.* Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de [http://www.copanusa.com/files/5614/2418/6551/cryobank\\_guide.pdf](http://www.copanusa.com/files/5614/2418/6551/cryobank_guide.pdf)
- 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*
- Chen, H., Wang, L., Su C., Gong G., Wang, P. y Yu, A. (2008). *Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by Bacillus subtilis. Let Appl Microbiol, 47, 180 - 186.*
- Cutting, S. (2011). *Bacillus probiotics. Food Microbiol, 28, 214 - 220.*

- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D. y Wilson, C. (2009). *Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest Biol Technol*, 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.
- Errington, J. (2003). *Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis. Nat Rev Microbiol*, 1, 117 - 126.
- Fravel, D. (2005). *Commercialization and implementation of biocontrol. Annu Rev Phytopathol*, 43, 337-359.
- Forbes, B. (2007). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología (Segunda ed.)*. San José: Editorial EUNED.
- He, H., Silo-suh, L. y Handelsman, J. (1994). *Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from Bacillus cereus. Tetrahedron Lett*, 35, 2499-2502.
- Henriques, A. y Moran, C. (2007). *Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annu Rev Microbiol*, 61, 555-588.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología industrial*. Costa Rica: EUNED.
- Hsieh, F., Lin, T., Meng, M. y Kao, S. (2008). *Comparing methods for identifying Bacillus strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. Curr Microbiol*, 56, 1-5.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E. y Thonart, P. (1999). *Optimization of biosurfactant lipopeptide production from Bacillus subtilis S499 by Plackett Burman design. Appl Biochem Biotech*, 77, 223 - 233.
- Janisiewicz, W. y Korsten, L. (2002). *Biological control of postharvest diseases of fruit. Annu Rev Phytopathol*, 40, 411-441.
- Jacques, P. (2011). *Surfactin and other lipopeptides from Bacillus spp.* En G. Soberón-Chávez, (Ed.) *Biosurfactants, Microbiology Monographs 20* (p. 57-77). Berlín: Springer-Verlag.

- Kim, S. y Bhowmik, S. (2007). *Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. J Food Sci, 55, 1008-1010.*
- Kurtzman, C. y Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rot. Syst Appl Microbiol, 24, 395-399.*
- Lima, G., De Curtis, F., Piedimonte, D., Spina, A., y De Cicco, V. (2006). *Integration of Biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of Botrytis cinerea. Postharvest Biol Technol, 40, 301-307.*
- Madigan, M. y Martinko, J. (2006). *Cell structure. En: Microbiology of Microorganisms 17a Edition Brock.*
- Minitab Inc. (2016). ¿Qué es un diseño de superficie de respuesta? Recuperado el 06 de Junio de 2017, de <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/doe/response-surface-designs/what-is-a-response-surface-design/>
- Nakano, M. y Zuber, P. (2002). Anareobiosis. En: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (Eds.). *Bacillus subtilis and its clased relatives from genes to cell.* American Society for Microbiology Press. Washington, 393 - 404.
- National Research Council. (1987). *Regulating Pesticides in Food: The Delaney Paradox. En: report of the Committee of Scientific and Regulatory Issues Underlying Pesticide Use Patterns and Agricultural Innovation. The National Academy Press.* Washington.
- Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. y Setlow, P. (2000). *Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol. Mol Bio. Rev, 64, 548-572.*
- Obagwu, J. y Korsten, L. (2003). *Integrated control of citrus green and blue molds using Bacillus subtilis in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biol Technol, 28, 187-194.*
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J. y Thonart, P. (2005a). *Bacillus subtilis M4 decreases plant suceptibility towards*

- fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. Appl Microbiol Biotechnol, 67, 692-698.*
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A. y Thonart, P. (2005b). *Involment of fengycin type lipopeptides in multifaceted biocontrol potential of Bacillus subtilis. Appl Microbiol Biotechnol, 69, 29-38.*
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol, 16, 115 - 125.*
- Ongena, M., Henry, G. y Thonart, P. (2009). *The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of Bacillus subtilis. En: Gisi, U., Chet, L., Gullino, M.L. Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century Springer Verlag. Berlin, 59 - 69.*
- Osman, M., Sivakumar, D. y Korsten, L. (2011). *Effect of biocontrol agent Bacillus amyloliquefaciens and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. Crop Prot, 30, 173-178.*
- Palou, L., Smilanick, J., Fresno, C., Usall, J. y Viñas, I. (2001). *Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. Plant Dis, 85, 371-376.*
- Peypoux, F., Guimand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B. y Lederec, E. (1978). *Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from Bacillus subtilis. Biochemistry, 17, 3992-3996.*
- Peypoux, F., Bonmatin, J. y Wallach, J. (1999). *Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl Microbiol Biotechnol, 51, 553-563.*
- Pusey, P. y Wilson, C. (1984). *Postharvest biological control of stone fruit brown rot by Bacillus subtilis. Plant Dis, 68, 753-756.*
- Rahman, M., Ano, T., & Shoda, M. (2006). *Short communication Second stage production of iturin A by induced germination of Bacillus subtilis RB14. J Biotechnol, 125, 513-515.*
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J. y Thonart, P. (1993). *Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. J Chromatogr, 639, 81-85.*



- Restuccia, C., Giusino, F., Licciardello, F., Randazzo, C., Caggia, C. y Muratore, G. (2006). *Biological control of peach pathogens by commercial products and indigenous yeasts. J Food Protec*, 69, 2465-2470.
- Rojas, C., Tripaldi, P. y Dután, H. (2010). Desarrollo y optimización de una infusión aromática tipo tisana aplicando diseño de Plackett-Burman y optimización de máxima pendiente. Recuperado el 2016 de Noviembre de 29, de file:///C:/Users/Dianita/Downloads/48-207-1-PB.pdf
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J., Dávila, J. y Pérez-García, A. (2007a). *Effect of lipopeptides of antagonistic strains of Bacillus subtilis on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen Podosphaera fusca. J Appl Microbiol*, 103, 969-976.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufour, S., Veening, J., Arrebola, E. y Kuipers, O. (2007b). *The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of Bacillus subtilis towards Podosphaera fusca. Mol Plant Microbe Interact*, 20, 430-440.
- Samaniego, G. (2016). Optimización del proceso de producción de *Bacillus subtilis* CTPX S2-1 y sus metabolitos, para el control de antracnosis en *Lupinus mutabilis* sweet.
- Sharp, M. y Pogliano, K. (2002). *Cell Architecture. En A. Sonenshein, J. Hoch, & R. Losick (Eds.). Bacillus subtilis and its closed relatives from genes to cell* (págs. 15-57). Washington: American Society for Microbiology Press.
- Stabb, E., Jacobson, L. y Handlesman, J. (1994). *Zwittermicin A-producing strains of Bacillus cereus from diverse soils. Appl Environ Microbiol*, 60, 4404-4412.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol*, 56, 845-857.
- Teixidó, N., Cañamás, T., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C. y Casals, C. (2006). *Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent Pantoea agglomerans CPA-2 by osmotic treatments. J Appl Microbiol*, 101, 927-937.

- Toghueoa, R., Ekea, P., Zabalgoceazcoab, 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.
- Torres, R., Nunes, C., García, J., Abadias, I., Viñas, I., Manso, T. (2007). *Application of Pantoea agglomerans CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations*. *Eur J Plant Pathol*, 118, 73-83.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X. y Viñas, I. (2001). *Pilot tests of Candida sake (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit*. *Postharvest Biol Technol*, 21, 147-156.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U. y Jung, G. (1986). *Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by Bacillus subtilis F-29-3*. *J Antibiot*, 39, 888-901.
- Waites, M., Morgan, N., Rockey, J. y Higton, G. (2001). *Industrial microbiology: an introduction Blackwell Science*. Oxford, 293.
- Ward, O.P. (1991). *Bioteología de la fermentación*. Acribia, Zaragoza.
- Yáñez-Mendizabal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C. y 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. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de poscosecha de frutas*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2016, de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Yáñez, V., Falconí, C., Grijalva, C., Oliva, C. y Castañeda, A. (2015). *Potencial de Bacillus spp. para control de enfermedades poscosecha de chocho*. En A. A. USFQ, y A. León-Reyes (Ed.), *Resúmenes del*

Segundo Simposio de Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno (p. 42). Ecuador: USFQ.

Zhang, J. y Dou, H. (2002). *Evaluation of Bacillus subtilis as potential biocontrol agent for postharvest green mold control on "Valencia" orange. Proc Fla State Hort Soc, 115, 60-64.*

## **ANEXOS**

## Anexo 1: Procedimiento para el uso de criobolas y recuperación de bacterias en criocultivos de conservación.

### > 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

Copen Diagnostics Inc.  
 25055 Jefferson Ave.  
 Murietta, California 92562 USA  
 Toll Free: (800)216-4016 (US & Canada)  
 Phone: (951) 696-6957 Fax: (951)600-1802  
 E-Mail: info@copenusa.com  
 www.copenusa.com

Anexo 2: Análisis estadístico de la optimización de parámetros abióticos

**Optimizar Respuesta**

Meta: maximizar Log UFC

Valor óptimo = 8,46964

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	30,0	40,0	39,9956
Agitacion	100,0	200,0	199,233
pH	3,31821	6,68179	3,31821
dO2	0,0	100,0	99,8291

**Efectos estimados para Log UFC (UFC)**

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	7,30228	0,0124934	
A: Temperatura	0,26	0,0406085	5,0
B: Agitacion	0,75	0,0406085	5,0
C: pH	0,0	0,0155402	1,0
D: dO2	0,0	0,0406085	5,0
AA	-0,220997	0,0348946	1,64085
AB	-0,05	0,0454017	5,0
AC	0,0	0,0203043	1,0
AD	0,76	0,0454017	5,0
BB	0,689003	0,0348946	1,64085
BC	0,0	0,0203043	1,0
BD	0,04	0,0454017	5,0
CC	0,0225475	0,0155821	1,00403
CD	0,0	0,0203043	1,0
DD	0,0790026	0,0348946	1,64085

Errores estándar basados en el error total con 3 g.l.

**Análisis de Varianza para Log UFC**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	0,0338	1	0,0338	40,99	0,0077
B:Agitacion	0,28125	1	0,28125	341,11	0,0003
C:pH	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
D:dO2	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AA	0,0330722	1	0,0330722	40,11	0,0080
AB	0,001	1	0,001	1,21	0,3512
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AD	0,23104	1	0,23104	280,21	0,0005
BB	0,321462	1	0,321462	389,88	0,0003
BC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BD	0,00064	1	0,00064	0,78	0,4432
CC	0,00172642	1	0,00172642	2,09	0,2437
CD	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
DD	0,0042264	1	0,0042264	5,13	0,1085
Error total	0,00247358	3	0,000824525		
Total (corr.)	0,871561	17			

R-cuadrada = 99,7162 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,3917 por ciento

Error estándar del est. = 0,0287145

Error absoluto medio = 0,00877807

Estadístico Durbin-Watson = 1,19752 (P=0,0361)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,217848

Anexo 3: Análisis estadísticos de la producción de células totales y endosporas

Moments			
N	16	Sum Weights	16
Mean	5.4304375	Sum Observations	86.887
Std Deviation	2.33409734	Variance	5.4480104
Skewness	0.02204282	Kurtosis	-2.2498827
Uncorrected SS	553.554579	Corrected SS	81.7201559
Coeff Variation	42.981755	Std Error Mean	0.58352434

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	5.430438	Std Deviation	2.33410
Median	5.321500	Variance	5.44801
Mode	3.000000	Range	4.99600
		Interquartile Range	4.50100

Note: The mode displayed is the smallest of 6 modes with a count of 2.

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	9.306274	Pr >  t	<.0001
Sign	M	8	Pr >=  M	<.0001
Signed Rank	S	68	Pr >=  S	<.0001

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.719745	Pr < W	0.0003
Kolmogorov-Smirnov	D	0.31454	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.34707	Pr > W-Sq	<0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	2.042088	Pr > A-Sq	<0.0050



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	80.86056006	80.86056006	1316.95	<.0001
Error	14	0.85959587	0.06139971		
Corrected Total	15	81.72015594			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LogUFC Mean
0.989481	4.562977	0.247790	5.430438

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	0.0614

Number of Means	2
Critical Range	0.265728

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	7.6785	8	Biomasa
B	3.1824	8	Endosporas

Anexo 4: Porcentajes de germinación de esporas de *C. acutatum* en la prueba de efectividad in vitro contra *B. subtilis* CtpxS2-1.

Tiempo 2 CK				Tiempo 4 T1				Tiempo 6 T2			
Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.			Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.			Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.		
	100	%	%G		100	%	%G		100	%	%G
1R	27,3	27%	30%	1R	58,3	58%	51%	1R	80,3	80%	80%
2R	29,6	30%		2R	37,6	38%		2R	81,6	82%	
3R	32,6	33%		3R	56,4	56%		3R	77,6	78%	

T1				T1				T1			
Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.			Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.			Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.		
	100	%	%G		100	%	%G		100	%	%G
1R	25	25%	26%	1R	44,3	44%	43%	1R	42,0	42%	48%
2R	24,3	24%		2R	33,6	34%		2R	41,3	41%	
3R	27,3	27%		3R	50,6	51%		3R	59,3	59%	

T2				T2				T2			
Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.			Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.			Tratam.	Germinación (G) # de esporas germinadas por repetición.		
	100	%	%G		100	%	%G		100	%	%G
1R	10,3	10%	10%	1R	34	34%	29%	1R	38,0	38%	34%
2R	13,0	13%		2R	24,3	24%		2R	37,6	38%	
3R	7,6	8%		3R	27,3	27%		3R	27,6	28%	

Anexo 5: Análisis estadístico de la prueba de efectividad de *Bacillus subtilis* contra la germinación de *Colletotrichum acutatum* a las 2 horas.

Moments			
<b>N</b>	9	<b>Sum Weights</b>	9
<b>Mean</b>	21.8888889	<b>Sum Observations</b>	197
<b>Std Deviation</b>	9.12228651	<b>Variance</b>	83.2161111
<b>Skewness</b>	-0.6621815	<b>Kurtosis</b>	-1.3026957
<b>Uncorrected SS</b>	4977.84	<b>Corrected SS</b>	665.728889
<b>Coeff Variation</b>	41.6754206	<b>Std Error Mean</b>	3.04076217

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
<b>Mean</b>	21.88889	<b>Std Deviation</b>	9.12229
<b>Median</b>	25.00000	<b>Variance</b>	83.21611
<b>Mode</b>	27.30000	<b>Range</b>	25.00000
		<b>Interquartile Range</b>	14.30000

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
<b>Student's t</b>	<b>t</b>	7.198488	<b>Pr &gt;  t </b>	<.0001
<b>Sign</b>	<b>M</b>	4.5	<b>Pr &gt;=  M </b>	0.0039
<b>Signed Rank</b>	<b>S</b>	22.5	<b>Pr &gt;=  S </b>	0.0039

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
<b>Shapiro-Wilk</b>	<b>W</b>	0.87203	<b>Pr &lt; W</b>	0.1293
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	<b>D</b>	0.270896	<b>Pr &gt; D</b>	0.0554
<b>Cramer-von Mises</b>	<b>W-Sq</b>	0.108218	<b>Pr &gt; W-Sq</b>	0.0768
<b>Anderson-Darling</b>	<b>A-Sq</b>	0.578435	<b>Pr &gt; A-Sq</b>	0.0952

<b>R-Square</b>	<b>Coeff Var</b>	<b>Root MSE</b>	<b>inibicion2h Mean</b>
0.949479	10.81647	2.367605	21.88889

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	5.605556

<b>Number of Means</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Critical Range</b>	4.7302277	5.9311675

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	29.833	3	CK
A			
A	25.533	3	T1
B	10.300	3	T2

Anexo 6: Análisis estadístico de la prueba de efectividad de *Bacillus subtilis* contra la germinación de *Colletotrichum acutatum* a las 4 horas.

Moments			
N	9	Sum Weights	9
Mean	40.71111111	Sum Observations	366.4
Std Deviation	12.3523727	Variance	152.581111
Skewness	0.23811375	Kurtosis	-1.4006856
Uncorrected SS	16137.2	Corrected SS	1220.64889
Coeff Variation	30.3415268	Std Error Mean	4.11745756

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	40.71111	Std Deviation	12.35237
Median	37.60000	Variance	152.58111
Mode	.	Range	34.00000
		Interquartile Range	17.00000

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	9.887439	Pr >  t	<.0001
Sign	M	4.5	Pr >=  M	0.0039
Signed Rank	S	22.5	Pr >=  S	0.0039

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.93591	Pr < W	0.5396
Kolmogorov-Smirnov	D	0.154982	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.039404	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.260526	Pr > A-Sq	>0.2500

R-Square	Coeff Var	Root MSE	inibicion4h Mean
0.624052	21.48179	8.745475	40.71111

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	76.48333

<b>Number of Means</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Critical Range</b>	17.472543	21.908582

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>				
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
	A	50.767	3	CK
	A			
B	A	42.833	3	T1
B				
B		28.533	3	T2

Anexo 7: Análisis estadístico de la prueba de efectividad de *Bacillus subtilis* contra la germinación de *Colletotrichum acutatum* a las 6 horas.

Moments			
N	9	Sum Weights	9
Mean	53.9222222	Sum Observations	485.3
Std Deviation	21.1117727	Variance	445.706944
Skewness	0.38699326	Kurtosis	-1.8113369
Uncorrected SS	29734.11	Corrected SS	3565.65556
Coeff Variation	39.1522674	Std Error Mean	7.03725755

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	53.92222	Std Deviation	21.11177
Median	42.00000	Variance	445.70694
Mode	.	Range	54.00000
		Interquartile Range	39.60000

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	7.662391	Pr >  t	<.0001
Sign	M	4.5	Pr >=  M	0.0039
Signed Rank	S	22.5	Pr >=  S	0.0039

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.854364	Pr < W	0.0832
Kolmogorov-Smirnov	D	0.269423	Pr > D	0.0586
Cramer-von Mises	W-Sq	0.103016	Pr > W-Sq	0.0892
Anderson-Darling	A-Sq	0.616212	Pr > A-Sq	0.0778

R-Square	Coeff Var	Root MSE	inibicion6h Mean
0.919876	12.79696	6.900403	53.92222

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	47.61556

<b>Number of Means</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Critical Range</b>	13.786282	17.286429

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	79.833	3	CK
B	47.533	3	T1
B			
B	34.400	3	T2



