

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA INHIBITORIA DE  
FILTRADOS PRODUCIDOS POR CULTIVOS INMOVILIZADOS EN  
AGAR-AGAR DE *Bacillus* sp. CONTRA *Phytophthora* sp. COMO  
PATÓGENO FOLIAR DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura en Bioquímica

ELABORADO POR: RUTH PAOLA ARTEAGA ARTEAGA

LA PAZ - BOLIVIA

2023

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA INHIBITORIA DE  
FILTRADOS PRODUCIDOS POR CULTIVOS INMOVILIZADOS EN  
AGAR-AGAR DE *Bacillus* sp. CONTRA *Phytophthora* sp. COMO  
PATÓGENO FOLIAR DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

**Tesis presentada para la obtención del grado de Licenciatura en Bioquímica**

**ELABORADO POR: RUTH PAOLA ARTEAGA ARTEAGA**

**ASESORAS: MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA Ph.D.**

**M.Sc. MARISEL MERCEDES MAMANI MAMANI**

**LA PAZ - BOLIVIA**

**2023**

## **Dedicatoria**

A mi familia y amigos.

*“Cuando las cosas se ponen difíciles, detente un rato y mira hacia atrás, ve lo lejos que has llegado, no olvides lo gratificante que es”, “ahora soy quien soy, con todos mis fallos y errores. Quizás mañana sea un poco más sabio y también seré yo”*

Taehyung, NamJoon - BTS

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés que me albergó durante los años de mi formación profesional y permitió conocer a muchos amigos, compañeros, docentes que fortalecieron mis conocimientos y formación académica.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por haberme acogido desde mi formación como estudiante y brindarme el espacio para desarrollar la experimentación que dio lugar al presente trabajo. Agradecer a mis Tutoras de Tesis por mostrarme los caminos de la ciencia por su colaboración, sus enseñanzas y guía brindada para la culminación de este trabajo.

Al IIAREN y centro experimental de Patacamaya por el apoyo brindado en esta investigación.

Manifiestar mi más sincera admiración y reconocimiento a mis padres Patricia Arteaga y Ricardo Arteaga, por apoyarme en cada decisión que tomé, por darme los ánimos y confianza de seguir adelante durante estos años. A mi hermano Pedro Arteaga por creer en mí y darme ánimo.

Aunque vaya lento, caminaré con mis propios pies guiada por la perseverancia llegare a cumplir mis metas, gran lección aprendida en la realización de este trabajo.

## **Tabla de contenido**

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>I. Planteamiento del problema.....</b>	<b>3</b>
<b>A. Justificación .....</b>	<b>4</b>
<b>B. Objetivos.....</b>	<b>6</b>
<b>II. Diseño teórico.....</b>	<b>6</b>
<b>A. Marco referencial.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Antecedentes generales sobre el problema en estudio.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Descripción del ámbito de estudio.....</b>	<b>7</b>
<b>B. Marco teórico.....</b>	<b>8</b>
<b>1. El Cultivo de tomate a nivel mundial.....</b>	<b>8</b>
• <b>Aporte nutricional.....</b>	<b>9</b>
• <b>Importancia económica.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Producción y consumo de tomate en Bolivia.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Enfermedades causadas por hongos en tomate.....</b>	<b>10</b>
• <b>Tizón tardío y agente causal.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Generalidades del control de plagas y enfermedades.....</b>	<b>12</b>
• <b>Uso de agroquímicos en la agricultura.....</b>	<b>12</b>
<b>5. Bacillus sp. como agente de control biológico.....</b>	<b>15</b>
• <b>Mecanismos de antibiosis.....</b>	<b>15</b>
<b>6. Estrategias de cultivos en bioprocesos.....</b>	<b>17</b>
• <b>Cultivos de células libres vs células inmovilizadas.....</b>	<b>17</b>

•	La inmovilización como herramienta de optimización en la bioproducción.....	17
III.	Hipótesis de investigación.....	18
IV.	Matriz de marco lógico.....	19
V.	Diseño metodológico.....	22
A.	Población en estudio, ámbito y periodo de investigación.....	22
B.	Tipo de investigación.....	22
C.	Materiales, métodos, técnicas y procedimientos.....	23
1.	Determinación de la actividad biológica inhibitoria de la cepa de Bacillus sp. contra Fitopatógeno fúngico Phytophthora sp. ....	24
2.	Determinación de las condiciones de producción de filtrados biológicamente activos de Bacillus sp. YHPJ inmovilizados.....	26
3.	Evaluación de la toxicidad de los filtrados obtenidos con Bacillus sp. inmovilizados. ....	29
4.	Determinaciones analíticas .....	30
•	Cinética de crecimiento de Bacillus sp. ....	30
•	Cinética de crecimiento de Phytophthora sp. ....	31
•	Postulados de Koch.....	31
•	Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	32
•	Determinación de nitrógeno total.....	33
D.	Procesamiento de datos.....	34
1.	Recolección.....	34
2.	Elaboración.....	34
3.	Análisis.....	34
VI.	Resultados y Discusión.....	35

<b>1.</b>	<b>Activación, aislamiento y caracterización de las cepas.....</b>	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>Determinación de las condiciones de producción de filtrados biológicamente activos de Bacillus sp. YHPJ inmovilizados.....</b>	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>Evaluación de la toxicidad de los filtrados obtenidos con Bacillus sp. inmovilizados. ....</b>	<b>52</b>
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>VIII.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>62</b>

## **Tabla de anexos**

<b>Anexo 1.</b> Medio de cultivo PDA.....	62
<b>Anexo 2.</b> Medio de cultivo caldo papa dextrosa suplementado con urea.....	62
<b>Anexo 3.</b> Tablas de porcentaje de inhibición de los diferentes filtrados obtenidos .....	62
<b>Anexo 4.</b> Recuperación progresiva de los plantines de tomate evaluado durante 3 meses posteriores al tratamiento con los filtrados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ.....	64
<b>Anexo 5.</b> Porcentaje de la capacidad germinativa de germinación relativa de semillas de tomate regados con los filtrados bioactivos de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ. Inmovilizados a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 60, 30 y 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).....	65
<b>Anexo 6.</b> Aplicaciones de <i>B. subtilis</i> para la ingeniería genética, producción de enzimas o productos químicos industriales, agricultura, medicina y biomateriales.....	65



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Contenido nutricional en 100 g de tomate convencional.....	9
<b>Tabla 2.</b> Clasificación toxicológica de ingredientes activos según criterios de la OMS.....	13
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de inhibición de los filtrados bacterianos obtenidos con diferentes condiciones de cultivo de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ, frente a <i>Phytophthora</i> sp.....	44
<b>Tabla 4.</b> Análisis de varianza de la evaluación actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. contra <i>Phytophthora</i> sp. ....	46
<b>Tabla 5.</b> ANOVA multivariado realizado a los 48 ensayos para evaluar el efecto significativo de los factores en los porcentajes de inhibición.....	48
<b>Tabla 6.</b> Ensayo de Test de Ames. Cepa TA 98 y TA 100, del filtrado crudo bacteriano de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ.....	54

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Características de la planta del tomate.....	8
<b>Figura 2</b> Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i> .....	11
<b>Figura 3</b> Signos de infección por hongo <i>Phytophthora infestans</i> en fruto y tallo de tomate ( <i>Solanum lycopersicum L.</i> ) .....	12
<b>Figura 4</b> Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas.....	16
<b>Figura 5</b> Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) Mecanismo de acción de los lipopéptidos.....	17
<b>Figura 6. A.</b> Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. cepa YHPJ en agar papa-dextrosa, se observan colonias blanquecinas medianas. <b>B.</b> Bacilos Gram positivos con esporas con una magnificación de 100X.....	35
<b>Figura 7. A.</b> Cinética de crecimiento <i>Bacillus</i> sp. cepa YHPJ (células libres) en caldo papa dextrosa modificado incubado a una temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 horas. <b>B)</b> Grafica de la fase exponencial de la curva de crecimiento para la obtención del tiempo de generaciones de la cepa.....	36
<b>Figura 8.</b> <i>Phytophthora</i> sp. <b>A)</b> Planta de tomate infectada (tallo y hojas) <b>B)</b> Cultivo axénico de <i>Phytophthora</i> sp. en PDA. <b>C) y D)</b> Identificación microscópica donde se observa Conidias de <i>Phytophthora</i> en C con una magnificación de 40X y en D se observa esporangios no papilados de <i>Phytophthora</i> sp. con una magnificación de 100X.....	37
<b>Figura 9.</b> Postulados de Koch de <i>Phytophthora</i> sp. <b>A)</b> Postulados de Koch <i>in vivo</i> en hojas de tomate <b>B)</b> Postulados de Koch <i>in vitro</i> en hojas de tomate <b>C)</b> Cinéticas de crecimiento <i>Phytophthora</i> sp. en PDA cultivado a una temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 días.....	38

<b>Figura 10.</b> Actividad antagónica directa de <i>Bacillus</i> sp. cepa YHPJ contra <i>Phytophthora</i> sp. <b>A)</b> <i>Phytophthora</i> sp. (control de crecimiento) <b>B)</b> <i>Bacillus</i> sp. YHPJ inhibe el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp.....	40
<b>Figura 11.</b> Inmovilización celular de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ <b>A)</b> observación macroscópica de las capsulas de agar-agar <b>B)</b> observación en el estéreo-microscopio de una capsula de agar-agar con <i>Bacillus</i> sp. YHPJ donde se observa la porosidad de la misma.....	42
<b>Figura 12.</b> Evaluación de los filtrados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ contra el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp.....	43
<b>Figura 13.</b> Efecto de la interacción de la inmovilización de <i>Bacillus</i> en capsulas de agar agar, el tiempo de incubación del cultivo y la dilución del extracto sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos sobre <i>Phytophthora</i> .....	46
<b>Figura 14.</b> Efecto de la interacción de la inmovilización, el tiempo de cultivo y la agitación sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos.....	47
<b>Figura 15.</b> Diagrama de barras de los diferentes y porcentajes de inhibición sobre tratamientos contra <i>Phytophthora</i> sp.....	49
<b>Figura 16.</b> Evaluación de los filtrados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ contra el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp. en plantas de tomate a una concentración de 250 µL/mL y 125 µL/mL <b>A)</b> proceso de evaluación in vivo de los filtrados bacterianos <b>B)</b> Plantines a los 4 días posteriores a la primera aplicación de los filtrados bacterianos activos. <b>C)</b> Plantines a los 15 días posteriores a la primera aplicación de los filtrados bacterianos activos, donde se observa en los plantines con el tratamiento el crecimiento de nuevas hojas sanas en la base del tallo.....	51
<b>Figura 17.</b> Germinación de semillas de tomate con filtrados bacterianos obtenidos con <i>Bacillus</i> sp. YHPJ inmovilizado a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 60, 30 y 15 µL/mL).....	53

## **Tabla de abreviaturas**

°C	Grados celsius
cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alternativa
g/ L	Gramos por litro
Kg	kilogramo
M	Concentración molar
mL	mililitro
N	Nitrógeno
nm	nanómetro
µm	micrometro
pH	Potencial Hidrógeno
MANOVA	
Rpm	Revoluciones por minute
sp.	Especies
PDA	Agar papa dextrosa

## Resumen

A nivel mundial las plagas y enfermedades de las plantas afectan a cultivos agrícolas repercutiendo en la vida útil de las plantas. Este es el caso del tomate, una de las hortalizas afectadas por el “tizón tardío” producido por el hongo *Phytophthora* spp., el cual se ha convertido en una amenaza persistente para la producción de tomate convirtiéndose en un factor limitante en la producción agrícola, debido al marchitamiento y posterior muerte vegetal. En este contexto, el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes químicos se ha incrementado en todo el mundo, dando como resultado el deterioro de la fertilidad de los suelos y la aparición de formas de resistencia de los microorganismos fitopatógenos. Una forma eficiente y respetuosa con el medio ambiente para el manejo de las enfermedades de las plantas, es el empleo de productos de origen microbiano, siendo el caso de *Bacillus* sp. un microorganismo capaz de producir compuestos antimicrobianos y sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

En el presente estudio se evaluó la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de un filtrado bacteriano obtenido mediante la inmovilización celular en agar-agar al 3,5% de la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ, inhibiendo el crecimiento de *Phytophthora* sp. En el ensayo de enfrentamiento dual, la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ mostró una inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora* sp. en un 85 %. El filtrado bacteriano obtenido de cultivos de células libres e inmovilizadas de *Bacillus* sp. YHPJ demostró ser un inhibidor del micelio de *Phytophthora* sp. (>75%), siendo más eficaz en comparación con la inhibición micelial obtenida con el agroquímico Ram Caf (62%).

Los filtrados de los cultivos inmovilizados de *Bacillus* sp. YHPJ además fueron aplicados mediante aspersión en plantines de tomate infectados con el patógeno demostrando ser un buen controlador al detener la infección y permitir a la planta la recuperación total.

Mediante la inmovilización de las células de *Bacillus* sp. YHPJ en agar-agar se estableció la optimización de la producción de un filtrado con buena actividad inhibitoria contra *Phytophthora* sp., reduciendo el tiempo de cultivo y uso de energía. **Palabras clave:** Inmovilización celular, actividad biológica inhibitoria, *Bacillus*, *Phytophthora*, tomate.

## Abstract

Worldwide, plant pests and diseases affect agricultural crops, disturbing the useful life of the plants. This is the case of tomato, one of the vegetables affected by “late blight” caused by the fungus *Phytophthora* spp. which has become a persistent threat to tomato production, becoming a limiting factor in agricultural production due to wilting and subsequent plant death. In this context, the excessive use of pesticides and chemical fertilizers has increased worldwide, resulting in the deterioration of soil fertility and the emergence of resistant forms of phytopathogenic microorganisms. An efficient and environmentally friendly way to manage plant diseases is the use of products of microbial origin, being the case of *Bacillus* sp. a microorganism capable of producing antimicrobial compounds and plant growth promoting substances.

In the present study, *in vitro* and *in vivo* biological activity of a bacterial filtrate obtained by cell immobilization in 3.5% agar-agar of *Bacillus* sp. strain YHPJ was evaluated, inhibiting the growth of *Phytophthora* sp. In the dual confrontation assay, *Bacillus* sp. strain YHPJ showed an inhibition of mycelial growth of *Phytophthora* sp. by 85%. The bacterial filtrate obtained from free and immobilized cultures of *Bacillus* sp. YHPJ proved to be an inhibitor of *Phytophthora* sp. mycelium (>75%), being more effective compared to the mycelial inhibition obtained with the agrochemical Ram Caf (62%).

The filtrates obtained from immobilized culture of *Bacillus* sp. YHPJ were also spray-applied on tomato seedlings infected with the pathogen and, proved to be a good controller by arresting the infection and allowing the plant to fully recover.

By immobilizing *Bacillus* sp. YHPJ cells in agar-agar, the production of a filtrate with good inhibitory activity against *Phytophthora* sp. was optimized, reducing culturing time and energy use.

**Key words:** cell immobilization, biological inhibitory activity, *Bacillus*, *Phytophthora*, tomato.

## **I. Planteamiento del problema**

El 25 de septiembre de 2015, los líderes mundiales adoptaron un conjunto de objetivos globales para erradicar la pobreza, proteger el planeta y asegurar la prosperidad para todos como parte de una nueva agenda, la conocida como Agenda 2030, que recoge los 17 objetivos de desarrollo sostenible (ODS) establecidos por la Organización de Naciones Unidas. Cada uno de estos objetivos tiene metas específicas que deben alcanzarse en los próximos 7 años. Uno de los ODS que es de interés mundial es el objetivo de hambre cero el cual menciona que es “poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover una agricultura sostenible” meta hasta el año 2030. Es por esta razón que el estudio o investigación en temas de seguridad alimentaria tiene como objetivo buscar soluciones o alternativas que ayuden a cumplir el derecho a tener acceso oportuno y permanente a una alimentación adecuada en cantidad y calidad, donde la inocuidad de los alimentos juega un papel fundamental a la hora de garantizar la seguridad de los alimentos en cada etapa de su producción.

Según la Cumbre Independiente de Sistemas Alimentarios miles de bolivianos no tienen acceso a los alimentos por diversas razones, como ser falta de recursos, o la ausencia de alimentos requeridos en el mercado nacional. Y en los últimos tiempos, durante la pandemia de Covid-19 se ha visto la fragilidad de los sistemas alimentarios del mundo observando problemas en el abastecimiento de productos alimenticios y para asegurar la seguridad alimentaria de las familias bolivianas. El Gobierno apeló a las importaciones de más de 9.6 millones de toneladas de alimentos, además del uso intensivo de fertilizantes sintéticos, plaguicidas y herbicidas que degradan progresivamente el potencial productivo y fomentan un ambiente cíclico vicioso, con riesgos asociados a una inadecuada utilización. (El Diario, 2022)

El tomate es una hortaliza valiosa, por su contenido nutricional y es de consumo masivo a nivel mundial. Se ha determinado que la producción de tomate en Bolivia, según datos del Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras tienen rendimientos bajos por diversas causas como ser factores bióticos (insectos, hongos, bacterias y virus) y abióticos, desencadenando el uso indiscriminado de plaguicidas y/o fertilizantes generando incrementos en el costo de producción y pérdidas económicas.

En Bolivia, la actividad agrícola tiene como principal herramienta de trabajo el uso de plaguicidas, sin importar los efectos negativos que estos puedan causar a la salud y el medio ambiente, por lo que se vienen utilizando alrededor de 15.000 toneladas de plaguicidas al año, sin tomar en cuenta la cantidad que ingresa mediante el contrabando. Eso significa que a cada habitante le corresponden aproximadamente 2 kg de plaguicidas por año y debido a las malas prácticas en el uso y manejo de plaguicidas, existe el riesgo potencial de ocasionar daños irreversibles en la salud de los agricultores y consumidores junto con sus connotaciones ambientales. (Baudoin, y otros, 2017)

Una de las más importantes plagas que afecta al cultivo del tomate en Bolivia, es el tizón tardío producido por el hongo *Phytophthora* spp., una amenaza persistente para la producción de tomate en todo el mundo ocasionando la marchitez y muerte de la planta. A pesar de la aplicación de Metalaxyl, Clorotalonil, Mancozeb, Cymoxanil, etc. no se ha obtenido un control adecuado de esta plaga, incidiendo en pérdidas económicas importantes para el productor y finalmente la economía boliviana, que se ve afectada por la introducción de tomate peruano, mediante el contrabando, para la provisión a la zona andina (La Paz, Oruro y Potosí). (López Marín, 2016)

### **A. Justificación**

El presente estudio ha establecido un bioproceso para la obtención de un filtrado bioactivo a través de la inmovilización de células de *Bacillus* sp. el cual se ha visto que tiene una efectividad óptima sobre la inhibición del crecimiento de *Phytophthora* sp. un patógeno que afecta al cultivo del tomate, afectando la producción de más del 50% del producto llevando a que los agricultores busquen estrategias para mejorar la producción utilizando en muchos casos, la combinación de hasta más de cinco fertilizantes y/o plaguicidas químicos, sin considerar los potenciales efectos adversos para la salud y el medio ambiente.

Por esta razón se ve pertinente plantear la utilización de este filtrado bioactivo en procesos de control de fitopatógenos, ya que el impacto ambiental que genera del uso de agroquímicos en cultivos agrícolas es de gran relevancia, al ver que los pesticidas y fertilizantes sintéticos a menudo contienen sustancias químicas tóxicas, que pueden



contaminar el suelo y los recursos hídricos, así mismo son perjudiciales para la fauna y la flora silvestre aumentando la preocupación por la sostenibilidad ambiental; de esta forma los filtrados bioactivos, obtenidos con células inmovilizadas de *Bacillus* sp., al ser un producto no tóxico puede ayudar a reducir significativamente la contaminación de estos recursos esenciales, esto tiene un valor económico significativo a largo plazo ya que se pueden evitar costos relacionados con la restauración de ecosistemas dañados al crear un entorno más saludable para la biodiversidad y contribuir a la mitigación del cambio climático.

Así mismo el daño que en la salud del agricultor y el consumidor que puede generar el uso de agroquímicos en cultivos agrícolas es de suma importancia debido que la exposición crónica a estos productos químicos aumenta el riesgo de problemas respiratorios para los agricultores y las comunidades cercanas. También residuos de agroquímicos pueden persistir en los cultivos y alimentos, lo que plantea riesgos para la salud humana lo cual puede estar relacionada con enfermedades como el cáncer, trastornos endocrinos, problemas neurológicos y más. Por lo cual con la utilización de este filtrado bioactivo al no presentar genotoxicidad y poseer buena actividad inhibitoria se considera un producto que puede tener un impacto positivo en la salud al reducir la exposición a agroquímicos y de esta forma promover una alimentación más segura tanto para los agricultores como para los consumidores.

El impacto socio – económico que tendría la producción y el uso de este filtrado bioactivo obtenido con células de *Bacillus* sp. inmovilizados, en lugar de agroquímicos y/o fertilizantes químicos importados para cultivos agrícolas es de gran relevancia, ya que la producción de este filtrado reduce la dependencia a los agroquímicos importados, y da un valor agregado a la papa imilla de producción nacional al ser la materia prima del medio de cultivo para la producción de este filtrado. Los costos de producción de este filtrado son bajos comparándolos con los precios de los agroquímicos importados los cuales son en dólares, lo que se traduce en un ahorro económico para los agricultores y en última instancia, para los consumidores. Esto mejora la seguridad alimentaria del país al garantizar que los agricultores tengan acceso a los productos necesarios para mantener e incrementar la producción de alimentos. Del mismo modo, la adopción de métodos más

sostenibles de producción de alimentos, como el uso de este bioinsumo, podría abrir puertas a los mercados internacionales que buscan productos agrícolas respetuosos con el medio ambiente. Lo que puede resultar en un aumento de las exportaciones agrícolas y traer beneficios económicos adicionales al país.

En consecuencia, a partir de la investigación y conclusiones de la tesis, este trabajo puede servir como punto de partida para futuros estudios que amplíen y profundicen en el tema. Lo que puede resultar en colaboraciones académicas que apoyen a efectuar de la producción a mayor escala del filtrado bioactivo, lo que podría resultar en proyectos y avances adicionales.

La pregunta de investigación que se plantea es: ¿Cuál es la actividad biológica inhibitoria de filtrados producidos por cultivos de *Bacillus* sp. inmovilizados para el control de *Phytophthora* sp.?

## **B. Objetivos**

### **a. Objetivo general**

Evaluar la actividad biológica inhibitoria de filtrados producidos por cultivos de *Bacillus* sp. inmovilizados en agar-agar para el control de *Phytophthora* sp. patógeno foliar del tomate.

### **b. Objetivos específicos**

1. Determinar la actividad biológica inhibitoria de la cepa de *Bacillus* sp. contra *Phytophthora* sp.
2. Determinar las condiciones de producción de filtrados de *Bacillus* sp. inmovilizados en cuanto a la actividad biológica inhibitoria de *Phytophthora* sp.
3. Evaluar la toxicidad de los filtrados obtenidos con *Bacillus* sp. inmovilizados.

## **II. Diseño teórico**

### **A. Marco referencial**

#### **1. Antecedentes generales sobre el problema en estudio**

La seguridad alimentaria y el suministro mundial de alimentos depende en gran medida de la producción agrícola, las pérdidas de alimentos por concepto de plagas provocan

enormes perjuicios a la economía. (Quintero-Domínguez, Ríos Rodríguez, Quintana Sánchez, & León Ávila, 2019)

En Bolivia el sector agropecuario desempeña un rol muy importante en la producción de alimentos viéndose afectada la economía nacional al presentar pérdidas por enfermedades causadas por patógenos. (UDAPE, 2005)

El género *Phytophthora* en la actualidad está catalogada entre las peores enfermedades destructivas en muchos cultivos y ecosistemas forestales económicamente importantes. Las estrategias de control para las enfermedades de *Phytophthora* son muy limitadas lo que lo lleva a ser una amenaza persistente para la producción de tomate en todo el mundo, causando la enfermedad conocida como tizón tardío. (Ruiz-Chután, Berdúo-Sandoval, & Sánchez-Pérez, 2018)

En el control de las enfermedades de los cultivos agrícolas se ha visto un uso excesivo de agroquímicos induciendo a generar mecanismos de resistencia por parte de estos microorganismos y daños al medio ambiente. El control biológico aparece como una alternativa definida como: "el conjunto de mecanismos de aprovechamiento de las reacciones metabólicas, bioquímicas, mecánicas y/o físicas de los microorganismos nativos específicos de un ambiente, capaces de ejercer articulada o individualmente la inhibición de un patógeno sin alterar el equilibrio ecológico". (Castañeda Alvarez & Consuelo Sánchez, 2016)

Trabajos realizados con la producción de filtrados bacterianos de *Bacillus* sp. con actividad biológica inhibitoria presentaron altos porcentajes de inhibición frente a *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., y *Neopestalotiopsis* en cultivos de mango. Pero la producción de este filtrado en condición de laboratorio era bastante costosa. Por esta razón lo que se pretende hacer es producir un filtrado biológicamente activo que inhiba el desarrollo de tizón tardío y de esta manera contar con un bioinsumo no tóxico y amigable con el medio ambiente. (Mamani Mamani, 2018)

## **2. Descripción del ámbito de estudio**

La actividad agrícola es el principal medio de vida de las comunidades en Bolivia y es la base de la alimentación de millones de bolivianos. Sin embargo, la calidad de los

alimentos se ve afectada por diferentes plagas y enfermedades. Por ello, se recurre al uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura, principalmente en el cultivo del tomate, involucra una serie de riesgos de contaminación en los agricultores, en los recursos suelo, agua, microflora, flora y fauna y de los alimentos destinados al consumo de la población. (Ruiz-Chután, Berdúo-Sandoval, & Sánchez-Pérez, 2018) Por ello se tiene la necesidad de la búsqueda y el desarrollo de alternativas como los bioplaguicidas, mediante es uso de microorganismos por su capacidad de producir antibióticos extracelulares, toxinas, enzimas líticas y lipopéptidos antimicrobianos que ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana y antiviral. Además, son capaces de activar mecanismos de resistencia inducida en la planta que benefician el desarrollo de la planta por medio de varios mecanismos, como aumentar la disponibilidad de nutrientes, producir hormonas vegetales o bioestimulantes, entre otras aplicaciones biotecnológicas. (Silva Guachamín , 2018)

El presente trabajo de investigación contribuirá como línea base en esta área de investigación, al evaluar filtrados bacterianos contra el crecimiento de *Phytophthora sp.*

## B. Marco teórico

### 1. El Cultivo de tomate a nivel mundial

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es un cultivo popular que se siembra en el mundo, pertenece a la familia *Solanaceae* y es originario la región Andina, desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile. (Monge Pérez & Loría Coto, 2021) Es una planta dicotiledónea y herbácea perenne de porte arbustivo, se cultiva de forma anual para el consumo de sus frutos, caracterizado por ser un cultivo de clima cálido, pero se adapta muy bien a climas templados. (López Marín, 2016)



**Figura 1.** Características de la planta del tomate. Adaptado de “Manual Técnico Del Cultivo De Tomate (*Solanum lycopersicum*)”, López, L., 2016, p 14, INTA.

➤ **Aporte nutricional**

Esta hortaliza contiene carotenoides ( $\beta$  carotenos, licopenos) vitamina C, Calcio y fósforo entre otros minerales, importantes todos estos para la salud humana. Los tomates producen una hormona gaseosa llamada etileno por esta razón es una fruta climatérica ya que después de cosecharlo puede seguir madurando. (Baudoin, y otros, 2017)

Tienen un alto contenido de agua alrededor del 95% el restante se compone de carbohidratos y fibra. Los carbohidratos comprenden el 4% de los tomates crudos, donde el 70% de este contenido lo constituyen los azúcares simples, como la glucosa, la fructosa y trazas de sacarosa que constituyen 53-65% de los sólidos solubles. Por otro lado, son una buena fuente de fibra, la mayoría son insolubles en forma de hemicelulosa, celulosa y lignina. Y también son una buena fuente de vitaminas y minerales, posee alrededor del 28 - 40% de Vitamina C la cual es un gran antioxidante. Además, contiene vitamina K que ayuda a la coagulación de la sangre y la salud de los huesos. (Camino Torres, 2022)

**Tabla 1.** Contenido nutricional en 100 g de tomate convencional

Nutrientes	Cantidad
Calorías	18
Agua	95%
Proteínas	0,9 g
Carbohidratos	3,9 g
Azúcar	2.6 g
Fibra	1,2 g
Grasa	0,2 g
Sodio	5 mg
Ceniza	0,5 g
Vitamina C	12,5 mg
Vitamina K	7,2 mcg
Vitamina A	42 mcg

**Fuente:** Adaptado de “Análisis comparativo nutricional del tomate (*Solanum lycopersicum*) y mora (*Rubus ulmifolius*) de origen orgánico y agroquímico” (Camino Torres, 2022) (Bjarnadottir, 2019) (Cervoni, 2021).

Los tomates contienen compuestos vegetales como el licopeno alrededor del 80-90% el cual es el carotenoide más abundante en este fruto lo cual produce un pigmento rojo que posee cualidades antioxidantes, produciendo efectos beneficiosos para la salud.

Los tomates contienen alrededor de 5-10% de  $\beta$  carotenos, el cual es un antioxidante que otorga a los alimentos un color amarillo o naranja, siendo los precursores de la vitamina A y junto a la vitamina C protegen contra agente generadores de radicales libres. En tanto el licopeno, actúa disminuyendo la oxidación del colesterol de baja densidad, reduciendo el riesgo de contraer enfermedades cardíacas. (Bonfiglio Caprile & Hernández, 2013)

### ➤ **Importancia económica**

El cultivo de tomate es una de las hortalizas de gran importancia debido a su alta demanda a nivel industrial y por su valor nutricional, por lo tanto, la producción mundial ha incrementado en los últimos años, (Martínez-Ruiz, y otros, 2016) teniendo producción mundial de tomate aproximada del 75 % destinado al consumo en fresco, mientras que el 25 % restante destinada a la industria (elaboración de pasta concentrada, salsas y tomate pelado, rebanado y deshidratado) (Bayomi, Asharf, Saad, & Al-Kady, 2020)

## **2. Producción y consumo de tomate en Bolivia**

En ocho departamentos de Bolivia se cultiva tomate (a excepción de Oruro) siendo Santa Cruz y Cochabamba, los de mayor producción. Según datos del INE la producción de tomate entre los años 2020 - 2021 fueron de 73.515 toneladas y la importación del mismo alcanzó a 7.590 toneladas, es decir que se importó 10,38% de lo que se consume. (Ariza & Sánchez , 2012)

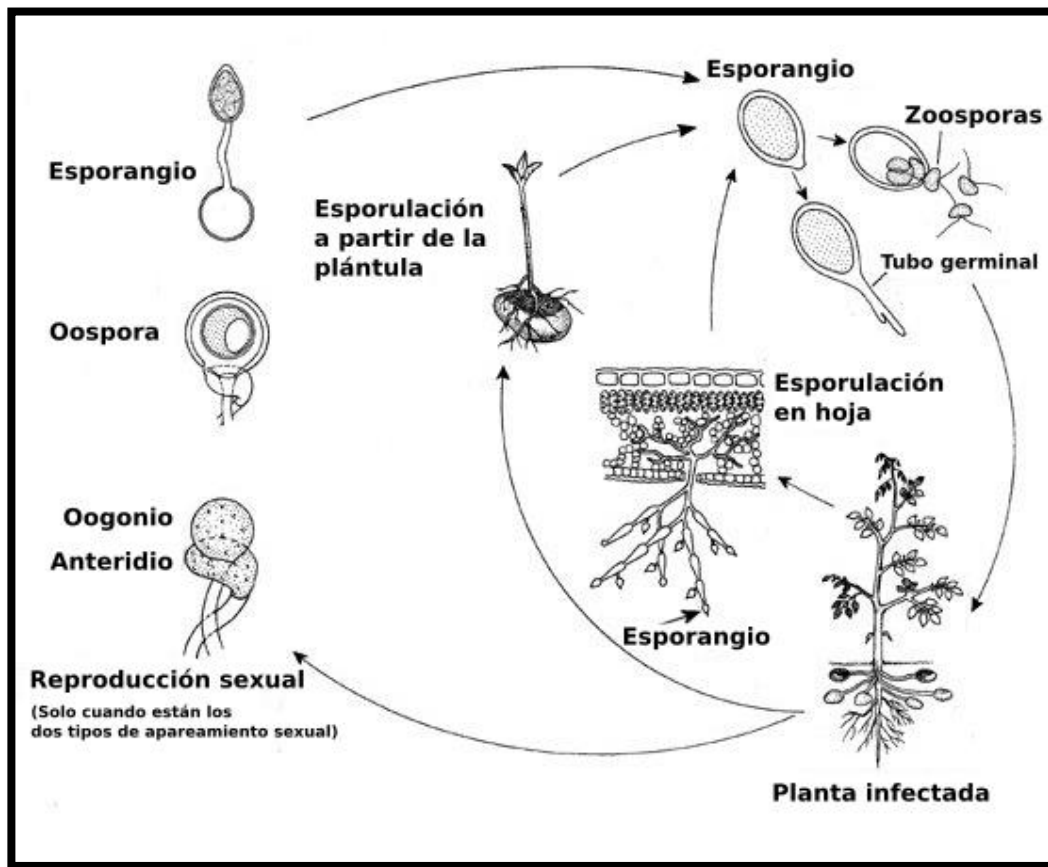
## **3. Enfermedades causadas por hongos en tomate**

El cultivo de tomate se ve afectado por causas abióticas y bióticas, presentando enfermedades debido a falta de nutrientes, desequilibrios hídricos, cambios en el medio ambiente, por agentes patógenos como: insectos, hongos, bacterias y virus. La enfermedad foliar más común en épocas poco lluviosas en zonas productoras es el tizón temprano causado por *Alternaria solani*, aunque la que afecta en la época lluviosa es el tizón tardío provocado por *Phytophthora infestans*; la marchitez fungosa es ocasionado por

*Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum* f. sp., el mildiu polvoso o cenicilla ocasionado por *Leveillula taurica*, *Erysiphe orontii* y *Oidium lycopersicum* y la Antracnosis o podredumbre negra ocasionado por *Colletotrichum coccodes*, *C. gloesporioides* y otras especies. (López Marín, 2016)

➤ **Tizón tardío y agente causal**

El Tizón Tardío es una enfermedad del follaje común en tomate de invernadero, el agente causal es *Phytophthora infestans*. La sintomatología (figura 3) se manifiesta a través de manchas con una coloración castaña las cuales están rodeadas por un margen claro que puede aparecer en las hojas, tallos y frutos lo cual deseca y muere rápidamente la planta.



**Figura 2** Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*. Adaptado de “La biología detrás del patógeno causante del tizón tardío”, Schumann & D’Arcy, 2000, USA Blight.

*P. infestans* infecta y se reproduce en la parte aérea de su hospedante. Se caracteriza por ser heterotálico, producir esporangios (estructura donde se encuentran las esporas) y esporas asexuales (zoosporas) a partir de la diferenciación de su micelio vegetativo.

Las condiciones predisponentes para su infección son temperaturas cercanas a los 20 °C y humedad relativa sobre 75 %. Cuando se presentan temperaturas más cálidas, es posible que se inicien nuevas infecciones penetrando directamente en el tejido, afectando la absorción y transporte de agua a la planta de esta manera *Phytophthora* puede generar un taponamiento del xilema produciendo el síntoma clásico de marchitamiento (Figura 3). (Martínez-Ruiz, y otros, 2016).



**Figura 3** Signos de infección por hongo *Phytophthora infestans* en fruto y tallo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Recuperado de “Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico”, 2016, p7870, *European Scientific Journal*.

#### **4. Generalidades del control de plagas y enfermedades**

Para el manejo sostenible de plagas y enfermedades se busca aplicar un conjunto de prácticas integrales a los cultivos que tienen como propósito mantener la población de insectos y microorganismos en un nivel que no sea perjudicial para los agro-ecosistemas productivos. El conjunto de prácticas integrales incluye, la remoción y destrucción manual, plantas trampa, cambios de temperatura bruscos para reducir el metabolismo de insectos, control biológico, repelentes y químicos. (Baudoin, y otros, 2017)

##### **➤ Uso de agroquímicos en la agricultura**






La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a un agroquímico como la sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir la acción o destruir directamente insectos, ácaros, moluscos, roedores, hongos, malezas bacterias y otras formas de vida animal o vegetal que son perjudiciales a la salud pública y también a la agricultura.



El control químico de plagas consiste en atenuar, evitar o prevenir el crecimiento de sus poblaciones en cultivos mediante el uso de sustancias químicas; como el uso de pesticidas. Además, las aplicaciones continuas de productos tóxicos plantean riesgos severos a la salud de los operarios agrícolas y de los consumidores, así como graves problemas de contaminación de suelos y aguas. ( Chirinos, y otros, 2020)

Siendo estos compuestos un variado conjunto de moléculas que se clasifican en grupos según su estructura química. Entre las tres familias más importantes tenemos a los organoclorados (clorocarbonados), los organofosfatos y los carbamatos.

**Tabla 2.** Clasificación toxicológica de ingredientes activos según criterios de la OMS.

Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación de peligro	Banda
Ia Sumamente peligroso	MUY TÓXICO	
Ib Muy peligroso	TÓXICO	
II Moderadamente peligroso	NOCIVO	
III Poco peligroso	CUIDADO	
IV Producto que normalmente no ofrece peligro	Precaución	

**Fuente:** Adaptado de “Prevención de Riesgos en el Uso de Plaguicidas” Soissa, H. y otros, 2005.

De acuerdo a la OMS, a nivel mundial se emplean más de 1000 sustancias de uso agrícola con el fin de proteger los cultivos frente a plagas. En los últimos 20 años, el uso de productos químicos de uso agrícola (PQUAs) ha incrementado significativamente en muchos países en vías de desarrollo, donde su uso y manejo inadecuados se constituyen

en un riesgo para la sostenibilidad de los sistemas alimentarios (Soissa Stephens, Maige, Molinos Beltran, & Aguayo González, 2005).

En Bolivia, el uso indiscriminado de plaguicidas en cultivos de tomate, involucra una serie de riesgos de contaminación de los suelos, agua, microflora, flora y fauna y de los alimentos destinados al consumo de la población. Siendo que en el país se importan principalmente herbicidas (37%) insecticidas (32%), y fungicidas (31%) (Bascopé Zanabria, Bickel, & Jacobi, 2019). El Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG) le faculta el control de insumos utilizados en la producción agropecuaria, agroindustrial y forestal, a través de las cuales se crean Resoluciones Administrativas, para regular los registros y controles de plaguicidas químicos de uso agrícola, sin embargo, no se cuenta con un manual de procedimientos internos para los controles de calidad de estos productos.

En investigaciones se expresa que, al tener limitaciones en la producción de tomate por el ataque de plagas, los productores aplican indiscriminadamente productos químicos, llegando en algunas zonas al abandono del cultivo, debido a la pérdida de rentabilidad. Detectando un total de 45 aplicaciones por ciclo de cultivo, lo que es muy superior a lo recomendado teniendo referencias de que el uso indiscriminado de plaguicidas está entre el rango de 21 a 31 aplicaciones realizadas por ciclo de cultivo, por lo cual probablemente esté acentuando los problemas fitosanitarios, así como en salud humana y ambiental (Chirinos, y otros, 2020).

Los plaguicidas que entran al país por medio del contrabando tienen un peso importante en el mercado nacional; y a pesar del riesgo de que sean falsos, adulterados, mezclados o caducados, son ampliamente consumidos. Es así que 2019, el SENASAG decomisó 400 litros de productos vencidos, fraccionados y sin registro sanitario. Además, una investigación de 2013 encontró residuos de plaguicidas organofosforados en cultivos de tomates por encima de los límites permisibles en dos municipios distintos de los departamentos de Cochabamba y Chuquisaca. En este mismo sentido, otro estudio sobre residuos de plaguicidas en vegetales de Bolivia halló que en el 50 % de muestras de

lechugas obtenidas en mercados y supermercados de la ciudad de La Paz se encontraron restos de cipermetrin, clorpirifos, difenoconazol y lambda-cihalotrin, principales ingredientes activos en distintos fungicidas e insecticidas. Por último, un sondeo llevado a cabo en un hospital de la ciudad de El Alto encontró residuos de plaguicidas organoclorados en la leche materna de 62 mujeres, de un total de 112. (Tunupa, 2021)

### **5. *Bacillus* sp. como agente de control biológico**

El control biológico a través de la mediación de cualquier otro organismo, disminuye la incidencia de la enfermedad. (Fernández Calle, 2018)

El género de *Bacillus*, pertenece a la familia *Bacillaceae* que comprende a las bacterias en forma de bastones o formas variables que forman endoesporas, a estas también se las conoce como bacilos Gram positivas formadoras de esporas. Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, donde su crecimiento óptimo se da a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, a su vez es conocida por su diversa capacidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Villarreal-Delgado, y otros, 2018).

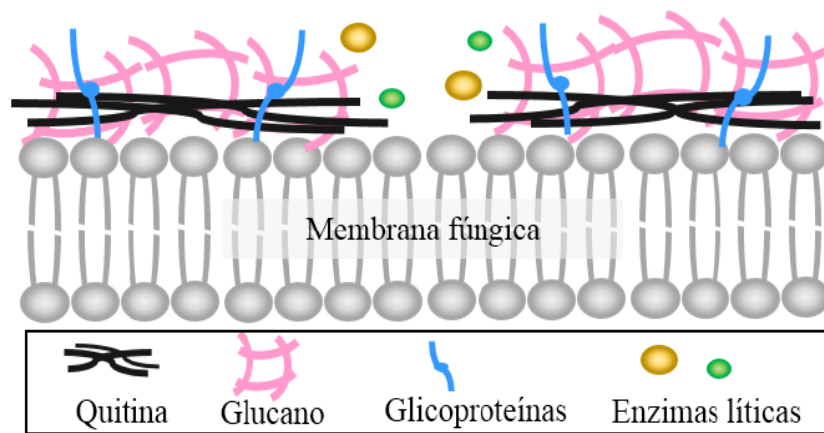
#### **➤ Mecanismos de antibiosis**

El género *Bacillus* ha demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros. (Li Y, 2015)

Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen A) la excreción de antibióticos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) toxinas y E) induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS). (Villarreal-Delgado, y otros, 2018)

**- Enzimas**

*Bacillus spp.* tiene una gran capacidad de expresión y secreción de proteínas, lo que ha llevado a su amplio uso en la producción de preparados de enzimas industriales. La síntesis y producción de estas se ve influenciada por los organismos con los cuales interactúan las bacterias. Debido a la composición química de la membrana del patógeno, se dará la producción de diferentes enzimas como: quitinasas, xilanasas, celulasas y proteasas que interactuar como inhibidores con la membrana, provocando daños irremediables como lisis celular (Figura 4).

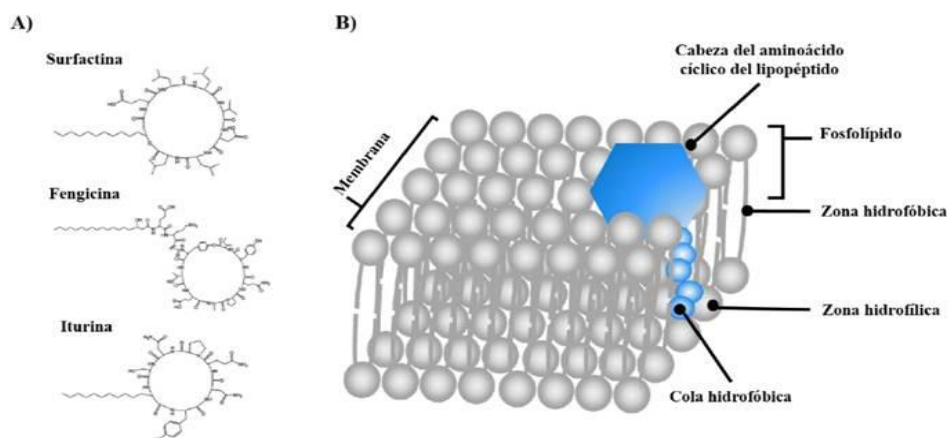


**Figura 4** Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas. Recuperado de “Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*”, 2018, p 25, *ELSEVIER*.

**- Lipopéptidos**

Los lipopéptidos (LPs) producidos por *Bacillus spp.* tienen una estructura que consiste en una cola lipídica unida a un oligopéptido cíclico y son sintetizados por complejos multienzimáticos no ribosomales del microorganismo. En base a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, se los clasifica en tres familias: Surfactinas, Fengicinas e Iturinas. (Figura 5). (Villegas-Escobar, y otros, 2018)

La actividad antimicrobiana de estos LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Figura 5-B). (Villarreal-Delgado, y otros, 2018)



**Figura 5** Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) Mecanismo de acción de los lipopéptidos. Recuperado de “Lipopeptides from *Bacillus sp.* EA-CB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*”, 2018, p 25, *ELSEVIER*.

## 6. Estrategias de cultivos en bioprocesos

### ➤ Cultivos de células libres vs células inmovilizadas

La inmovilización celular se trata de la restricción de la movilidad celular por medios químicos o físicos. Las ventajas en comparación con las células libres son: proporcionar alta biomasa, reutilización celular, alta resistencia mecánica, mejorar la estabilidad genética. y eliminar los problemas de lavado celular. (Zhien , Muftah , & Zineb , 2018)

Tiene varias ventajas sobre el cultivo de células frescas procedentes de los puntos de vista de la separación del producto, re-uso de biocatalizadores, la prevención de lavado, reducción del riesgo de contaminación y estabilidad operacional La alta densidad de células microbianas en perlas hace más eficientes para mostrar la actividad enzimática y la productividad bajo específico y entorno controlado. En comparación con varios tipos de inmovilización, el encapsulamiento celular con alginato de calcio, agar, carragenina o gelatina es un método de atrapamiento fácil, no tóxico y de bajo costo.

### ➤ La inmovilización como herramienta de optimización en la bioproducción

La inmovilización de microorganismos ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento y aplicación de procesos en la biotecnología. Actualmente las células microbianas están inmovilizadas para producir una serie de productos como enzimas y antibióticos, la inmovilización de células microbianas en los

procesos biológicos puede ocurrir ya sea de forma natural o a través de un proceso artificial. Se tiene muchos métodos para inmovilizar como adsorción, unión covalente, reticulación, atrapamiento y la encapsulación en gel polimérico hidrofílico de alto peso molecular tal como alginato, carragenano, agarosa, poliacrilamida, poliéster, poliestireno y poliuretano, los cuales deben cumplir ciertos parámetros adherencia amplia, buena porosidad que permita el intercambio constante de sustratos, productos, etc.; buena estabilidad química, biológica, mecánica y térmica, así como ser resistente a enzimas, solventes o cambios de presión. (Garzón Jiménez & Barragán Huerta, 2008)

### **III. Hipótesis de investigación**

**Hipótesis nula:** Los Filtrado bioactivos producidos con *Bacillus sp.* inmovilizados en agar - agar poseen actividad inhibitoria en un porcentaje mayor al 60% contra el desarrollo de micelio de *Phytophthora sp.*

**Hipótesis alterna:** Los Filtrados bioactivos producidos con *Bacillus sp.* inmovilizados en agar - agar no poseen actividad inhibitoria contra el desarrollo de micelio de *Phytophthora sp.*

IV. Matriz de marco lógico

OBJETIVO	ACTIVIDADES	INDICADORES	FUENTE DE DATOS	BASE DE REFERENCIA	RESULTADOS
<p><b>Objetivo general:</b> Evaluar la actividad biológica inhibitoria de filtrados producidos por cultivos de <i>Bacillus</i> sp. inmovilizados en agar-agar para el control de <i>Phytophthora</i> sp. patógeno foliar del tomate.</p>	<p>Evaluar la actividad biológica inhibitoria de filtrados producidos por cultivos de <i>Bacillus</i> sp. inmovilizados en agar-agar</p>	<p>Porcentaje de inhibición mayor al 60 %</p>	<p>Medición de diámetro de desarrollo del patógeno</p>	<p>Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico</p>	<p>Inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp.</p>
<p><b>Objetivo específico 1:</b> Determinar la actividad biológica inhibitoria de la cepa de <i>Bacillus</i> sp. contra <i>Phytophthora</i> sp.</p>	<p>Activar la cepa <i>Bacillus</i> sp. cepa YHPJ</p>	<p>Crecimiento bacteriano</p>	<p>Colonias y morfología de bacterias</p>	<p>Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico</p>	<p>Colonias blanquecinas y bacilos Gram positivos con esporas</p>
	<p>Aislar patógeno <i>Phytophthora</i> sp.</p>	<p>Crecimiento del micelio exentico</p>	<p>Desarrollo de micelio y morfología microscópica</p>	<p>Artículos publicados en revistas virtuales</p>	<p>Micelio blanquecino ralo y esporas características</p>

	Enfrentar cepa de <i>Bacillus sp.</i> Metabólicamente activa contra <i>Phytophthora sp.</i>	Porcentaje de inhibición mayor al 60 %	Medición de diámetro de desarrollo del patógeno	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora sp.</i>
<b>Objetivo específico 2:</b> Determinar las condiciones de producción de filtrados de <i>Bacillus sp.</i> inmovilizados en cuanto a la actividad biológica inhibitoria de <i>Phytophthora sp.</i>	Inmovilizar la cepa de <i>Bacillus sp.</i>	Microorganismo inmovilizado en agar	Consistencia de la capsula	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Capsulas de agar con microorganismo
	Determinar de la viabilidad de <i>Bacillus</i> encapsuladas	Viabilidad de la cepa	Crecimiento de células obtenidas de las capsulas en PDA	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Presencia o ausencia de células
	<i>Bacillus sp.</i> encapsulados para una óptima producción de metabolitos y su reutilización	Inmovilización, % de inhibición	Medición de diámetro de desarrollo del patógeno	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Filtrados inhiben el crecimiento del patógeno
	Evaluar el Tiempo de incubación de <i>Bacillus sp.</i> encapsulados para una	Tiempo de incubación y % de inhibición	Medición de diámetro de desarrollo del patógeno	Artículos publicados en revistas virtuales	Inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora sp.</i> mayor al 60%



	óptima producción de metabolitos				
	Evaluar la condiciones de agitación o no agitación de <i>Bacillus</i> sp. encapsulados	condiciones de agitación y % de inhibición	Medición de diámetro de desarrollo del patógeno	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp. mayor al 60%
<b>Objetivo específico 3:</b> Evaluar la toxicidad de los filtrados obtenidos con <i>Bacillus</i> sp. inmovilizados.	Germinación de semillas de tomate con diferentes concentraciones del filtrado	%de germinación	Contabilización de semillas germinadas	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Aumento de semillas germinadas con los filtrados
	Efecto genotóxico mediante método de test de Ames con <i>S. typhimurium</i> TA98 y TA100	Índice de mutación	Cantidad de colonias revertantes	Artículos publicados en revistas virtuales, Google académico	Índice de mutación menor a 2 no es genotóxico

## **V. Diseño metodológico**

### **A. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación**

#### **a. Población en estudio**

La población en estudio es *Bacillus* con posible actividad biológica, cepa aislada de hojas de plátano (*Musa × paradisiaca*) provenientes de La Plazuela – Irupana (Mamani Mamani, 2018). Se utilizó a *Phytophthora* sp. como modelo de agente Fitopatológico fúngico (cepa caracterizada como agente causal de Tizón tardío)

#### **b. Ámbito de estudio**

El estudio se desarrolló en el Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas en la unidad de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

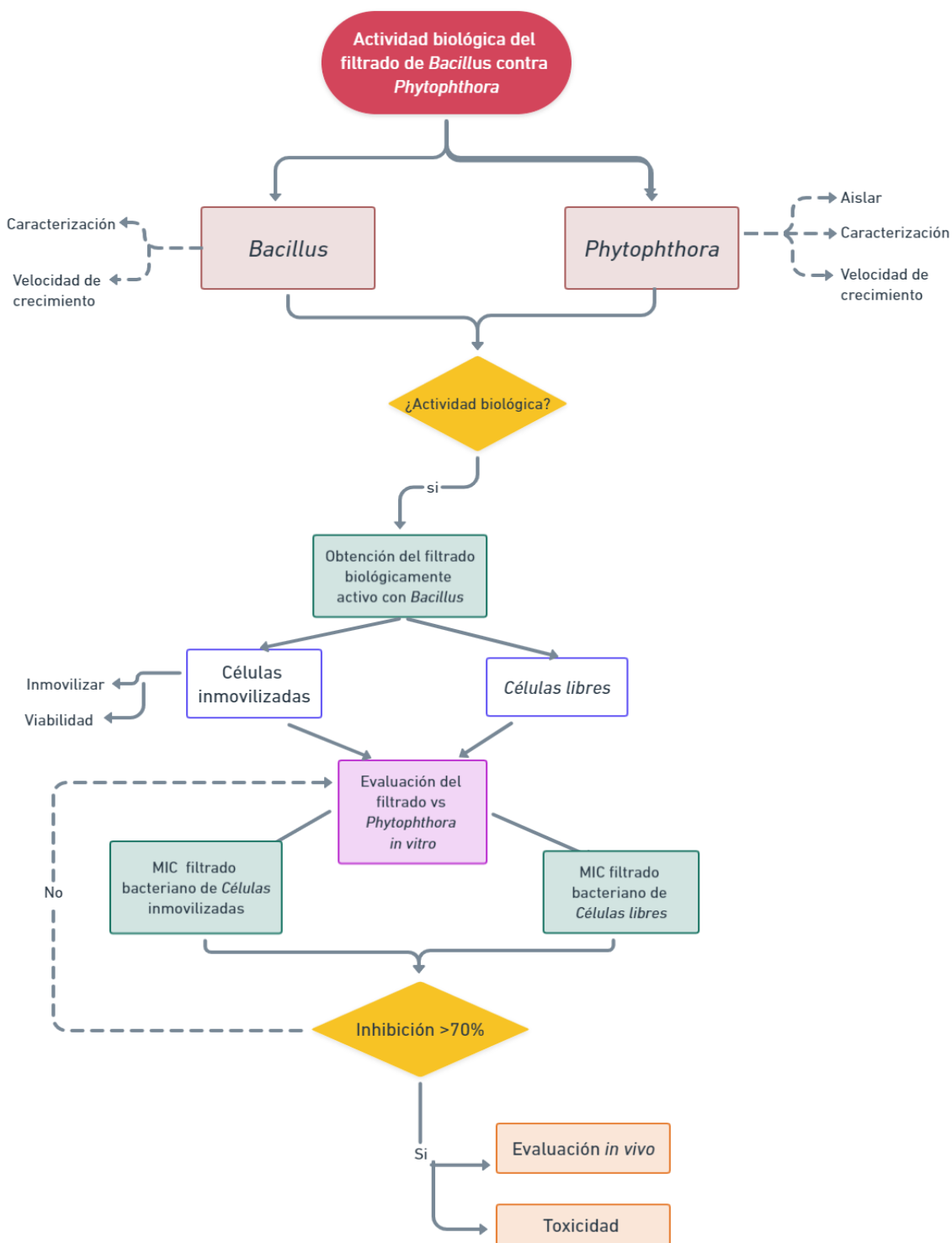
#### **c. Periodo de investigación**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el periodo de 2021-2022.

### **B. Tipo de investigación**

Investigación experimental.

C. Materiales, métodos, técnicas y procedimientos



Fuente: Elaboración propia

**1. Determinación de la actividad biológica inhibitoria de la cepa de *Bacillus* sp. contra Fitopatógeno fúngico *Phytophthora* sp.**

➤ **Material biológico:**

• **Activación de *Bacillus* sp.**

Se activó la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ conservada a -20 °C del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, a través de la inoculación en caldo nutritivo e incubación a  $28 \pm 2$  °C durante tres días. Posteriormente, a partir de este saturado se inoculó en agar papa dextrosa PDA (Anexo 1) (Salgado, 2015), para los posteriores experimentos.

• **Aislamiento de los patógenos del tomate.**

Se recolectaron muestras de hojas y tallos de tomate del centro experimental de Patacamaya de la facultad de agronomía que presentaron signos de la enfermedad del tizón tardío. Estas muestras fueron colectadas en sobres manila, los cuales se codificaron y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las muestras de hojas y tallos fueron inicialmente lavadas con agua corriente, seguidamente se sumergió durante 1 min en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Posteriormente, fueron sumergidas en una solución de etanol al 70% por 1 min. Se procedió al secado de las muestras sobre papel absorbente (toalla de papel). Una vez secas las muestras, se tomaron 2 porciones de muestra de  $5 \pm 1$  mm<sup>2</sup> que presentaron la lesión típica de la infección en el tejido vegetal y posteriormente se colocaron en una caja Petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a  $28 \pm 2$ °C durante 15 días y cada 24 horas se observó el crecimiento de micelios para realizar la resiembra de tal forma que una vez observado la presencia de micelio se procedió a seleccionar y tomar una conidia la cual se transfirió a una nueva caja Petri con PDA donde se realizó el repique. Las cajas se rotularon y se colocaron a incubación en condiciones asépticas a  $28 \pm 2$ °C durante 15 días, al cabo de los cuales se obtuvieron cepas puras.

- **Caracterización morfológica:**

- ***Bacillus* sp.**

Transcurrido el tiempo de incubación de la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ en agar PDA, se realizó la identificación morfológica en función a su morfología macroscópica: tamaño, forma, color, borde, superficie y consistencia de colonias y a sus características microscópicas: morfología celular, carácter tintorial y presencia de esporas, mediante la técnica de tinción de Gram, a través de la observación en un microscopio óptico con un aumento de 100X.

- **Caracterización morfológica del Fitopatógeno fúngico *Phytophthora* sp.**

Una vez desarrollados los micelios en agar PDA, se realizó la caracterización macroscópica y se registró diariamente: la coloración y aspecto del micelio, y tipo de crecimiento del micelio. En la identificación microscópica se realizó la técnica de la cinta adhesiva que consiste en adherir una cinta adhesiva transparente sobre la superficie del micelio de la colonia crecida en la caja Petri, y posteriormente colocar la cinta adhesiva sobre un portaobjetos con una gota de azul de metileno para su posterior observación microscópica a 40X, según protocolo descrito por (Mamani Mamani, 2018). Se compararon las imágenes con claves taxonómicas para su identificación. Mediante esta técnica se puede observar las estructuras sin que pierdan la disposición natural y sin perturbar mucho su morfología. Por lo cual se pueden describir: tipo de hifa, tabicaciones miceliales, presencia de esporas, conidios y esporangióforos.

- **Actividad biológica inhibitoria de *Bacillus* sp. YHPJ frente al crecimiento de *Phytophthora* sp.**

Para evaluar la capacidad metabólica de la cepa *Bacillus* sp. YHPJ, se realizó una evaluación preliminar de la actividad biológica mediante enfrentamiento dual. Para lo cual se empleó la técnica de enfrentamiento dual descrita por Sgroy et al., (2009), donde se inoculó en una línea transversal al centro de la placa Petri la cepa de *Bacillus* sp. y posteriormente se sembró a 2.5 cm de distancia un pozo en el agar con micelio del patógeno y se incubó a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 15 días. Los resultados se evaluaron a través de la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno fúngico

*Phytophthora* sp. (descrito en la sección 2) y se seleccionó las colonias cuyo porcentaje de inhibición fue mayor o igual al 50%.

La determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento hifal se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{(DM-DT)}{(DM)} * 100$$

Dónde:

DM: Crecimiento hifal del testigo

DT: Crecimiento hifal del tratamiento

## 2. Determinación de las condiciones de producción de filtrados biológicamente activos de *Bacillus* sp. YHPJ inmovilizados

- **Inmovilización del *Bacillus* sp. YHPJ en Agar - Agar**

Las células frescas de *Bacillus* sp. YHPJ obtenidas de un cultivo puro con 24 a 36 horas de incubación se llevaron a una concentración igual al tubo 1 de la escala de McFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL). Donde a un volumen de 50 mL de solución de agar (3,5%, p/v) se añadió 50 µL de caldo papa dextrosa conteniendo la biomasa bacteriana fresca. La mezcla obtenida, se moldeó gota a gota a través del goteo mediante jeringas de 1 ml sobre una solución de aceite de girasol frío, utilizada como agente de reticulación. Así se atraparon a las células bacterianas en la matriz de agar conjuntamente con el caldo. Finalmente, las perlas obtenidas fueron lavadas con solución salina fisiológica (0,9 % NaCl) estéril para eliminar el exceso de aceite y se secaron con papel absorbente estéril (Zhien , Muftah , & Zineb , 2018). Después se determinó el volumen promedio de las perlas (volumen de una esfera) así mismo la viabilidad y concentración celular en las perlas; para lo cual se llevó a cabo un proceso de solubilización que consistió en adicionar 1 perla al azar en 500 µL de tampón fosfato 0,1 M pH 7,3 en tubos ependorf durante 15 minutos a temperatura ambiente por triplicado, posteriormente se trituro las capsulas de agar y se sometieron a un proceso de homogenización en vórtex por 2 minutos. El procedimiento de homogenización se repitió dos veces, con el fin de liberar las bacterias de su material de encapsulación, y posteriormente se sembraron 100 µL de la suspensión sobre la superficie de placas Petri con medio PDA llevándolos a incubación por 24 horas a 37 °C y

posteriormente se calculó la concentración de microorganismos viables, mediante el método de recuento de placa mente se contabilizaron las colonias aplicando el método oficial de la AOAC 966.23. (Cayra , Dávila, Villalta, & Rosales, 2017)

- **Cultivos en Batch para la obtención de filtrados de cultivo con actividad biológica inhibitoria del crecimiento**

Para la fermentación líquida, se realizó modificaciones al medio caldo papa dextrosa mediante la adición de urea como fuente de nitrógeno (Anexo 2). Esta adición se ajustó de acuerdo a la relación C: N (100:5) para bacterias aerobias.

Se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen efectivo de 100 mL de medio de cultivo modificado. Donde se inoculó a la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colonia) por cada 100 mL de medio de cultivo. Posteriormente se incubó sin agitación y con agitación constante a 120 rpm en un agitador orbital a  $28 \pm 2$  °C durante 24, 30 y 36 horas.

En el caso de la fermentación líquida con *Bacillus* inmovilizados se adecuo a una concentración de 1.8% (v/v) de perlas, por cada 100 mL de medio de cultivo modificado caldo papa dextrosa y se incubó sin agitación y con agitación constante a 120 rpm en un agitador orbital a  $28 \pm 2$ °C por 24, 30 y 36 horas. Para evaluar la actividad inhibitoria, se trabajó con el sobrenadante de los filtrados bacterianos que se obtuvieron mediante filtración a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22  $\mu$ m. El filtrado obtenido se almacenó en viales forrados con papel aluminio y se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta su utilización en la determinación de la actividad biológica inhibitoria.

- **Evaluación *in vitro* de la actividad biológica inhibitoria de filtrados bacterianos**

Cada filtrado bacteriano obtenido por cultivo con células libres e inmovilizadas en condiciones de cultivo con y sin agitación, fue evaluado por su actividad inhibitoria *in vitro* contra *Phytophthora* sp. mediante la técnica de vertido en placa. En este sentido, se prepararon placas Petri del filtrado más medio PDA a diferentes concentraciones (250, 125, 60, 30  $\mu$ L/mL). Se emplearon placas con PDA exento de filtrado como controles negativos y utilizando como control positivo el fungicida químico Ram Caf a una

concentración de 3Kg/ha (ingrediente activo oxiclóruo de cobre). Posteriormente, para evaluar la actividad inhibitoria de crecimiento del filtrado bacteriano sobre el crecimiento de *Phytophthora*, se inocularon 100 µL de esporas del fitopatógeno a una concentración de  $1 \times 10^6$  esp/mL en pozos de 5 mm de diámetro situado al centro de las cajas Petri que contenían el medio PDA más el filtrado bacteriano activo y estas placas así inoculadas fueron incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 15 días.

Posteriormente, se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio, realizando las mediciones del crecimiento del frente hifal en las ocho orientaciones cardinales con ayuda de una regla milimetrada desde el borde del inóculo a la punta del micelio (determinaciones realizadas a los 7 y 15 días de incubación). Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio utilizando la siguiente fórmula: (Mamani Mamani, 2018)

Cálculos:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{(DM-DT)}{(DM)} * 100$$

Dónde:

DM: Crecimiento hifal del testigo

DT: Crecimiento hifal del tratamiento

- **Evaluación *in vivo* de la actividad biológica inhibitoria de filtrados bacterianos**

Se recolectaron plantines de tomate del centro experimental de Patacamaya de la facultad de agronomía, mismos que no presentaron signos de la enfermedad del Tizón tardío. En los plantines de tomate en etapa de floración (etapa vulnerable de infección) se inoculó una solución de esporas del patógeno a una concentración de  $1 \times 10^5$  esp/mL, se emplearon plantines sanos sin infectarlos como controles negativos y utilizando como control positivo plantines infectados con las esporas sin tratarlos con el filtrado. Posteriormente codificados, los plantines se mantuvieron en un ambiente aislado hasta que el patógeno infecte a la planta presentando signos de la enfermedad.



Una vez que la planta presentó signos de la enfermedad se procedió con la aplicación del filtrado bacteriano (obtenido con células inmovilizadas y 30 horas de fermentación) a mediante la aspersión sobre la planta en dos concentraciones diferentes 250 µL/mL y 125 µL/mL, la aplicación se realizó 2 aplicaciones del filtrado uno en cuanto se vio a la planta con los signos de la enfermedad y otro posterior a los 4 días. Se evaluó la incidencia de la enfermedad de las plantas durante 3 meses, a través de la comparación del desarrollo de los plantines expuestos a *Phytophthora* sp. de acuerdo a los tratamientos efectuados y sin tratamiento.

### 3. Evaluación de la toxicidad de los filtrados obtenidos con *Bacillus* sp. inmovilizados.

- **Establecimiento de ensayos ecotóxicos de los filtrados**

Semillas de *Solanum lycopersicum*, variedad de tomate pera (locallito), fueron adquiridas en el Mercado Rodríguez de ciudad de La Paz. Un sustrato (150g) consistente en una relación de 3 partes de tierra, 2 partes de humus y 1 parte de arena, fue colocado en una caja Petri estéril, donde se sembró 25 semillas de tomate. Se establecieron dos periodos de riego con el filtrado bacteriano activo a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 60, 30 µL/mL). Posteriormente a los diez días de experimentación, se contabilizaron las semillas germinadas por cada tratamiento y se calculó la capacidad germinativa utilizando el índice de porcentaje de germinación relativa de semillas (% GRS) de acuerdo con lo reportado por (Pérez Porto & Gardey, 2017), utilizando la siguiente fórmula modificada:

Cálculos:

$$\% \text{ GRS} = \frac{\text{Número de semillas germinadas con el filtrado}}{\text{Número de semillas germinadas en composta}} * 100$$

- **Test de Ames** (Huaman , y otros, 2014)

Para esta prueba se emplearon dos cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100. Se realizaron dos tipos de pruebas, la prueba de mutagenicidad para evaluar el efecto genotóxico del filtrado bacteriano activo, y la prueba de antimutagenicidad para evaluar la posible

inhibición de la mutagenicidad por parte del filtrado bacteriano activo. Ambas pruebas se realizaron siguiendo el protocolo de Marón y Ames (1983).

Primero se realizó el requerimiento de histidina y biotina (his-); para esta técnica se empleó el medio mínimo Vogel Bonner con glucosa, suplementado con biotina para la siembra de las cepas por la técnica de agotamiento. Luego se procedió a la mutación rfa, para esto se mezcló 0,1 mL de cultivo saturado de la cepa TA 98 ó TA 100 con 2 mL de agar blando atemperado a 47 °C, seguidamente se colocó sobre una placa Petri. En un vial estéril se añadió 0,1 mL del filtrado bacteriano a diferentes concentraciones (concentrado, 250 µL/mL y 125 µL/mL) Luego se añadió 0,1 mL del cultivo saturado fresco de las cepas TA 98 y TA 100. Por último, se añadió 0,5 mL de tampón fosfato a pH 7,3 se homogenizo y añadió 2 mL de agar blando previamente suplementado con la solución de trazas de biotina/histidina 0,5 mM. Se incubó a 37° C por 72horas. Se calculó el índice de mutación (IM) y el porcentaje de inhibición de mutagenicidad (%de inhibición), con las siguientes fórmulas:

Cálculos:

$$IM = \frac{\# \text{ de colonias revertantes de cada tratamiento}}{\# \text{ de colonias revertantes del control negativo}}$$

$$\% \text{inhibición} = \left( 1 - \frac{\# \text{ de colonias revertantes del tratamieto sólo mutágeno}}{\# \text{ de colonias revertantes de cada tratamiento}} * 100 \right)$$

(Huaman , y otros, 2014)

#### 4. Determinaciones analíticas

##### ➤ Cinética de crecimiento de *Bacillus* sp.

Los parámetros cinéticos de cepa, se determinaron en condiciones óptimas. Donde se preparó un inoculó de un cultivo fresco de *Bacillus* sp.con asa estéril a una concentración de células equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland, para determinar la cinética de crecimiento en un Erlenmeyer con medio estéril (caldo papa dextrosa) se inoculó 0,1 mL de la muestra por cada 100 ml de medio de cultivo. Posteriormente se incubo en agitación constante a 120 rpm en un agitador orbital a 28° ± 2°C.

Se hizo lectura espectrofotométrica contra blanco del medio de cultivo, a la longitud de Onda calibrada (600nm) en intervalos de 2h hasta completar 25 observaciones. Cada ensayo fue realizado por triplicado. (Castañeda Alvarez & Consuelo Sánchez, 2016)

➤ **Cinética de crecimiento de *Phytophthora* sp.**

Se evaluó el desarrollo de *Phytophthora* sp. en función a la cinética (velocidad) de crecimiento. Para ello, se preparó una suspensión de esporas una concentración equivalente a  $1 \times 10^6$  esp/mL, posteriormente se inoculó 100  $\mu$ L de la suspensión en pozos de 5 mm de diámetro situados al centro de las placas Petri de 18 cm, con medio PDA cloranfenicol. Las placas fueron incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta que el micelio detuviera su crecimiento por contacto con los bordes de la caja Petri. La medición se realizó en las ocho orientaciones cardinales con ayuda de una regla milimetrada desde el borde del inoculo a la punta del micelio en el reverso de la placa de Petri cada 24 horas. El incremento del crecimiento hifal en cm fue graficada en función del tiempo.

➤ **Postulados de Koch**

La prueba de patogenicidad se realizó de acuerdo con los postulados de Koch. Donde se emplearon hojas sanas de tomate variedad locallito, los cuales se desinfectaron con NaClO al 1% por un minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril, continuando la desinfección con etanol al 70% por un minuto, se enjuago nuevamente con agua estéril y luego fueron colocadas sobre papel toalla estéril para su secado. La inoculación se realizó en la superficie de las hojas con esporas del hongo a una concentración de  $1 \times 10^6$  esp/mL. Las hojas inoculadas se colocaron en cajas Petri estériles la cuales internamente estuvieron cubiertas con papel toalla húmeda y se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 15 días. La evaluación se realizó diariamente para detectar el desarrollo de síntomas. Como controles se utilizaron plantas tratadas con agua estéril. (Bell, Ferraz Ramos, Moccellini, & Jacobsen de Farias, 2020)

➤ **Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).**

Para la evaluación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) del medio caldo papa dextrosa se utilizó el método de flujo cerrado, de acuerdo a la norma internacional ISO 6060: 1989 Water Quality Determination of the chemical oxygen demand. Para la mezcla se preparó tubos que contenían:

	Volumen de muestra (mL)	Solución de digestión (mL)	Reactivo de ácido sulfúrico (mL)
<b>Blanco no digerido (H2O destilada)</b>	2,5	1,5	3,5
<b>Blanco digerido (H2O destilada)</b>	2,5	1,5	3,5
<b>Muestra</b>	2,5	1,5	3,5

Cada mezcla posteriormente se homogeneizó con un vortex antes de colocar en el proceso de digestión que se realizó por 2 h a 150°C en el termoblock exceptuando el blanco no digerido. Finalizada la digestión se dejó enfriar a temperatura ambiente. La titulación se realizó con el standard de sulfato ferroso amonio (solución FAS; 0.25M) añadiendo 2 gotas de ferroína como indicador. La solución viró de azul verdoso a café rojizo.

Cálculos se realizaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$DQO(mgO_2/L) = \frac{(A - B) * M * 8000}{mL muestra}$$

Dónde:

A= mL FAS usado para el blanco digerido

B= mL FAS usado para la muestra

M= molaridad del FAS

8000= peso en miliequivalentes de oxígeno\*1000mL/L

$$M = \frac{0,1 * mL Cr_2 * O_7}{mL FAS (BND)}$$

Dónde:

0.1= molaridad de la solución estándar del  $\text{Cr}_2\text{O}_7$

mL  $\text{Cr}_2\text{O}_7$ = 1.5mL

mL FAS (BND)= mL FAS usado para el blanco no digerido

➤ **Determinación de nitrógeno total**

El método Kjeldahl se utiliza para la determinación del contenido de nitrógeno en muestras orgánicas e inorgánicas, es un método oficial y descrito en múltiples normativas: AOAC, USEPA, ISO, DIN, este método consta de tres etapas: digestión, destilación y titulación.

Para realizar la digestión se trabajó en tubos para Kjeldahl en el cual se pesó 1.5 mL de caldo papa a esta solución se le añadió dos catalizadores 0.1 gramos sulfato cúprico pentahidratado y 0.9 gramos sulfato de potasio, por último, se añadió 3 mL de ácido sulfúrico concentrado se homogeneizo suavemente y se dejó incubar en el termoblock a 400 °C por 2 horas. Para llevar a cabo la destilación se adicionó 10 mL de agua destilada a los tubos y se transfirió a la unidad de destilación, seguidamente se ajustó el tubo sobre el soporte del equipo de destilación de Kjeldahl. Luego en un matraz de 200 ml de capacidad, se colocó 25 mL de ácido bórico al 4% y 15 gotas de indicador mixto para Kjeldahl (Rojo de Metilo-Verde de Bromocresol), se colocó el matraz sobre el platillo del equipo, asegurándose que la manguera está sumergida en el matraz. Paso seguido con el dispensador se añadió 10 mL de hidróxido de sodio al 40 %, luego se prendió el equipo a una potencia de 20 para comenzar la destilación. Una vez que se obtuvo un volumen de 100 mL en el matraz se procedió a realizar la titulación a punto final, se empleó HCl al 0.1 N, el pH al cual se llegó fue de 4.8 con un viraje de color de rosa violeta a verde esmeralda, con el volumen gastado se procedió a realizar los cálculos. Donde por cada equivalente de HCl es igual a un equivalente de nitrógeno.

## **D. Procesamiento de datos**

### **1. Recolección**

Los datos fueron tabulados en la base de datos de Excel, para su posterior análisis de acuerdo a cada uno de los experimentos que se realizaron.

### **2. Elaboración**

Se elaboraron tablas y figuras a partir de los datos recolectados en cada experimento realizado durante la investigación, se emplearon los programas estadísticos Microsoft office Excel 2016.

### **3. Análisis**

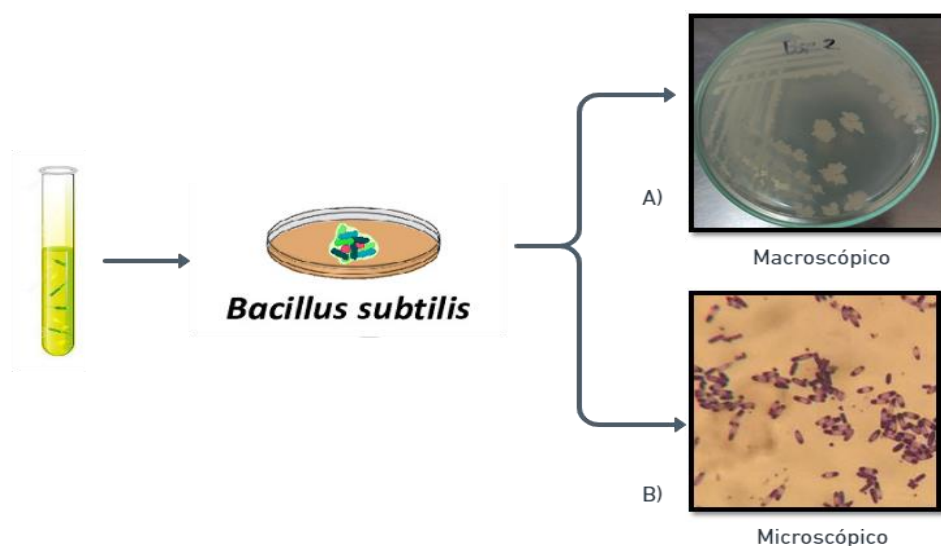
Los datos obtenidos se expresan mediante el uso de diferentes parámetros estadísticos como la media y desviación estándar (media  $\pm$  desviación estándar), y cada experimento se realizó por duplicado ó triplicado. Los resultados se analizaron mediante MANOVA (análisis multivariable) y se determinó su significación ( $p \leq 0,05$ ) mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey con Microsoft Excel 2016 y programa estadístico Statistix.

## VI. Resultados y Discusión

### 1. Activación, aislamiento y caracterización de las cepas

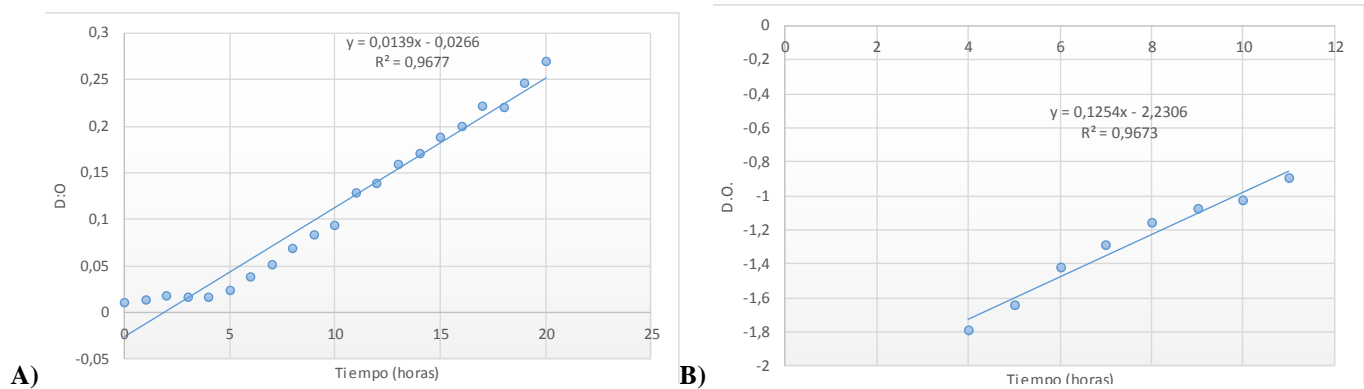
- **Activación e Identificación de *Bacillus* sp.**

La cepa de *Bacillus* sp. YHPJ empleado en la presente investigación fue activada a partir de la colección del cepario del IIFB, aislada e identificada por Mamani Marisel, (2018) a partir de hojas de plátano. La cepa fue reactivada en agar nutritivo y caracterizada como *Bacillus* sp. donde en la observación morfológica de las colonias, se observaron colonias medianas blanquecinas con bordes irregulares (Figura 6A), y en la observación microscópica se observaron bacilos Gram (+) con endosporas terminales (figura 6B). Trabajos realizados indican que las características que presentan los aislados de *Bacillus* sp. se caracterizan por ser de tamaño variable, de un color blanquecino, con presencia de endosporas bacterianas que constituyen una estructura de resistencia hasta que las condiciones sean favorables para el desarrollo de la forma vegetativa, Gram (+), de acuerdo a la descripción de (Castañeda Alvarez & Consuelo Sánchez, 2016), (Méndez-Úbeda, Flores Hernández, & Páramo-Aguilera, 2017) y (Villarreal-Delgado, y otros, 2018).



**Figura 6.** *Bacillus* sp. **A.** Cultivo de *Bacillus* sp. cepa YHPJ en agar papa-dextrosa, se observan colonias blanquecinas medianas. **B.** Bacilos Gram positivos con esporas con una magnificación de 100X. Fuente: Elaboración propia

En la Figura 7 C, se muestra el comportamiento de la cinética de crecimiento de la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ (células libres incubadas sin agitación y con agitación), donde se observa el inicio de la fase exponencial a las 4 horas de incubación, con una velocidad de crecimiento de 2,52 generaciones por hora. Los datos obtenidos fueron útiles para posteriores evaluaciones de la actividad inhibitoria del filtrado de *Bacillus* sp. cepa YHPJ contra el crecimiento de *Phytophthora* sp. en un cultivo de 7 días, donde el fitopatógeno se encuentra en la fase media de crecimiento, y a los 15 días, donde se encuentra en fase estacionaria.

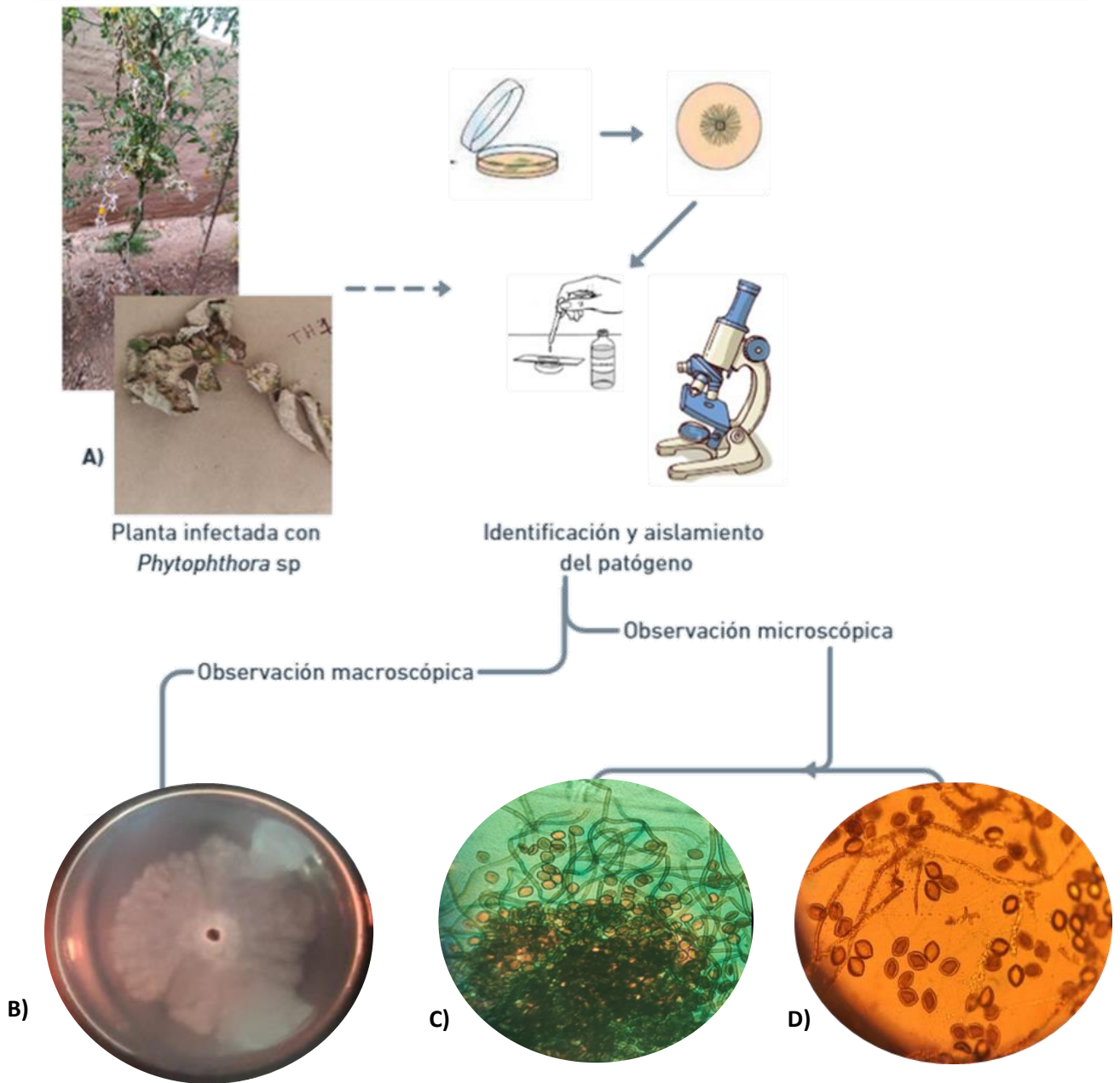


**Figura 7. A.** Cinética de crecimiento *Bacillus* sp. cepa YHPJ (células libres) en caldo papa dextrosa modificado incubado a una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 20 horas. **B)** Gráfica de la fase exponencial de la curva de crecimiento para la obtención del tiempo de generaciones de la cepa.

- **Aislamiento e Identificación de *Phytophthora* sp. (Causante de la enfermedad tizón tardío).**

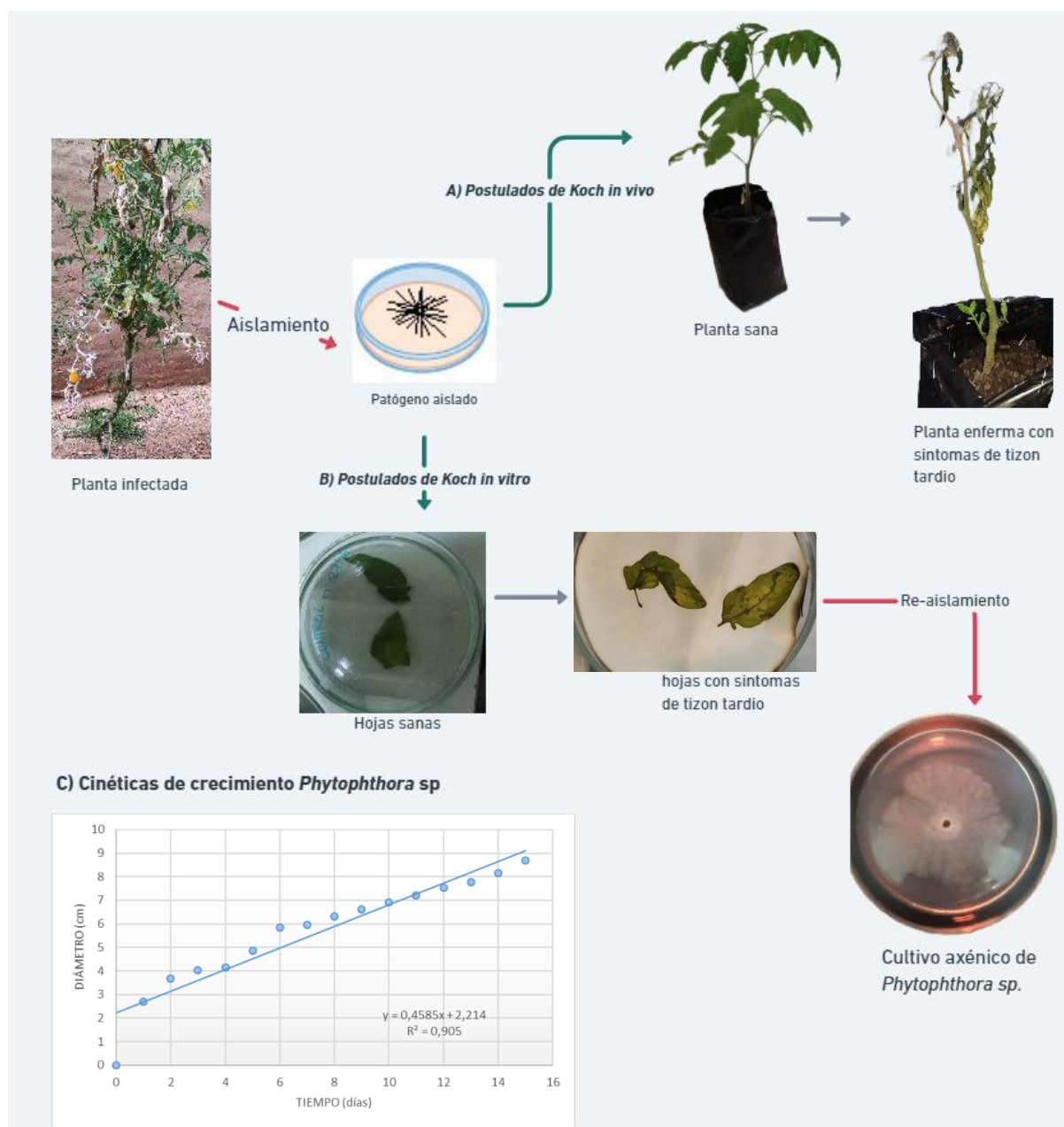
De las muestras de hojas y tallos de cultivo de tomate que presentaban síntomas de la enfermedad de tizón tardío (Figura 8A) se realizó la identificación de *Phytophthora* sp. mediante claves taxonómicas por observaciones macroscópicas y microscópicas. De acuerdo a las observaciones macroscópicas realizadas durante un periodo de 15 días de incubación en medio PDA, se observó que a partir del primer día existe desarrollo de micelio de color blanquecino ralo y crecimiento uniforme ligeramente petaloide (Figura 8B).





**Figura 8.** *Phytophthora* sp. **A)** Planta de tomate infectada (tallo y hojas) **B)** Cultivo axénico de *Phytophthora* sp. en PDA. **C)** y **D)** Identificación microscópica donde se observa Conidias de *Phytophthora* en C con una magnificación de 40X y en D se observa esporangios no papilados de *Phytophthora* sp. con una magnificación de 100X

En la identificación microscópica mediante la técnica de adhesión en cinta adhesiva, se observó hifas y esporangios no papilados y ovoides (Figura 8 C, D). Una vez identificado se procedió en la confirmación de *Phytophthora* mediante los postulados de Koch (Figura 9) en los cuales, se pudo replicar la enfermedad de tizón tardío.



**Figura 9.** Postulados de Koch de *Phytophthora sp.* A) Postulados de Koch *in vivo* en hojas de tomate B) Postulados de Koch *in vitro* en hojas de tomate C) Cinéticas de crecimiento *Phytophthora sp.* en PDA cultivado a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C por 15 días.

El género *Phytophthora* es considerado difícil de identificar según (Mesa Salgado, y otros, 2008), ya que las diferencias morfológicas entre algunas especies de *Phytophthora* son pequenas y los caracteres morfológicos son influenciados por el ambiente e incluso se conoce que algunas especies de *Phytophthora* no producen esporangios en los medios que se utilizan comúnmente lo que complica la identificación morfológica. Investigaciones de (Mesa Salgado, y otros, 2008), (Soto Plancarte, y otros, 2017) y (Reyes-Tena, y otros,

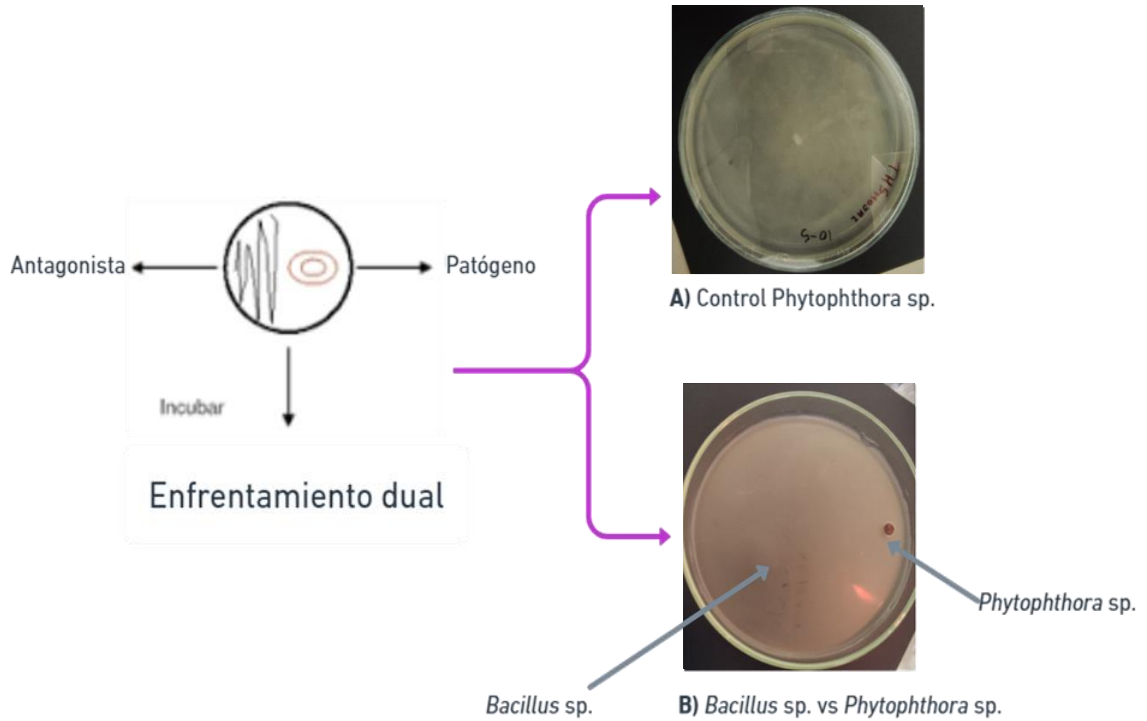
2021) reportaron que algunas cepas de *Phytophthora* producen esporangios caducos, papilados y/o con pedicelo largo los cuales mostraron formas irregulares o distorsionadas.

Una vez identificado y caracterizado macro y microscópicamente a *Phytophthora* sp., se evaluó su cinética de crecimiento en medio PDA, donde se realizó mediciones del diámetro crecimiento cada 24 horas. En la Figura 9 C, se muestra el comportamiento de *Phytophthora* sp, donde se observa que a partir del primer día inicia la fase de crecimiento hasta los 15 días de incubación, con una velocidad de crecimiento de 0,46 cm de frente hifal por día. Los datos obtenidos fueron útiles para posteriores evaluaciones de la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos contra el crecimiento de *Phytophthora* sp. en un cultivo de 7 días, donde el fitopatógeno se encuentra en la fase media de crecimiento, y a los 15 días se encuentra en fase estacionaria donde procedería la esporulación.

- **Efecto inhibitorio directo de *Bacillus* sp. cepa YHPJ frente al crecimiento de *Phytophthora* sp.**

En el presente estudio, a través de la técnica de enfrentamiento dual en placa en medio PDA se evaluó la inhibición directa del antagonista *Bacillus* sp. cepa YHPJ sobre el crecimiento del fitopatógeno *Phytophthora* sp.

Los resultados de la evaluación durante un tiempo de 7 días de co-incubación con el patógeno, presentaron buenos porcentajes de inhibición contra el fitopatógeno *Phytophthora* sp. siendo estas mayores al 85% (Figura 10 B) en comparación al control negativo de *Phytophthora* sp. donde no existió alteración en su crecimiento normal (Figura 10 A). Sobre la base de los resultados obtenidos de los ensayos de enfrentamiento dual, se determinó que *Bacillus* sp. cepa YHPJ se encuentra metabólicamente activo, por su capacidad inhibitoria del crecimiento de *Phytophthora* sp. en función al porcentaje de inhibición mayor o igual al 85%.



**Figura 10.** Actividad antagónica directa de *Bacillus* sp. cepa YHPJ contra *Phytophthora* sp. **A)** *Phytophthora* sp. (control de crecimiento) **B)** *Bacillus* sp. YHPJ inhibe el crecimiento de *Phytophthora* sp.

Las cepas de *Bacillus* poseen la ventaja de la esporulación, que confiere resistencia al calor, tolerancia a la desecación y la capacidad de colonizar con éxito el microambiente de la planta de esta manera restringe la infección por patógenos e induce la resistencia de la planta. (Jeong, y otros, 2017).

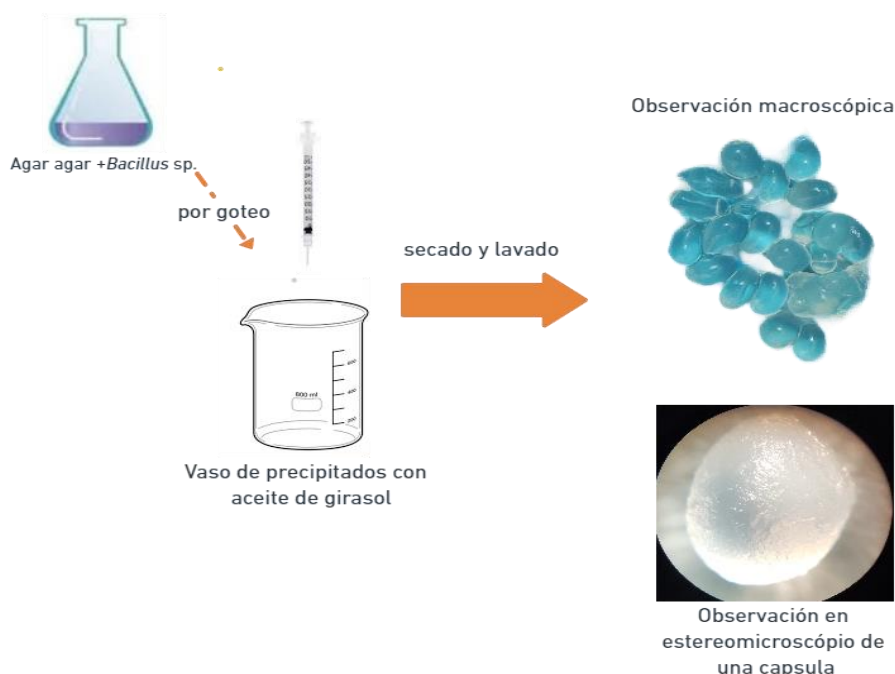
Trabajos realizados por (Zohaib Anjum, Adnan, Mukarram Ali, Bilal, & Javaid, 2019) reportaron porcentajes de inhibición del 61,65% del crecimiento de la especie de *Phytophthora Capsici* mediante el enfrentamiento dual con *Trichoderma harzianum* y un 54,36 % con *Bacillus*. De la misma manera (Ley-López N. , y otros, 2018) reportaron que usando una suspensión celular de *Bacillus* spp. se obtuvo una inhibición de la germinación de zoosporas entre el 88,15 – 99,07%, siendo estos comparables con los resultados que obtuvimos al enfrentar a *Phytophthora* sp. contra *Bacillus* sp.

## **2. Determinación de las condiciones de producción de filtrados biológicamente activos de *Bacillus* sp. YHPJ inmovilizados**

- **Inmovilización del *Bacillus* sp. YHPJ en agar – agar**

Para la producción de un filtrado bacteriano con células libres de *Bacillus* sp. según la investigación realizada por (Mamani Mamani, 2018) es necesario recurrir a la utilización de equipos entre ellos un agitador orbital una centrifugadora y un equipo de filtración los cuales para la producción de este filtrado en condición de laboratorio son bastante costosos. Mediante la técnica de inmovilización de células viables muchos autores mencionan un posible aumento de la productividad, así mismo la recuperación del producto se facilita al salir el efluente libre de células o con una mínima cantidad de biomasa, con la consecuente disminución de costos en todos los aspectos relacionados en la producción por fermentación (Silva, y otros, 1995). Todas estas razones nos llevan a buscar otras alternativas para la obtención del filtrado bacteriano activo que pudieran mejorar las condiciones de producción sin afectar la actividad inhibitoria que posea.

Las capsulas obtenidas en esta investigación mediante el método de Atrapamiento con agar – agar al 3,5% (p/v), contienen células *Bacillus* sp. cepa YHPJ las cuales se encuentran atrapadas en el agar, las capsulas obtenidas (Figura 11) presentaron porosidad y alta resistencia mecánica con un diámetro promedio de 4,5 mm y un volumen promedio por capsula de 0,065 mL dando un tamaño de poro adecuado para un eficiente transporte de nutrientes, presentando concentración viable de biomasa por capsula aproximadamente de 93 UFC/capsula.



**Figura 11.** Inmovilización celular de *Bacillus* sp. YHPJ **A)** observación macroscópica de las capsulas de agar-agar **B)** observación en el estéreo-microscopio de una capsula de agar-agar con *Bacillus* sp. YHPJ donde se observa la porosidad de la misma.

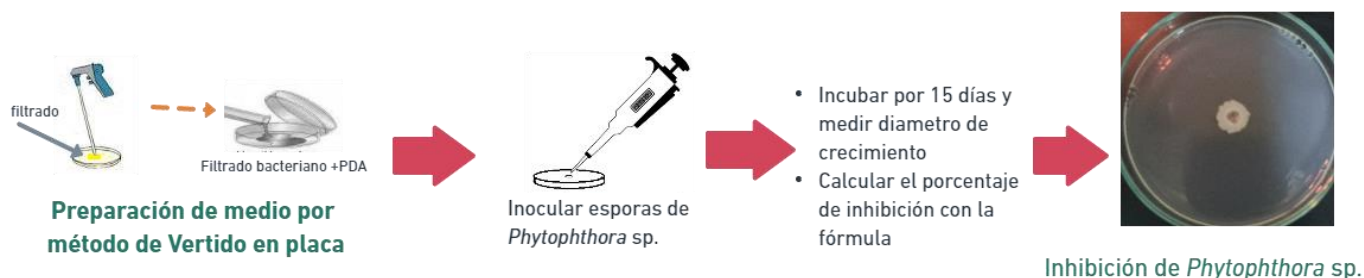
Trabajos realizados por (Alvarado Pérez, Muro Urista, Cerda, Álvarez Sánchez, & Riera Rodríguez, 2018) y (Sossa U., y otros, 2008) reportan un mejor encapsulamiento de especies de *Bacillus* con alginato de sodio o alginato de calcio a concentraciones entre el 3% y 3,5 % (p/v) obteniendo microcápsulas con estructura sólida y porosidad, con una alta resistencia mecánica y un diámetro medio entre 3 – 4 mm., (Zhien , Muftah , & Zineb , 2018) mencionan la importancia de la estabilidad y tamaño de las capsulas en relación a la concentración de alginato, teniendo mejores resultados con concentraciones que oscilan entre 2,5 al 3,5%.

- **Evaluación *in vitro* de la actividad biológica inhibitoria de filtrados bacterianos**

Los fitopatógenos fúngicos causan graves pérdidas y daños a la producción agrícola, llevando a controlarlas principalmente mediante el uso de plaguicidas y en algunos casos mediante prácticas culturales. Sin embargo, el uso generalizado de productos químicos ha sido objeto de preocupación y escrutinio público por sus posibles efectos nocivos en el medio ambiente y en organismos llevando a una posible carcinogenicidad. Siendo las

especies de *Bacillus* sp. uno de los agentes más estudiados y utilizado para controlar enfermedades de las plantas, demostrando que este género tiene una actividad antifúngica significativa contra *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phytophthora capsici* entre otros (Jeong, y otros, 2017).

En los últimos tiempos se ha explorado medidas adecuadas para controlar a patógenos utilizando como alternativa prometedoras y respetuosas con el medio ambiente a agentes de control biológico (BCA), incluidos los microorganismos y los metabolitos secundarios. El uso de agentes de control biológico (BCA) y productos naturales (NP) es ambientalmente seguro y sostenible, y en algunos casos, la única opción disponible para la protección de las plantas contra patógenos. Las NP se definen ampliamente como ingredientes activos, derivados de una fuente vegetal, animal o microbiana, que pueden usarse para controlar el desarrollo de enfermedades estimulando las defensas de las plantas o ejerciendo directamente actividad antifúngica (Wang, y otros, 2019).



**Figura 12.** Evaluación de los filtrados bacterianos de *Bacillus* sp. YHPJ contra el crecimiento de *Phytophthora* sp.

Con base a lo anteriormente mencionado y con la finalidad de optimizar la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos frente al crecimiento de *Phytophthora* sp. se evaluaron las condiciones de cultivo de *Bacillus* sp. considerando los parámetros de inmovilización celular, agitación, tiempo de cultivo y concentración del extracto. Por lo tanto, en la presente sección se evaluó la actividad inhibitoria de filtrados, el cual se realizó mediante la técnica de dilución en placa del filtrado más PDA, de la actividad inhibitoria de los filtrados crudos bacterianos producido por la cepa *Bacillus* sp. YHPJ tanto de células libres e inmovilizadas en condiciones de agitación y sin agitación, los cuales

fueron evaluados frente a *Phytophthora* sp. durante 15 días de incubación producidos con células libres e inmovilizadas en cultivo batch con y sin agitación durante 24, 30 y 36 horas de cultivo.

**Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los filtrados bacterianos obtenidos con diferentes condiciones de cultivo de *Bacillus* sp. YHPJ, frente a *Phytophthora* sp.**

Inmovilización	Dilución del extracto	Tiempo de cultivo	Agitación	% de inhibición ()
0	1	-1	0	0
0	2	-1	0	0
0	3	-1	0	0
0	4	-1	0	0
0	1	-1	1	6
0	2	-1	1	9
0	3	-1	1	8
0	4	-1	1	0
0	1	0	0	15
0	2	0	0	12
0	3	0	0	5
0	4	0	0	2
0	1	0	1	49
0	2	0	1	38
0	3	0	1	20
0	4	0	1	18
0	1	1	0	36
0	2	1	0	36
0	3	1	0	35
0	4	1	0	29
0	1	1	1	84
0	2	1	1	81
0	3	1	1	72
0	4	1	1	58
1	1	-1	0	14
1	2	-1	0	9
1	3	-1	0	12
1	4	-1	0	11
1	1	-1	1	15
1	2	-1	1	18
1	3	-1	1	14
1	4	-1	1	0
1	1	0	0	80



1	2	0	0	80
1	3	0	0	75
1	4	0	0	48
1	1	0	1	81
1	2	0	1	82
1	3	0	1	76
1	4	0	1	71
1	1	1	0	80
1	2	1	0	83
1	3	1	0	74
1	4	1	0	68
1	1	1	1	84
1	2	1	1	84
1	3	1	1	76
1	4	1	1	70

Categorización de los niveles de cada variable presentada en la tabla: Inmovilización (0 = no inmovilizado, 1 = inmovilizado); Dilución del extracto (1 = 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 2 = 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 3 = 63  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 4 = 30  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ); tiempo de incubación del cultivo (-1 = 24 h, 0 = 30 h, 1 = 36 h); Agitación (0 = sin agitación 1= con agitación)

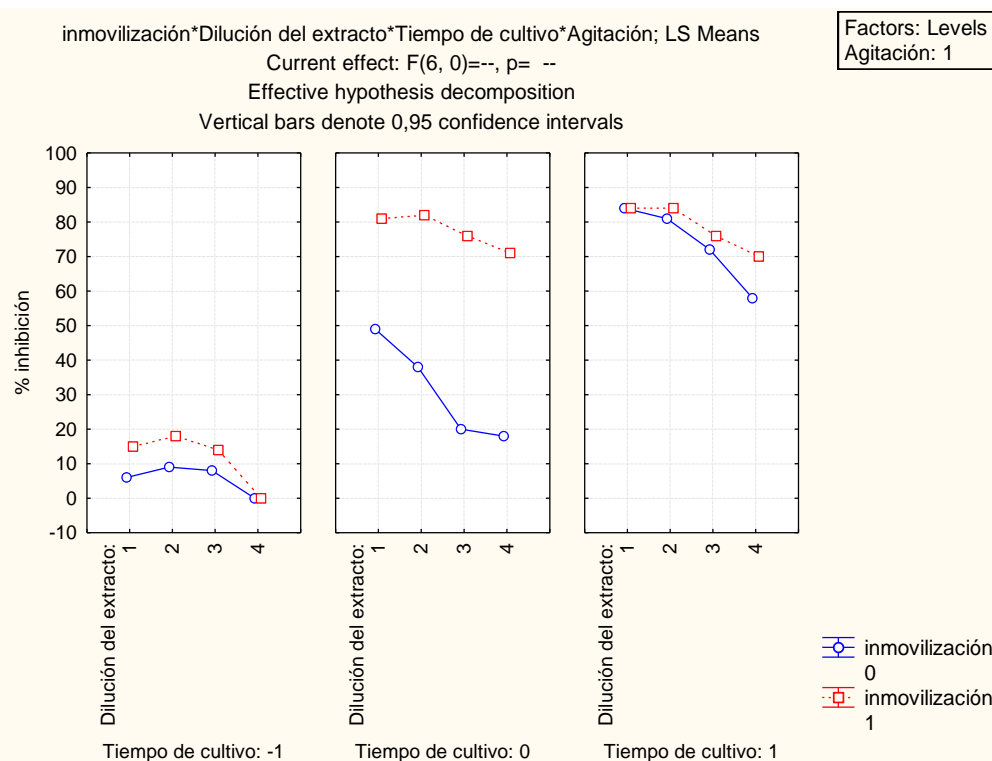
Fuente: *Elaboración propia*

Para determinar si, la inmovilización en capsulas de agar, la agitación, el tiempo de incubación del cultivo y la dilución del extracto, tienen efecto significativo sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos contra *Phytophthora* sp. se realizó un análisis MANOVA.

Como podemos observar en la tabla 4 la inmovilización y el tiempo de cultivo,  $p < 0,05$  tienen efecto altamente significativo sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos. la agitación, y la dilución del extracto,  $p < 0,05$  son significativas sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos.

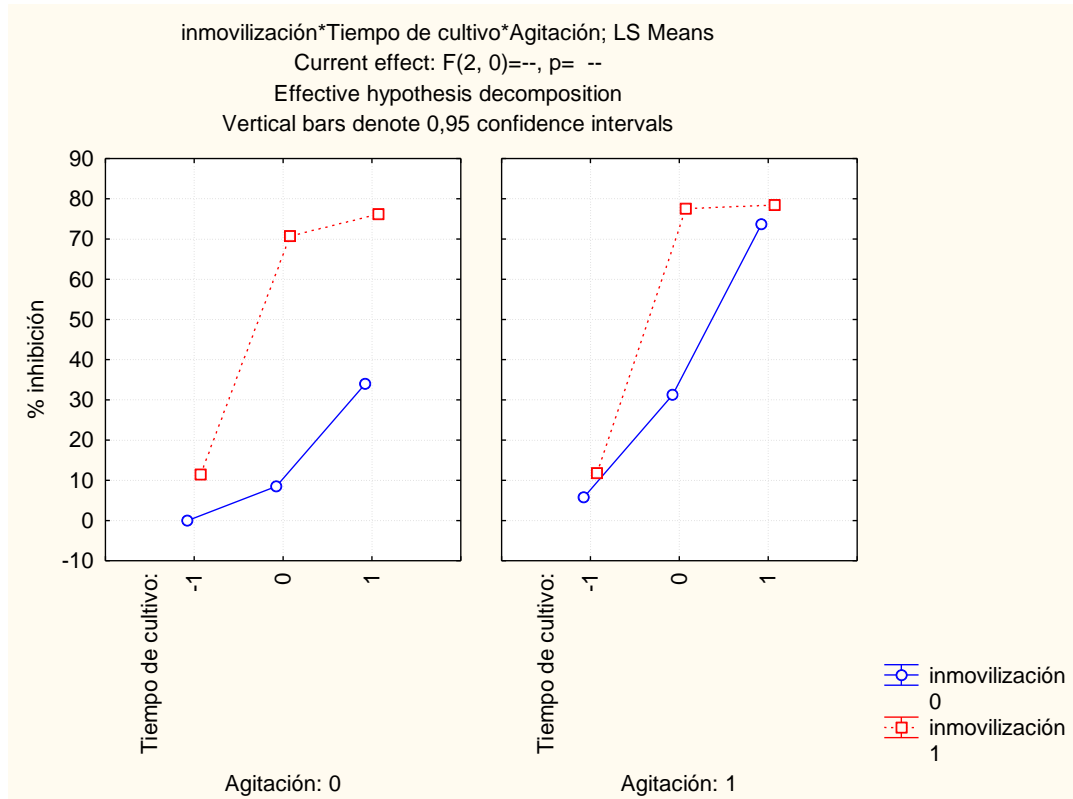
**Tabla 4. Análisis de varianza de la evaluación actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos de *Bacillus* sp. contra *Phytophthora* sp.**

Efecto	SS	DF	MS	f	p
{1}inmovilización	9976	1	9976	---	---
{2}Dilución del extracto	1499	3	500	---	---
{3}Tiempo de cultivo	285E2	2	1,42E+04	---	---
{4}Agitación	2002	1	2002	---	---
inmovilización*Dilución del extracto	39	3	13	---	---
inmovilización*Tiempo de cultivo	4311	2	2156	---	---
Dilución del extracto*Tiempo de cultivo	322	6	54	---	---
inmovilización*Agitación	1160	1	1160	---	---
Dilución del extracto*Agitación	82	3	27	---	---
Tiempo de cultivo*Agitación	668	2	334	---	---
inmovilización*Dilución del extracto*Tiempo de cultivo	127	6	21	---	---
inmovilización*Dilución del extracto*Agitación	117	3	39	---	---
inmovilización*Tiempo de cultivo*Agitación	532	2	266	---	---
Dilución del extracto*Tiempo de cultivo*Agitación	168	6	28	---	---
1*2*3*4	169	6	28	---	---



**Figura 13.** Efecto de la interacción de la inmovilización de *Bacillus* en capsulas de agar-agar, el tiempo de incubación del cultivo y la dilución del extracto sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos sobre *Phytophthora*.

En la figura 13 se puede observar que la dilución del extracto no constituye una variable con efecto significativo, entendiéndose que a menor dilución (más concentrado) habrá un mayor porcentaje de inhibición y a una mayor dilución (menor concentración) hay un menor porcentaje de inhibición.



**Figura 14.** Efecto de la interacción de la inmovilización, el tiempo de cultivo y la agitación sobre la actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos.

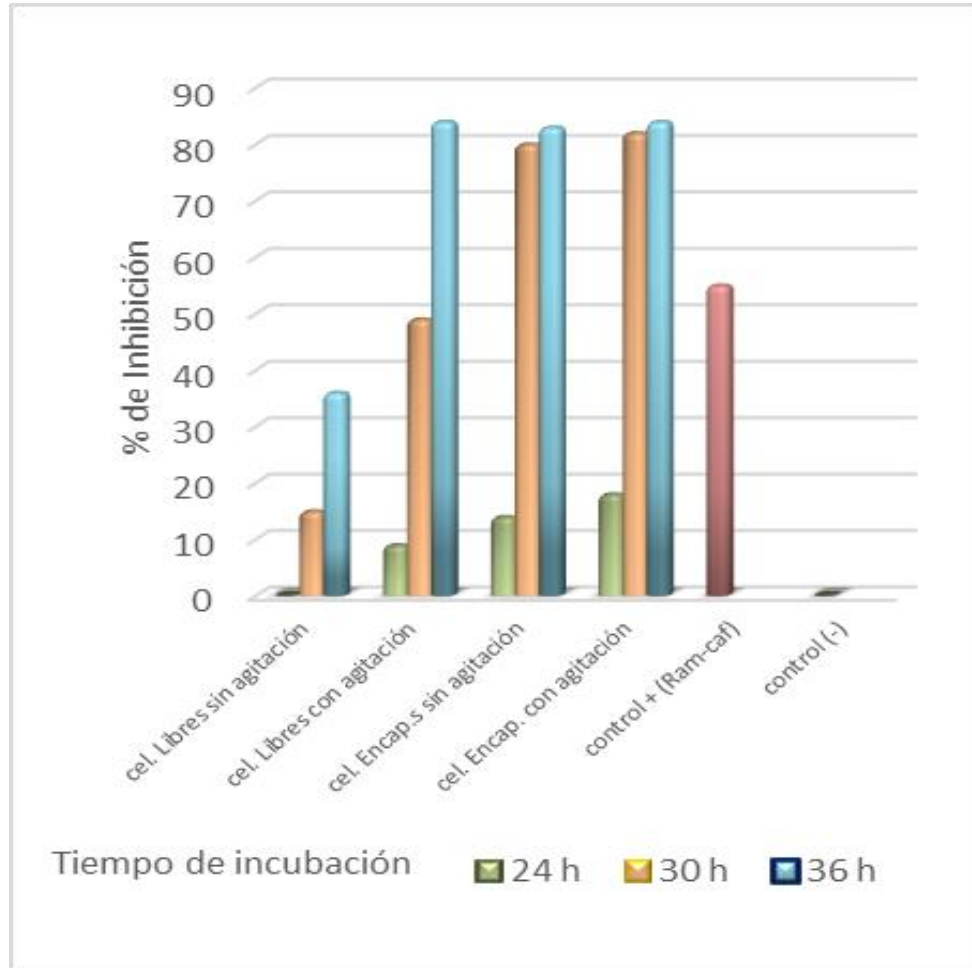
En la Figura 14, se puede observar que tanto los cultivos agitados y no agitados, presentan porcentajes de inhibición del crecimiento de *Phytophthora* mayores a 70% a partir de las 30 horas de incubación del cultivo. En comparación con la actividad inhibitoria observada de los filtrados de cultivo de células libres de *Bacillus*, solamente se alcanzan valores de porcentaje de inhibición mayores al 70% en condiciones de incubación del cultivo a 36 h con agitación. Este fenómeno es constatado mediante el análisis de ANOVA multivariado (tabla 5), donde se determina que tanto el tiempo de incubación del cultivo como la inmovilización son variables altamente significativas ( $p < 0.001$ ) que tienen un efecto directo en la actividad inhibitoria de los extractos obtenidos.

**Tabla 5.** ANOVA multivariado realizado a los 48 ensayos para evaluar el efecto significativo de los factores en los porcentajes de inhibición.

		Regression Summary for Dependent Variable: % inhibición (Spreadsheet1)					
		R= ,90453165 R²= ,81817750 Adjusted R²= ,80126378					
		F(4,43)=48,374 p<,00000 Std.Error of estimate: 14,486					
N=48		Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(43)	p-level
	<b>Intercept</b>			31,00000	5,913822	5,24196	0,000005
	inmovilización	0,448364	0,065026	28,83333	4,181703	6,89512	0,000000
	Dilución del extracto	-0,165743	0,065026	-4,76667	1,870115	-2,54886	0,014459
	Tiempo de cultivo	0,741170	0,065026	29,18750	2,560760	11,39798	0,000000
	Agitación	0,200857	0,065026	12,91667	4,181703	3,08885	0,003515

En el presente estudio, actividad inhibitoria de los filtrados bacterianos obtenidos con células libres e inmovilizadas contra el crecimiento de *Phytophthora* sp. fue ligeramente superior a la de las células libres, observando una mejor inhibición en el caso de los filtrados bacterianos obtenidos con células inmovilizadas y sin agitación con 30 y 36 horas de cultivo. Resultados similares han sido reportados por (Hasan, Khan, Shah, & Hameed, 2009) y ( Jurchescu I.-M. , y otros, 2013) en sus estudios realizados, donde células inmovilizadas de *Bacillus* tuvieron una mejor producción de un filtrado activo y en un tiempo menor de cultivo. Cabe recalcar que (Hasan, Khan, Shah, & Hameed, 2009) evaluaron la actividad de un extracto obtenido con *Bacillus* inmovilizado en agar – agar el cual demostró ser un mejor proceso en comparación a la producción de antibiótico a partir de células libres.

Con estos resultados se concluyó que el filtrado bacteriano presenta una mejor actividad inhibitoria con *Bacillus* sp. YHPJ inmovilizados y con un tiempo menor de cultivo por lo tanto en la búsqueda de un extracto capaz de inhibir eficazmente a *Phytophthora* sp. se realizó una comparación con el agroquímico ram caf para observar cual es la eficiencia de estos compuestos químicos en comparación con el filtrado bacteriano. La capacidad de inhibir el crecimiento de *Phytophthora* sp. a través del empleo de compuestos químicos como ser el Ram Caf presento porcentajes de inhibición de un 62 % (Figura 15), en comparación con el filtrado bacteriano el cual presento un porcentaje de inhibición mayor al 70%, siendo los filtrados bacterianos más efectivos que el agroquímico.



**Figura 15.** Diagrama de barras de los diferentes y porcentajes de inhibición sobre tratamientos contra *Phytophthora* sp.

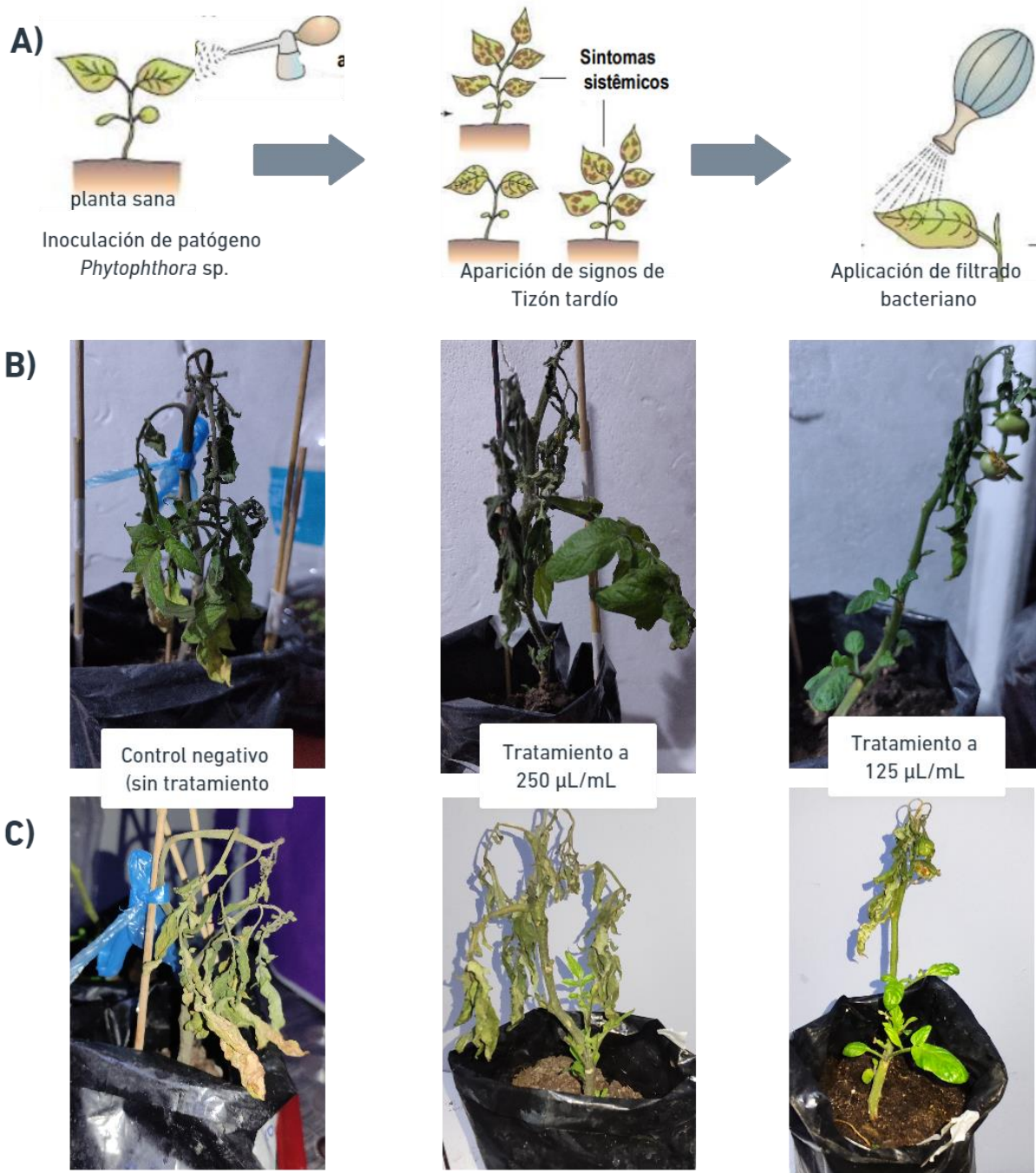
El presente trabajo de investigación se realizó con el fin de optimizar las condiciones para la producción de un extracto bioactivo por *Bacillus* sp. YHPJ en forma libre y en estado inmovilizado. Observando la tasa de producción del extracto bioactivo por células inmovilizadas fue ligeramente superior incluso después de múltiples reemplazos del medio de cultivo al extracto obtenido con células libres. Resultados similares han sido reportados por (Jurcescu I. , y otros, 2013) los cuales reportan que el período de incubación, el pH y las concentraciones de glucosa optimizaron la actividad del extracto libre de células el cual mostró una mayor inhibición después de 72 horas de incubación contra *S. aureus*.

- **Evaluación *in vivo* de la actividad biológica inhibitoria de filtrados bacterianos**

En los resultados de la evaluación de la actividad biológica inhibitoria de filtrados bacterianos a una concentración de 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  aplicados como tratamiento sobre plantines de tomate infectados con *Phytophthora* sp. las cuales mostraron signos de marchitamiento y decadencia radicular a las 24 horas de inoculación del patógeno, se observó a los 4 días posteriores de la primera aplicación del filtrado bacteriano una diferencia en cuanto al control negativo (plantin infectado sin tratamiento), observándose una ralentización de la infección (marchitez) en los plantines muestra (con tratamiento en base a los filtrados bacterianos) a diferencia de los controles negativos que presentaron marchitez severa de la planta fue más severa (Figura 16). En función a estos resultados, se procedió a aplicar una vez más el filtrado bacteriano al cabo de 10 días, observándose que la enfermedad del tizón tardío no prosiguió.

En los plantines tratados con los filtrados (Figura 16 C) se puede observar la progresiva recuperación de estos observando el brote de hojas sanas en el tallo principal, en comparación con el control negativo (sin tratamiento) donde se observa que la enfermedad persistente, evidenciada por la marchitez completa de la planta.

Se realizó el seguimiento al desarrollo de las plantas durante 3 meses para observar si estas podían ser capaces de llegar a etapa de fructificación, en esta evaluación se pudo observar que los plantines tratados con los filtrados bacterianos en el tiempo fueron capaces de una recuperación total a los 30 días sin la necesidad de otra aplicación del filtrado bacteriano. Observando de esta manera en el anexo 2 los plantines en etapa de fructificación a los 70 días de la aplicación del filtrado sin un nuevo resurgimiento de la enfermedad de Tizón tardío.



**Figura 16.** Evaluación de los filtrados bacterianos de *Bacillus* sp. YHPJ contra el crecimiento de *Phytophthora* sp. en plantas de tomate a una concentración de 250 µL/mL y 125 µL/mL **A)** proceso de evaluación in vivo de los filtrados bacterianos **B)** Plantines a los 4 días posteriores a la primera aplicación de los filtrados bacterianos activos. **C)** Plantines a los 15 días posteriores a la primera aplicación de los filtrados bacterianos activos, donde se observa en los plantines con el tratamiento el crecimiento de nuevas hojas sanas en la base del tallo.

Con estos resultados se concluyó que el filtrado bacteriano presenta una buena actividad inhibitoria siendo capaz de inhibir eficazmente a *Phytophthora* sp. en un modelo vivo. Varias especies de *Bacillus* son prometedoras como parte de la estrategia de biocontrol dada su capacidad para producir una variedad de metabolitos antibacterianos y antifúngicos. Teniendo en cuenta que el extracto bacteriano es un coctel el cual puede contener enzimas, lipopetidos, antibióticos, entre otros los cuales inhibieron el crecimiento de *Phytophthora* sp. Resultados similares han sido reportados por (Zhang, y otros, 2023) los cuales reportan en modelos vivos de papa que *Bacillus velezensis*, puede inhibir fuertemente el crecimiento del micelio y alterar el fenotipo hifal de *P. infestans* y mencionan que los mecanismos pueden incluir la secreción de proteasas, celulasas, sustancias antagonistas extracelulares con alta estabilidad térmica y la inducción de resistencia de los tubérculos de papa al tizón tardío.

En investigaciones realizadas por varios autores han reportado a *Bacillus* sp. como una opción de biocontrol para diferentes patógenos (Zhang, y otros, 2023), (Ariza & Sánchez, 2012), (Castañeda Alvarez & Consuelo Sánchez, 2016) (Ley-López N., y otros, 2018). Es así que (Ley-López N., y otros, 2018) reportan la inhibición significativamente mayor de sus filtrados sobre las zoosporas de *P. capsici*. También mostraron potencial de control biológico en cultivos de tomate y chile contra *P. capsici*. Sin embargo, no hay muchos informes sobre el control de plantas de tomate infectadas con *Phytophthora* sp. por lo que, con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se deben realizar más investigaciones sobre el extracto obtenido contra este microorganismo.

### **3. Evaluación de la toxicidad de los filtrados obtenidos con *Bacillus* sp. inmovilizados.**

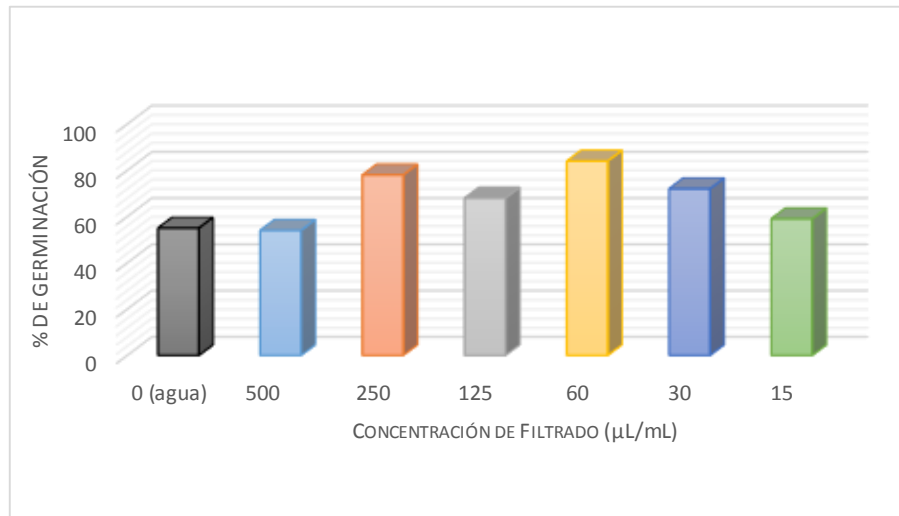
Para la evaluación del efecto genotóxico y ecotóxico se realizaron una serie de análisis con el filtrado bioactivo bacteriano de *Bacillus* sp. YHPJ incubado por 30 horas en medio caldo papa suplementado con urea.

- **Ensayos ecotóxicos de los filtrados**

Para la evaluación del efecto ecotóxico se realizó la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) regándolos con los filtrados crudos bacterianos de *Bacillus* sp.



YHPJ para evaluar si los filtrados afectan a la capacidad germinativa de las semillas, para ello se llevó a cabo el cálculo del porcentaje de germinación. Obteniendo el porcentaje de germinación (Figura 17) del control positivo (agua) el cual fue de 56%, haciendo una comparación con los porcentajes de germinación de los ensayos se observó que el porcentaje de germinación empleando los filtrados bacterianos es igual o mayor a la del control positivo. Determinando que la capacidad germinativa tuvo un incremento con respecto al control positivo.



**Figura 17.** Germinación de semillas de tomate con filtrados bacterianos obtenidos con *Bacillus* sp. YHPJ inmovilizado a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 60, 30 y 15 µL/mL)

Estos resultados demuestran que el filtrado bacteriano no tiene efectos ecotóxicos ya que no inhibe la capacidad de germinación de las semillas de tomate, sino que se observa que tiene capacidad promotora del crecimiento al observar que hay un aumento del porcentaje de germinación de las semillas, resultados similares fueron reportados por (Mojica-Marín, y otros, 2009) quienes informaron que controlaron el marchitamiento del chile usando *B. thuringiensis*, pero su estudio se realizó directamente sobre la germinación de semillas inoculadas con *P. capsici*, donde se observó una germinación del 62 al 93 % en las semillas tratadas. Este efecto se puede deber a que *Bacillus* sp. es parte de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB) los cuales son un grupo de microorganismos promisorios y ampliamente estudiados como una de las formas posibles para reducir los costos de producción en la agricultura moderna. (Rojas-Badía, Bello-González, Ríos-Rocajull, Lugo-Moya, & Rodríguez-Sánchez, 2020) Estas bacterias poseen diferentes

estrategias para potenciar el crecimiento de la planta como la solubilización y reciclaje de nutrientes, la producción de hormonas estimuladoras del crecimiento, inducción de resistencia sistémica a patógenos, la fijación de nitrógeno, la inducción de defensa de las plantas, la producción de antibióticos y otras sustancias antimicrobianas. Resaltando a *Bacillus subtilis* por la producción de metabolitos como auxinas, sideróforos, citoquinas, ácidos orgánicos y antibióticos. Por lo que abre las perspectivas de su utilización en la agricultura sostenible para preservar el medio ambiente. (Delgado-Torres, Chumacero-Acosta, Rodríguez-Pérez, Tuesta-Casique, & Álvarez-Arista, 2022)

- **Test de Ames**

Para la determinación genotóxica mediante el ensayo de test de Ames, se utilizó como controles positivos para la cepa TA 98 y el TA 100. En ambas bacterias existe un gen defectuoso (mutante) que inhibe la expresión del aminoácido esencial es el caso de la *Salmonella typhimurium* histidina. La prueba se basa en la inducción de mutaciones inversas en el gen defectuoso. (Turkez, Arslan, & Ozdemir, 2017) Los agentes considerados mutagénicos provocan una mutación inversa en el gen defectuoso que permite a las bacterias a sintetizar el aminoácido esencial (histidina) para crecer en un medio mínimo. Se considera a un compuesto mutagénico si su índice de mutagenicidad es mayor o igual a 2.

<b>Tabla 6. Ensayo de Test de Ames. Cepa TA 98 y TA 100, del filtrado crudo bacteriano de <i>Bacillus</i> sp. YHPJ</b>			
<b>Cepa</b>	<b>Concentración(μL/mL)</b>	<b>IM</b>	<b>Clasificación</b>
<b>TA 98</b>	concentrado	0,63	No mutagénico
	250	1,13	No mutagénico
	125	0,79	No mutagénico
	60	1,67	No mutagénico
<b>TA100</b>	concentrado	0,54	No mutagénico
	250	0,79	No mutagénico
	125	0,54	No mutagénico
	60	0,79	No mutagénico

IM: Índice de mutagenicidad  
Fuente: Elaboración propia

Como podemos observar en la tabla 6 el filtrado bacteriano evaluado la mutagenicidad en diferentes concentraciones son considerados compuestos no mutagénicos al tener un IM menor a 2.

## VII. Conclusiones

En la evaluación de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados obtenidos con la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ inmovilizada y no inmovilizada fue ensayada.

La inhibición del crecimiento *Phytophthora* sp. de fue mayor al 70% al ensayar los filtrados obtenidos con cultivos inmovilizados en comparación con filtrados obtenidos con células libres.

En la evaluación de la actividad biológica inhibitoria por enfrentamiento dual de la cepa de *Bacillus* sp. YHPJ fue ensayada contra el crecimiento de *Phytophthora* sp.

Las variables ensayadas inmovilización, agitación y tiempo de cultivo han determinado la mejora de la producción y de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados en términos del incremento de la inhibición del crecimiento de *Phytophthora* sp.

Los filtrados obtenidos de los cultivos inmovilizados no presentan ecotoxicidad y genotoxicidad.

Se acepta la hipótesis de investigación, ya que el filtrado bacteriano obtenido con *Bacillus* sp. YHPJ en estudio inhibió el crecimiento de *Phytophthora* sp. en un porcentaje mayor al 60 %.

## VIII. Bibliografía

- Chirinos, D., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Peñarrieta Bravo, S., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2020). Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. *Cienc Tecnol Agropecuaria*.
- Jurchescu, I.-M., Hamann, J., Zhou, X., Ortman, T., Kuenz, A., Prüße, U., & Lang, S. (2013). Producción mejorada de 2,3-butanodiol en cultivos por lotes alimentados de *Bacillus licheniformis* DSM 8785 libre e inmovilizado. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4981-z>
- Silva, E., Montoya, D., Buitrago, G., Daza, G., Torres, J., & Romero, H. (1995). FERMENTACION ACETOBUTILICA (ABE) CON CELULAS INMOVILIZADAS DE *Clostridium acetobutylicum*. *Revista Colombiana de ciencias QUÍMICO-FARMACÉUTICAS*.
- Alvarado Pérez, Y., Muro Urista, C., Cerda, A., Álvarez Sánchez, J., & Riera Rodríguez, F. (2018). Antihypertensive and Antioxidant Properties from Whey Protein Hydrolysates Produced by Encapsulated *Bacillus subtilis* Cells. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. doi:International Journal of Peptide Research and Therapeutics
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *SciELO - Scientific Electronic Library Online*.
- Bascopé Zanabria, R., Bickel, U., & Jacobi, J. (2019). Plaguicidas químicos usados en el cultivo de soya en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia: riesgos para la salud humana y toxicidad ambiental. *SciELO*.
- Baudoin, A., Carvajal, M., Achu Cocarico, O., Vilela Porcel, M., Corrales, R., Vaca, R., & Miralles, F. (2017). Manual Técnico de Producción de Tomate con Enfoque de Buenas Prácticas Agrícolas. *Viceministerio de Desarrollo Rural y Agropecuario*.
- Bayomi, K., Asharf, A. B., Saad, M. N., & Al-Kady, A. (2020). Performance of some tomato genotypes under greenhouse conditions. *Egyptian Journal of Desert Research*, 70(1), 1 - 10.

- Bellé, C., Ferraz Ramos, R., Moccellini, R., & Jacobsen de Farias, C. (2020). Detection of *Colletotrichum coccodes* causing leaf anthracnose on *Pisum sativum* in southern Brazil. *Journal of Plant Pathology*.
- Bonfiglio Caprile, F., & Hernández, R. (2013). *CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE TRES CULTIVARES DE* Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8733/1/3927bon.pdf>
- Camino Torres, M. (2022). *Análisis comparativo nutricional del tomate (Solanum lycopersicum) y mora (Rubus* Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36533/1/CAL%20012.pdf>
- Castañeda Alvarez, E., & Consuelo Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *NOVA*, 53-62.
- Cayra, E., Dávila, J., Villalta, J., & Rosales, Y. (2017). Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado. *Información tecnológica*, 35-44. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642017000600005>
- Delgado-Torres, N., Chumacero-Acosta, J., Rodríguez-Pérez, L., Tuesta-Casique, A., & Álvarez-Arista, Y. (2022). *Bacillus subtilis* como promotor de crecimiento en el cultivo de café (*Coffea arabica*). *Revista Amazónica de Ciencias Ambientales y Ecológicas*. doi:<https://doi.org/10.51252/reacae.v1i2.345>
- Diario, E. (febrero de 2022). *Bolivia está lejos de la seguridad alimentaria*. Obtenido de <https://www.eldiario.net/portal/2022/02/12/bolivia-esta-lejos-de-la-seguridad-alimentaria/>
- Fernández Calle, E. (2018). Evaluación de diferentes estrategias de control de *Meloidogyne* sp. en cultivos de interés agronómico. *Universidad Nacional de Colombia*, 14 - 16.
- Garzón Jiménez, C., & Barragán Huerta, B. (2008). INMOVILIZACIÓN MICROBIANA: TÉCNICAS Y USOS EN EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS TÓXICOS. *Sistemas Ambientales*, 23-34.
- Hasan, F., Khan, S., Shah, A., & Hameed, A. (2009). PRODUCTION OF ANTIBACTERIAL COMPOUNDS BY FREE AND IMMOBILIZED *BACILLUS PUMILUS* SAF1. *Pak. J. Bot.*

- Huaman , F., Toscano , E., Acosta, O., Rojas, D., Inocente, M., Garrido, D., & Guevara-Fujita, M. (2014). Estudio genotóxico de una bebida experimental de quinua, kiwicha y kañiwa. *Revista peruana de biología*, 251 - 258.
- Jeong, M.-H., Lee, Y.-S., Cho, J.-Y., Ahn, Y.-S., Moon, J.-H., Hyun, H.-N., . . . Kim, K.-Y. (2017). Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 645-653. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.027>
- Jurchescu , I., Hamann, J., Zhou, X., Ortman , T., Kuenz , A., Prüße, U., & Lang, S. (2013). Producción mejorada de 2,3-butanodiol en cultivos discontinuos alimentados de *Bacillus licheniformis* libre e inmovilizado DSM 8785. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:[doi:doi.org/10.1007/s00253-013-4981-z](https://doi.org/10.1007/s00253-013-4981-z)
- Ley-López, N., Márquez-Zequera , I., Carrillo-Fasio, J., León-Félix, J., Cruz-Lachica, I., García-Estrada, R., & Allende-Molar, R. (2018). Efecto del biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. *rev.méx. fitopatol* .
- Ley-López, N., Márquez-Zequera, I., Carrillo-Fasio, J. A., León-Félix, J., Cruz-Lachica, I., García-Estrada, R. S., & Allende-Molar, R. (s.f.). Efecto del biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*.
- Li Y, G. Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. . *Frontiers Microbiology*, 883.
- López Marín, L. (2016). Manual Técnico Del Cultivo De Tomate (*Solanum lycopersicum*). San José, Costa Rica: INTA. Obtenido de INTA.
- Mamani Mamani, M. M. (2018). *Estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la región de La Plazuela, Irupana La Paz*. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/17589/TM-1929.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martínez-Ruiz, F., Cervantes-Díaz, Dr., L., Aíl-Catzím, Dr., C., Hernández-Montiel, Dr., L., Del Toro Sánchez, Dr., C., & Rueda-Puente, Dr., E. (2016). Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal* , 1857 – 7881.

- Méndez-Úbeda, J., Flores Hernández, M., & Páramo-Aguilera, L. (2017). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACILLUS subtilis AND EVALUATION OF ANTAGONISM IN VITRO AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI. *NEXO Universidad Nacional de Ingeniería*, 96-110.
- Mesa Salgado, V., Mideros, M., Jaramillo-Villegas, S., Cotes-Torres, J., Lagos Mora, L., Pineda, R., & Marín Montoya, M. (2008). Variabilidad genética de aislamientos de Phytophthora infestans procedentes del suroeste de Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 167-172.
- Mojica-Marín, HA, L.-O., CF, S.-C., B, P.-A., LH, M.-R., NA, G.-A., . . . OG., A.-G. (2009). Control biológico de la marchitez del chile ( Capsicum annum L.) por Bacillus thuringiensis. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v78n2/v78n2a04.pdf>
- Monge Pérez, J., & Loría Coto, M. (2021). Determinación de criterios de selección para el rendimiento de tomate (Solanum lycopersicum L.) cultivado bajo invernadero. *AvAnsesen InvestIgAclón AgropecuAriA*, 7 - 19.
- Pérez Porto, J., & Gardey, A. (2017). *Fotoperiodo*. Obtenido de <https://definicion.de/fotoperiodo/>
- Quintero-Domínguez, L., Ríos Rodríguez, L., Quintana Sánchez, D., & León Ávila, B. (2019). Sistema Experto para el diagnóstico presuntivo de enfermedades fúngicas en los cultivos. *SciELO*.
- Reyes-Tena, A., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Pedraza-Santos, M., Larsen, J., & Vázquez-Marrufo, G. (2021). Caracterización morfológica de aislados de Phytophthora capsici provenientes de Jalisco y Michoacán, México. *Rev. mex. fitopatol*.
- Rojas-Badía, M., Bello-González, M., Ríos-Rocajull, Y., Lugo-Moya, D., & Rodríguez-Sánchez, J. (2020). Utilización de cepas de Bacillus como promotores de crecimiento en hortalizas comerciales. *SciElo, Acta Agronómica*.
- Ruiz-Chután, J., Berdúo-Sandoval, J., & Sánchez-Pérez, A. (2018). Diversidad genética de aislados de Phytophthora infestanscolectados en zonas productoras de papa y tomate de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*.
- Salgado, M. R. (2015). Obtención y evaluación in vitro de metabolitos secundarios de dos cepas de Bacillus subtilis contra Fusarium spp.

- Silva Guachamín , A. (2018). *Acción in vitro de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos conjuntos contra Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador*. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertaci%20c3%b3n%20Final%20-%20Alexander%20Silva%20segunda%20correcci%20c3%b3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Soissa Stephens, H., Maige, W., Molinos Beltran, S., & Aguayo González, F. (2005). Prevención de Riesgos en el Uso de Plaguicidas. 4 -10.
- Sossa U., D., Acevedo, N. M., Villamil, A. M., Mercado Reyes, M., Hidalgo, B. Q., & Rodríguez, A. M. (2008). INMOVILIZACIÓN DE *Bacillus licheniformis* Y *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN DE PAPA. *Universitas Scientiarum*, 149-161.
- Soto Plancarte, A., Rodríguez Alvarado, G., Fernández Pavía, Y. L., Pedraza Santos, M., López Pérez, L., Díaz Celaya, M., & Fernández Pavía, S. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1867-1880.
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*.
- Tunupa. (2021). Radiografía de los agroquímicos en Bolivia. En F. Solon.
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. doi:<https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- UDAPE. (2005). *SECTOR AGROPECUARIO BOLIVIANO*.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa Rodríguez, E., Cira Chávez, L., Estrada Alvarado, M., Parra Cota, F., & de los Santos Villalobos, S. (abril de 2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev. mex. fitopatol* vol.36 no.1 Texcoco ene./abr. 2018, 36(1), 95-130. doi:<http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Villegas-Escobar, V., González-Jaramillo, L. M., Ramírez, M., Moncada, R. N., Sierra-Zapata, L., Orduz, S., & Romero-Tabarez, M. (2018). Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-



CB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*. *ELSEVIER*, 20-28.

Wang, Y., Zhang, C., Wu, L., Wang, L., Gao, W., Jiang, J., & Wu, Y. (2019). Efecto inhibitorio de *Bacillus subtilis* WL-2 y sus lipopéptidos IturinA frente a *Phytophthora infestans*. *bioRxiv*.

Zhang, J., Xiaoqinghuang, Yuqin-hou, Xia, X., Zhu, Z., Aironghuang, . . . Ypan dong. (2023). Insolation and Screening of Antagonistic Endophytes against *Phytophthora infestans* and Preliminary Exploration on Anti-oomycete Mechanism of *Bacillus velezensis* 6-5. *Plants*. doi:<https://doi.org/10.3390/plants12040909>

Zhien , Z., Muftah , H.-N., & Zineb , B. (2018). Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater:A review. *Environmental Chemistry Letters*.

Zohaib Anjum, M., Adnan, M., Mukarram Ali, S., Bilal, H., & Javaid, H. (2019). Potencial antifúngico de los agentes de control biológico contra *Phytophthora Capsici* que causan la pudrición de la fruta del chile. *Agri Res& Tech: Open Access J*. doi:10.19080/ARTOAJ.2019.22.556209

## ANEXOS

### Anexo 1. Medio de cultivo PDA

Pesar para 1L	Procedimiento	
200 g de Papa 5 g de glucosa 20 g de agar	Pelar la papa y llevarlo a ebullición, luego filtrarlo.	Enrasar el filtrado de papa para un volumen de 1 litro. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Enfriar y plaquear.

### Anexo 2. Medio de cultivo caldo papa dextrosa suplementado con urea.

Pesar	Procedimiento	
200 g de Papa 5 g de glucosa 10 g de urea	Pelar la papa y llevarlo a ebullición, luego filtrarlo.	Enrasar el filtrado de papa para un volumen de 1 litro. Autoclavar a 121°C durante 15 min.

### Anexo 3. Tablas de porcentaje de inhibición de los diferentes filtrados obtenidos

\*S/A= sin agitación; C/A= con agitación

1/4=250 µL/mL, 1/8= 125 µL/mL, 1/16=60 µL/mL, 1/32= 30 µL/mL

**Tabla 1.** Porcentajes de inhibición de filtrados obtenidos con 24 horas incubación.

24 h ensayo/dil	celulas libres				cel. Encapsuladas			
	Extracto de cultivo S/A		Extracto de cultivo C/A		Extracto de cultivo S/A		Extracto de cultivo C/A	
	Diametro de inhibición (%)				Diametro de inhibición (%)			
	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)
1/4.	0	0	6,8	6,4	13,8	14,3	14,2	14,6
1/8.	0	0	8,2	8,7	12,7	9,0	17,2	17,7
1/16.	0	0	8,2	8,2	11,2	11,8	13,6	14,3
1/32.	0	0	0,0	0,0	10,4	10,8	0,0	0,0

Fuente: Elaboración propia

Los porcentajes de inhibición con los filtrados obtenidos tanto con células libres e inmovilizadas incubadas por 24 horas obtuvieron bajos porcentajes de inhibición.

**Tabla 2.** Porcentajes de inhibición de filtrados obtenidos con 30 horas incubación.

30 h	Celulas libres				Cel. Encapsuladas			
	Extracto de cultivo S/A		Extracto de cultivo C/A		Extracto de cultivo S/A		Extracto de cultivo C/A	
ensayo/dil	Diametro de inhibición (%)				Diametro de inhibición (%)			
	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)
1/4.	13,1	15,1	46,5	48,9	77,7	79,6	78,5	81,4
1/8.	11,4	12,4	35,4	38,2	77,6	80,5	79,3	82,1
1/16.	3,9	4,9	18,0	19,6	72,2	74,8	73,4	75,7
1/32.	1,3	1,9	16,1	17,9	67,2	68,3	68,7	70,6

Fuente: Elaboración propia

Los porcentajes de inhibición con los filtrados obtenidos tanto con células libres e inmovilizadas incubadas por 30 horas, se observa en el caso del filtrado obtenido con células libres obtuvieron porcentajes de inhibición menores al 50% y los filtrados obtenidos con las células inmovilizadas presentan porcentajes de inhibición mayores al 70% demostrando que con el mismo tiempo de cultivo la inmovilización es una condición que predispone a *Bacillus sp.* YHPJ a producir compuestos antimicrobianos en un menor tiempo de incubación.

**Tabla 3.** Porcentajes de inhibición de filtrados obtenidos con 36 horas incubación.

36 h	Celulas libres				Cel. Encapsuladas			
	Extracto de cultivo S/A		Extracto de cultivo C/A		Extracto de cultivo S/A		Extracto de cultivo C/A	
ensayo/dil	Diametro de inhibición (%)				Diametro de inhibición (%)			
	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)	7 (días)	15 (días)
1/4.	32,7	35,7	80,7	83,7	77,7	80,5	80,6	84,2
1/8.	34,4	36,2	78,7	81,2	80,3	83,4	80,4	84,1
1/16.	33,7	35,3	69,7	71,9	72,8	74,4	74,0	76,3
1/32.	28,0	28,9	55,7	57,6	66,1	67,8	68,1	70,2

Los porcentajes de inhibición que se observan en el caso del filtrado obtenido con células libres y sin agitación se obtuvieron porcentajes de inhibición menores al 50% a comparación a los porcentajes de inhibición obtenidos con los filtrados obtenidos con agitación los cuales fueron mayores al 60% determinando de esta forma que la agitación es una condición que predispone a las células libres de *Bacillus sp.* YHPJ a producir compuestos antimicrobianos.

En el caso de los filtrados obtenidos con las células inmovilizadas presentan porcentajes de inhibición mayores al 70% demostrando que con el mismo tiempo de cultivo la

inmovilización es una condición que predispone a *Bacillus* sp. YHPJ a producir compuestos antimicrobianos en un menor tiempo independiente de la agitación.

**Anexo 4.** Recuperación progresiva en el tiempo de los plantines de tomate evaluado durante 3 meses posteriores al tratamiento con los filtrados bacterianos de *Bacillus* sp. YHPJ.



Planta infectada



Planta luego de 15 días después del tratamiento



Planta luego de los 30 a 40 días



Planta tratada a los 50 días

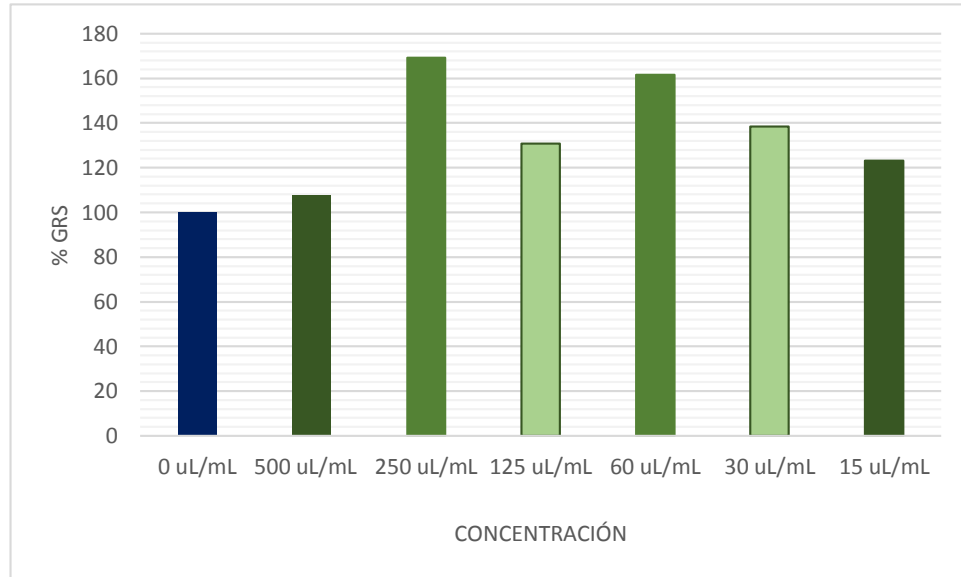


Planta tratada a los 70 días



Planta tratada a los 85 - 90 días

**Anexo 5.** Porcentaje de la capacidad germinativa de germinación relativa de semillas de tomate regados con los filtrados bioactivos de *Bacillus* sp. YHPJ. Inmovilizados a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 60, 30 y 15  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )



**Anexo 6.** Aplicaciones de *B. subtilis* para la ingeniería genética, producción de enzimas o productos químicos industriales, agricultura, medicina y biomateriales. Recuperado de *Bacillus subtilis*: a universal cell Factory for industry, agricultura, biomaterials and medicine (Su, Liu, Fang, & Zhang, 2020)

