



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL
CONTROL DE ENFERMEDADES EN POSCOSECHA DE
AGUACATE HASS**

Por

María Paulina Montoya Vargas

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería (Departamento de Ingeniería Química)

El Carmen de Viboral, Colombia

2021





Evaluación de bacterias antagonistas para el control de enfermedades en poscosecha de aguacate Hass

María Paulina Montoya Vargas

Informe de práctica como requisito para optar al título de: Ingeniera Bioquímica

Asesores

Juliana Osorio Echavarría
Ingeniera Química, Máster en Ciencias - Ingeniería

Lorena María López Luján
Biotecnóloga, Máster en Ciencias – Biotecnología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química.

El Carmen de Viboral, Colombia.

2021



Resumen

La comercialización de aguacate colombiano en mercados internacionales es afectada principalmente por la alta prevalencia de enfermedades fúngicas que se desarrollan en la etapa postcosecha. Entre las más frecuentes se encuentran la antracnosis y la pudrición peduncular, causadas por *Colletotrichum* sp. y *Lasiodiplodia* sp., respectivamente. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial antagonístico de aislamientos bacterianos en el control de enfermedades poscosecha de frutos de aguacate Hass. Inicialmente, se evaluó la actividad antagonística de 14 aislamientos bacterianos frente a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia* sp. mediante enfrentamientos duales. Los aislamientos FRB003-7, HOB002-72, FLB009-175, HOB009-258 y HOB008-290 presentaron un mayor potencial antagonístico generando un mayor halo de inhibición *in vitro*. Posteriormente, se demostró la actividad *in vivo* de las bacterias por medio de evaluaciones en fruto con infección artificial de los dos patógenos en estudio. Como resultado se pudo determinar que la aplicación del aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290 generó una protección a los frutos inoculados del 51% y 100% frente a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia* sp. respectivamente. Finalmente, se empleó la metodología de un factor a la vez para determinar fuente de carbono y nitrógeno adecuadas para incrementar la producción de endosporas en fermentación sumergida a partir del aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290, encontrando que la sacarosa y la caseína incrementaban la producción de endosporas hasta alcanzar una concentración de 3×10^{10} esporas/mL. De esta manera, se comprobó la actividad del aislamiento HOB008-290 contra los dos patógenos de interés con eficiencias comparables a las del fungicida comercial Prochloraz (Sportak®) y se logró un aumento en la producción de endosporas por parte de la bacteria.

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una importante fruta climatérica subtropical caracterizada por una cáscara verde y una pulpa cremosa y mantecosa [1]. Este fruto ha tenido una creciente aceptación por parte de los consumidores del mundo gracias a su contenido nutricional, a las diferentes opciones para su consumo en fresco y procesado y su uso en la industria cosmética [2]. El comercio mundial de aguacates frescos genera enormes ingresos, en su mayoría provenientes de exportación. En 2018, se generaron aproximadamente USD \$5,6 mil millones a partir de 6,4 millones de toneladas de productos de aguacate a nivel mundial y de esto, 2,4 millones de toneladas se destinaron a exportaciones [1]. Esto ha despertado el interés de países como México, República Dominicana, Perú, Chile y Colombia, los cuales han enfocado sus esfuerzos en aumentar el área cultivada y la calidad del aguacate obtenido con el propósito de cubrir la demanda mundial [3]. Entre enero y mayo del 2020, Colombia logró vender al exterior 30.344 toneladas de aguacate hass, lo que representó un incremento de 26,4%, respecto al mismo periodo del año anterior [4]. En este sentido, el rápido aumento del área plantada con aguacates en Colombia requiere el desarrollo y la implementación de tecnología



adecuada para planificar y gestionar los cultivos de manera sostenible [5]. Con esta finalidad, uno de los desafíos más importantes que enfrenta la industria del aguacate es el manejo de enfermedades postcosecha en pulpa y pedúnculo como la antracnosis causada por hongos del género *Colletotrichum* sp. y *Dothiorella* aromática, y la pudrición del extremo del tallo causada principalmente por *Thyronectria pseudotrichia*, *C. gloeosporioides*, *D. aromática*, *Phomopsis perseae* y *Lasiodiplodia theobromae*. Con porcentajes de incidencia del 29% y 15%, la antracnosis y la pudrición del extremo del tallo respectivamente, generan rechazos económicamente representativos del aguacate de exportación [6]. El control de estas enfermedades postcosecha se ha venido realizando con el uso de fungicidas protectantes como benomilo, mancozeb, carbendazim y tiabendazol [7]. Sudáfrica y otros países exportadores de aguacate aplican imidazol (procloraz) como fungicida comercial en la empacadora para el manejo del fruto durante el almacenamiento y el transporte [8]. Sin embargo, el uso de estos productos se ha visto cada vez más limitado debido a la generación de patógenos resistentes y al efecto adverso que pueden presentar para la salud humana y el medio ambiente [9]; además de que existen exigencias fitosanitarias y aduaneras en los países extranjeros, focos de exportación, que obligan a los productores colombianos a migrar hacia nuevos métodos de manejo postcosecha. Actualmente el control biológico se ha convertido en una estrategia efectiva para combatir las principales descomposiciones de frutas después de la cosecha. Por ejemplo, Granada et. al reportaron la efectividad del extracto de la bacteria *Serratia* sp. ARP5.1 para el control de las infecciones de podredumbre postcosecha en aguacate causadas por *C. gloeosporioides* [10]. De ahí, en el presente trabajo se propone evaluar bacterias antagonistas de la colección de microorganismos CIB pertenecientes al género *Bacillus* sp. para ser empleadas en el control de enfermedades en postcosecha de aguacate Hass, al mismo tiempo que, se mejore su producción a escala de Erlenmeyer. Lo anterior debido a que la transición e integración del uso de bioplaguicidas requiere de un incremento de la factibilidad técnica y económica del bioproceso [11].

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el potencial antagónico de aislamientos bacterianos en el control de enfermedades postcosecha de frutos de aguacate Hass.

Objetivos específicos

- Seleccionar los aislamientos bacterianos con el mayor potencial antagonista *in vitro* frente a los principales patógenos postcosecha de frutos de aguacate Hass.
- Evaluar la efectividad *in vivo* de las bacterias antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos de aguacate Hass.
- Determinar las fuentes de carbono y nitrógeno adecuadas para incrementar la formación de endosporas a partir de bacterias antagonistas a escala erlenmeyer.



Marco Teórico

El aguacate (*Persea americana* Mill) es una especie de planta de la familia Lauraceae que incluye tres razas geográficas y cultivares resultantes de la hibridación de dos o más razas, siendo el aguacate Hass el cultivar más comercial en el mundo [12]. El aguacate es una fruta energética con alto valor nutricional que aporta prácticamente todas las vitaminas requeridas por el organismo; a excepción de la vitamina B12, presente solo en el reino animal. También, contiene ácido ascórbico, vitamina B6, β -caroteno, potasio y magnesio [13]. Aproximadamente el 80% de la fruta comestible de aguacate consiste en agua (72%) y fibra dietética (6,8%) y ha sido reconocida por tener una amplia gama de efectos positivos en la salud [14]. Adicionalmente, contiene diferentes niveles de aceite en la pulpa, por lo que se usa ampliamente en las industrias farmacéutica y cosmética, y para obtener aceites comerciales parecidos al aceite de oliva, al tener una composición similar de ácidos grasos [15].

Debido a sus diferentes propiedades y aplicaciones, esta fruta tiene una demanda mundial en alza. De acuerdo con el sistema FAOSTAT de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura -FAO, en el año 2017 el mayor productor del mundo de aguacate fue México con 2 millones de toneladas, seguido de República Dominicana (643 mil toneladas), Perú (487 mil toneladas) y Colombia (403 mil toneladas). El país se logró posicionar en el tercer lugar en relación con el área cosechada con 6% del área mundial. Se estima que existen alrededor de 13.000 productores nacionales en cerca de 18.113 unidades productivas cuya principal actividad económica se deriva de este cultivo [16].

La producción y exportación de los aguacates debe realizarse de manera sostenible, mediante la implementación de prácticas de manejo fitosanitario que permitan que el producto cumpla los requisitos de admisibilidad en los mercados estratégicos definidos. Sin embargo, existen limitaciones que implican una disminución de la calidad de los aguacates y, por tanto, de la productividad de esta industria. La vida postcosecha de los aguacates se ve afectada por hongos patógenos, responsables de enfermedades importantes como la antracnosis y la podredumbre del tallo que, generan serias pérdidas durante las exportaciones. La antracnosis se caracteriza por presentar lesiones oscuras y hundidas, circulares elipsoidales, con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas [17]; en el caso de la pudrición del extremo del tallo, los síntomas son la descomposición, decoloración y ablandamiento de la fruta, e internamente los haces vasculares pueden oscurecerse [18]. El control de estas enfermedades se ha logrado mediante la aplicación previa a la cosecha de aerosoles fungicidas. Estos fungicidas, particularmente el oxiclورو de cobre y el captafol, dejan residuos visibles de pulverización en la fruta cosechada, que no se eliminan fácilmente mediante los procedimientos estándar de empaque. Esto da como resultado el rechazo del 11,5 al 19,4 por ciento de la fruta para exportación [19]. Por su parte, la aplicación del procloraz, un fungicida imidazol no sistémico, se ha visto restringida puesto que La Agencia de Protección



Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha definido el metabolito procloraz menor 2,4,6-TCP como un probable carcinógeno humano (Grupo B2), que figura como un contaminante prioritario [20].

Teniendo en cuenta el efecto adverso que pueden generar los productos de síntesis química sobre la salud humana y el medio ambiente, la industria de los bioinsumos está intentando encontrar soluciones alternas a esta problemática y migrar hacia alternativas más seguras y ecológicas. En este aspecto, la acción antifúngica de los aceites esenciales de plantas está bien documentada y se ha informado de su uso en el manejo de la antracnosis en aguacate [21]. También, ha sido exitosa la aplicación de antagonistas después de la cosecha [9]; específicamente, las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) constituyen una alternativa al uso de fertilizantes y agroquímicos para mejorar la producción de especies como el aguacate (*Persea americana*). Dentro de los PGPR se encuentran los *Bacillus* sp. que, al ser reconocidos como microorganismos seguros para su aplicación en la industria alimentaria y para el desarrollo de productos fitosanitarios naturales [22], son el género más explotado, con un 85% de los productos bacterianos, debido a su gran versatilidad metabólica que le permiten llevar a cabo el control biológico de plagas y enfermedades por diversos mecanismos [11].

Los mecanismos de acción se pueden dividir en: producción de compuestos antimicrobianos, como son péptidos de síntesis no ribosomal (NRPs) y policétidos (PKs); producción de hormonas, capacidad de colonización, formación de biopelículas y competencia por espacio y nutrientes; síntesis de enzimas líticas como quitinasas, glucanasas, proteasas y acil homoserin lactonasas (AHSL); producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs); e inducción de resistencia sistémica (ISR) [23]. De este modo, los *Bacillus* sp. inducen diversas características fisiológicas en el metabolismo de la planta huésped sin causar efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana [22]. Por ejemplo, L. Korsten y E.E. De Jager, demostraron en su estudio la producción de antibióticos u otras sustancias inhibitoras por *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* contra varios patógenos de la postcosecha de aguacate, utilizando la técnica de cultivo dual y el método indirecto de placa de agar. Adicionalmente, según los autores, fue probable que *B. subtilis* haya inhibido a los patógenos mediante competencia por nutrientes [24].

Además, para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, *Bacillus* sp. tiene la capacidad de inducir el proceso de esporulación, lo que les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo [25]. Las endosporas exhiben propiedades de resistencia extraordinarias a la radiación ultravioleta (UV), los productos químicos (como el peróxido y el hipoclorito), el calor extremo y otras tensiones y, están metabólicamente latentes y parcialmente deshidratadas, lo que probablemente permita su supervivencia en entornos hostiles y libres de nutrientes [26]. Por tanto, las endosporas se han utilizado en productos comerciales de control biológico debido a la alta estabilidad que les confiere en el tiempo y en el campo.



Metodología

1. Medios de cultivo y reactivos

Los medios de cultivo usados para la activación y el repique de los microorganismos fueron Agar y Caldo Tripticasa de soya (TSA y TSB), Agar y Caldo Papa Dextrosa (PDA y PDB). Merck®. Para las fermentaciones de las bacterias se usó el medio CIB-1 compuesto por: 0,03 gL⁻¹ MnSO₄·H₂O, 0,041 gL⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 0,5 gL⁻¹ KH₂PO₄, 0,5 gL⁻¹ K₂HPO₄, 1 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 8 gL⁻¹ Extracto de Levadura, 4 gL⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 8 gL⁻¹ Glucosa Anhidra.

2. Microorganismos

Se emplearon los aislamientos bacterianos con potencial antagonista de patógenos de aguacate pertenecientes a la colección de la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico (UFCB) de la CIB. Estos se reactivaron en 5 mL de medio TSB y se incubaron a 30°C por 24h. Luego, se repicaron y se conservaron en Agar blando a 4°C y glicerol a -20°C. Adicionalmente, se reactivaron los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Lasiodiplodia* sp. pertenecientes a la colección de patógenos de postcosecha de aguacate de la UFCB - CIB. Estos se reactivaron en PDA y se conservaron a 25°C por 6 días para luego, ser conservados en agua destilada estéril.

3. Ensayos de antagonismo *in vitro*

Los ensayos de antagonismo se realizaron mediante enfrentamientos duales [27]. Para determinar el efecto inhibitorio, los fitopatógenos fueron enfrentados con cada bacteria antagonista en cajas de petri que contenían PDA divididas en 4 cuadrantes, en el centro se sembró un fragmento del hongo de 5mm y a 3cm de este se sembró 1cm de las bacterias, una por cada cuadrante. El control consistió en el crecimiento de un fragmento de hongo sin bacterias. Posteriormente, se determinó el grado de inhibición que generó cada aislamiento bacteriano luego de 8 días de incubación a 25 °C en una escala de 0 a 3 (0= sin halo de inhibición, 1=halo de inhibición de 0.1cm a 1cm, 2= halo de inhibición de 1 a 2cm y 3= halo de inhibición de 2 a 3cm). Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado.

4. Esporulación de las bacterias con el mayor potencial *in vitro*

Se prepararon inóculos de 6mL de cada bacteria en caldo TSB y se incubaron durante 24h a 25°C y 135rpm. Luego, cada inóculo se agregó a erlenmeyers de 1000mL que contenían 200mL del medio específico para producción de endospora CIB-1. Cada Erlenmeyer se incubó a 30°C y 300rpm. Para la medición de endosporas se realizó una tinción verde malaquita siguiendo la metodología de coloración Schaeffer-Fulton. Las observaciones se hicieron por inmersión durante 4 días.

5. Pruebas de eficacia *in vivo*

Los frutos de aguacate Hass sanos y en madurez fisiológica seleccionados para la inoculación se desinfectaron, lavándolos inicialmente con jabón desengrasante, enjuagando y

sumergiéndolos en hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Por último, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Adicionalmente, se prepararon suspensiones de los hongos *Colletotrichum gloesporoides* y *Lasiodiplodia* sp. pertenecientes a la colección de patógenos postcosecha CIB llevándolos en una solución de Tween 80 (0,05%) a una concentración de 1×10^4 esporas/mL. También, se prepararon suspensiones bacterianas en agua destilada estéril a 1×10^7 células/mL. Para el montaje de las pruebas, se tomaron los frutos desinfectados y se lesionaron por punción en la superficie de las dos caras laterales empleando un asa de punta con una profundidad de 0,5mm. Cada fruto fue tratado en una de las caras con la suspensión del aislamiento bacteriano a evaluar o el fungicida Prochloraz (20µL), se dejaron secando durante 1h y posteriormente fueron inoculados en ambas caras con el patógeno seleccionado (20µL). Para el control general del ensayo, se usaron 10 frutos, los cuales se hirieron por ambos lados y no recibieron ningún inóculo. Cuando los aguacates alcanzaron la madurez de consumo, se cortaron longitudinalmente para medir el diámetro del desarrollo de las lesiones que ocasionan las enfermedades postcosecha. Luego, se determinó el porcentaje de protección generado por la aplicación de los aislamientos bacterianos frente al desarrollo de la enfermedad ocasionada por los patógenos inoculados. La tabla 1 muestra los aislamientos bacterianos evaluados y los patógenos empleados para la infección.

Tabla 1. Aislamientos bacterianos evaluados y patógenos seleccionados.

BACTERIAS	PATÓGENOS	
FRB003-7	SR14	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
HOB002-72	BR45	<i>Collectotrichum</i> sp.
FLB009-175	NOTA: cada aislamiento bacteriano se evaluó frente a ambos patógenos inoculados.	
HOB009-258		
HOB008-290		

Para el análisis estadístico, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias entre los porcentajes de protección de los aislamientos frente a cada uno de los hongos fitopatógenos evaluados.

6. Mecanismo de acción de *Bacillus* sp. 290

Se preparó un inóculo de 5 mL de la bacteria a ser crecida en caldo TSB y se incubó durante 24h a 30°C. Posteriormente, se agregó 1mL del inóculo en 50mL de medio CIB-1 para ser incubado a 30°C y 190rpm durante 48h. Pasado dicho tiempo, se tomó una muestra de 2mL de la fermentación que se centrifugó a 12000rpm y 5min. Después de obtenido, el sobrenadante fue separado del material sedimentado y diluido 1/10 y 1/100 mientras que, el material celular se ajustó a una concentración de 1×10^8 células/mL. También, se preparó una suspensión conidial (10^4 conidios/mL) de *Colletotrichum gloesporoides*. crecido en medio PDA. Las frutas seleccionadas para la inoculación y los controles se lavaron y desinfectaron con jabón e hipoclorito de sodio al 1%. Las inoculaciones se llevaron a cabo generando una herida en la



parte central del aguacate con un asa estéril a una profundidad de 0,5mm. A continuación, se colocaron 20µL de cada tratamiento, consistentes en: sobrenadante directo, sobrenadante 1/10, sobrenadante 1/100, bacteria, y prochloraz; se dejaron secar y se inocularon 20 µL del patógeno *Colletotrichum gloeosporoides*. Los controles se inocularon de la misma manera, pero con el hongo y agua en el lado contrario del fruto y cada tratamiento contó con cinco repeticiones. Las frutas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 8 días y se cortaron longitudinalmente para medir el diámetro del avance de la infección. Finalmente, con los porcentajes de protección de los tratamientos, se realizó una ANOVA y una prueba de comparación de medias HSD.

7. Cinética de crecimiento y formación de endosporas.

Se realizó una cinética de crecimiento y formación de endosporas en erlenmeyers blafeados de 125mL que contenían 49mL del medio CIB-1 sin modificaciones e inoculados con 1mL de la bacteria, por triplicado. Para la preparación del inóculo, se transfirió una colonia de la cepa cultivada en TSA a erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de TSB y se incubó a 30°C y 150 rpm durante 24h. Las fermentaciones de la cinética se incubaron durante 48h a 190rpm y 30°C.

8. Evaluación de fuentes de carbono y nitrógeno.

Se estimó el efecto de la adición de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de endosporas por parte de *Bacillus* sp. HOB008-290. Se evaluaron como fuentes de carbono glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, glicerol y almidón de yuca, a una concentración de 8g/L. Luego de definir la fuente de carbono, se determinó la influencia de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno evaluadas fueron extracto de levadura, proteína aislada de soya, urea, peptona, nitrato de amonio, caseína, extracto de malta, nitrato de potasio y sulfato de amonio; a la concentración de 8g/L. En esta fermentación se tuvo en cuenta la adición de la fuente de carbono identificada como la más adecuada. El montaje de los experimentos se realizó en erlenmeyers bañados de 125 mL con el medio de cultivo base, CIB-1. Luego, se adicionó a cada erlenmeyer una concentración de la fuente de carbono o de nitrógeno a evaluar y el inóculo al 2%, previamente crecido en TSB. En cada experimento se incluyó un control absoluto que contenía el medio base sin fuentes de carbono o nitrógeno adicionadas. Los Erlenmeyer se mantuvieron en incubación por 52h a 30°C y 190rpm. Los tratamientos se realizaron por triplicado y luego se determinaron diferencias estadísticas por medio de una ANOVA con un $p \geq 0.05$, seguida de pruebas de comparación de medias HSD.

9. Métodos analíticos

La biomasa en los medio de cultivo se determinó mediante la metodología de densidad óptica a 595nm empleando microplacas de 96 pozos y un lector de microplacas BioRad modelo



680XR., teniendo como referencia la curva patrón de McFarland que fue ajustada mediante la ecuación:

$$Y = 2E-10x + 0,0768 \quad \text{con un coeficiente } R^2=0,9665 \quad (1)$$

Las densidades de células de esporas se determinaron mediante la técnica de placa extendida, para lo cual las muestras diluidas en serie se sometieron a choque térmico (80 ° C, 20 min), se colocaron en baño de hielo durante 5 min y luego se sembraron en TSA. La variable de respuesta (densidad de células de esporas) se estimó después de 48h de incubación a 30°C para aquellas diluciones que contenían 30-300 UFC/mL [28].

Resultados y análisis

Ensayos de antagonismo *in vitro*

Se evaluaron 14 bacterias, frente a los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia* sp. (SR14), *Colletotrichum gloeosporioides* (BR45), *Colletotrichum* sp. (BR44), *Diaporthe sojae* (SR34) y un aislamiento desconocido (SR51), los resultados se observan en la Tabla 2. Entre los cuales se destaca que el 79% de los aislamientos probados presentaron halos de inhibición contra *Lasiodiplodia* sp., 71% contra *Colletotrichum gloeosporioides*, 93% contra el aislamiento sin identificar SR51, 79% contra *Diaporthe sojae* y 93% contra *Colletotrichum* sp. El mayor grado de inhibición frente a los fitopatógenos los presentaron las bacterias FRB003-7, HOB002-72, FLB009-175, HOB009-258 y HOB008-290. De ahí, estas bacterias fueron seleccionadas para la siguiente fase experimental del proyecto.

Tabla 2. Grado de inhibición de aislamientos bacterianos frente a fitopatógenos.

Bacteria	<i>Lasiodiplodia</i> (SR14)	<i>C. gloeosporioides</i> (BR45)	NN (SR51)	<i>Diaporthe</i> (SR34)	<i>Colletotrichum</i> sp. (BR44)
258	++	++	++	+++	++
202	-	-	++	-	++
rsf08	-	-	-	-	-
154b	-	-	++	-	+++
195	++	++	++	+++	+++
110	++	++	++	+++	++
223	++	++	++	+++	+++
185	++	+	+++	+++	+++
72	++	++	+++	+++	+++
7	++	++	++	+++	++
21	++	-	++	+++	+++
ecf20	++	+	+++	+++	+++
175	++	+++	+++	+++	+++
290	++	++	++	+++	++

Aunque se evaluaron diferentes patógenos, en la figura 1 solo se presentan los dos patógenos que son de mayor interés en la presente investigación y los enfrentamientos realizados con los 14 aislamientos de la colección UFCB-CIB.

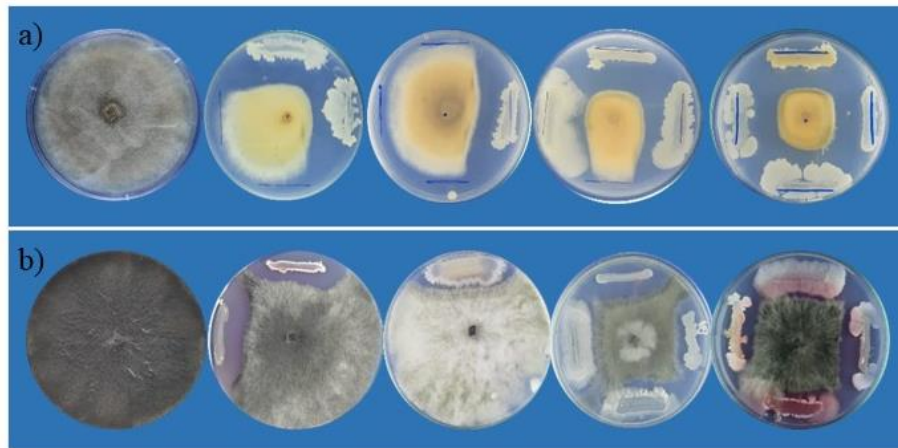


Figura 1. Pruebas de antagonismo. a) *C.gloeosporioides* control y tratamiento de bacterias aisladas. b) *Lasiodiplodia* sp. control y tratamiento de bacterias aisladas.

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es uno de los patógenos de plantas más comunes y de mayor distribución en el mundo, causante de la antracnosis, que es considerada la más importante enfermedad de frutos en regiones tropicales y subtropicales [29]. Por su parte, en los últimos años, se ha observado una fuerte incidencia de lesiones o chancros en las ramas del aguacate con presencia de exudaciones blanquecinas que además, pueden ocasionar pudrición del fruto, lo que ha sido atribuido al hongo *Lasiodiplodia* sp. [30].

Los resultados del ensayo de cultivo dual para estos hongos mostraron que los microorganismos antagonistas inhibieron el crecimiento de micelio con eficiencias variables. Cuatro de los antagonistas presentaron una inhibición grado cero (sin halo); sin embargo, los demás aislamientos de *Bacillus* fueron capaces de reducir el crecimiento y desarrollo de los patógenos con halos de inhibición entre 1 a 2cm, lo que permite visualizar que los microorganismos pertenecientes a este género son buenos candidatos en el control biológico de fitopatógenos causantes de enfermedades en la postcosecha de aguacate.

Esporulación de las bacterias con el mayor potencial *in vitro*

Mediante el ensayo realizado para observar si efectivamente había formación de endosporas, se evidenció una alta capacidad de esporulación de los 5 aislamientos bacterianos seleccionados en las pruebas de antagonismo *in vitro*. Las esporas aumentaron con el tiempo de fermentación y al ser observadas en el microscopio, pudieron distinguirse de la célula vegetativa, como se muestra en la figura 2.

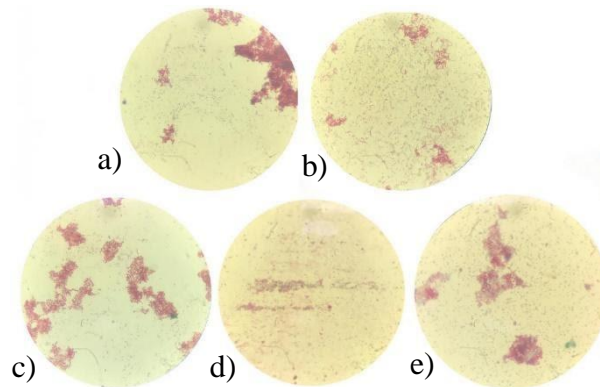


Figura 2. Formación de endosporas después de 4 días de fermentación. Aislamientos a) FRB003-7, b) HOB002-72, c) FLB009-175, d) HOB009-258, e) HOB008-290. Células vegetativas teñidas de rosado, endosporas teñidas de verde.

En este sentido, es factible trabajar en un producto biológico basado en *Bacillus* sp. como controlador de las enfermedades postcosecha en aguacate Hass, pues, además de su rápido crecimiento y capacidad para crecer de manera eficiente en medios de bajo costo, forman endosporas que pueden sobrevivir en condiciones controladas de laboratorio durante varias décadas, y tal vez incluso más en el medio ambiente [31], favoreciendo así su aplicación agrícola.

También, con los resultados obtenidos se valida que el medio CIB-1, previamente desarrollado en la unidad de fitosanidad y control biológico, es apto para la esporulación del género *Bacillus* y que en general, elementos como Ca, Mn, Mg, Fe y Zn en concentraciones apropiadas son esenciales en la esporulación ya que están presentes en las capas de esporas y le permiten resistir altas temperaturas [28]. Específicamente, los iones divalentes inducen la esporulación y aumentan la resistencia térmica de las esporas, el calcio es clave para el desarrollo de resistencia al inducir genes específicos involucrados en la síntesis de la capa de esporas, y el potasio y el manganeso estimulan la absorción de potasio. La adición de Mn^{2+} al medio de esporulación promueve la eficiencia de la esporulación y aumenta la resistencia al calor húmedo al afectar la composición de peptidoglicano y la deshidratación del núcleo [32]. Sin embargo, se debe considerar que cada cepa en particular tiene sus propios requisitos y condiciones óptimas por lo que es relevante estudiar la posibilidad de mejorar el medio de esporulación empleado.

Pruebas de eficacia *in vivo*

En este ensayo se pudo determinar la actividad de los aislamientos frente a los patógenos inoculados cuando se compararon los resultados con la cara tratada y la cara no tratada tomada como control, en la cuál se observa un mayor de crecimiento de los hongos (Figuras 3 y 4). Todos los aislamientos evaluados presentaron un nivel de protección de los frutos inhibiendo

el desarrollo de los patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasodiopodia* sp. El fungicida comercial Sportak® (Prochloraz) presentó mayor actividad inhibitoria evitando completamente el desarrollo de los patógenos inoculados con un porcentaje de protección de los frutos del 100%. Los aislamientos FRB003-7, HOB002-72, FLB009-175 y HOB008-290 presentaron un porcentaje de protección frente a la inhibición del desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* en el fruto del 40 al 60%. Los aislamientos bacterianos FLB009-175 y HOB008-290 presentaron un porcentaje de protección frente al desarrollo del patógeno *Lasodiopodia* sp. cercano al 100% igualando el efecto del fungicida Prochloraz. Así, este ensayo permitió determinar la actividad inhibitoria de patógenos postcosecha *in vivo* que pueden presentar las bacterias pertenecientes a la colección CIB seleccionadas y su potencial para escalado y producción en masa que permita el desarrollo de un potencial producto para comercialización.

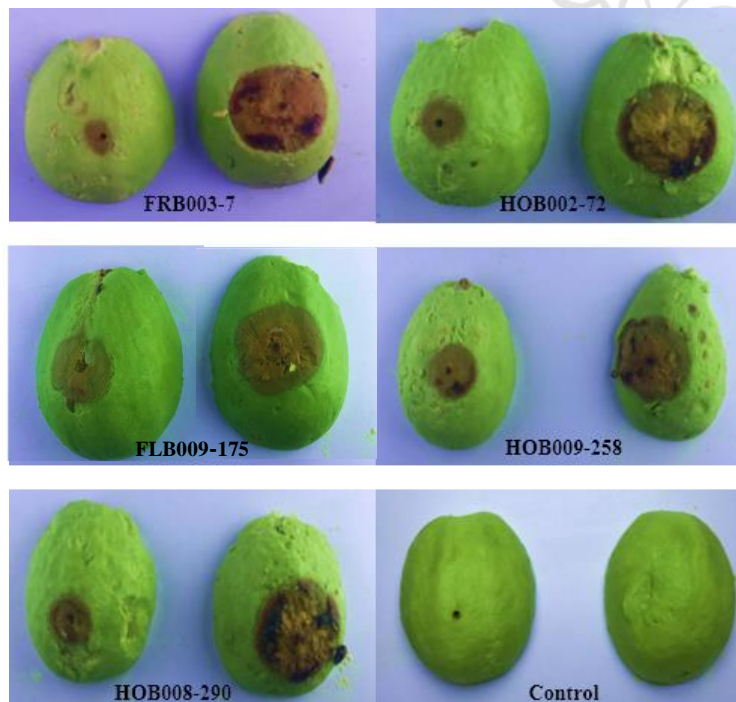


Figura 3. Registro fotográfico. Frutos inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratados con los aislamientos bacterianos. La cara izquierda corresponde al lado inoculado y tratado. La cara

derecha corresponde al lado inoculado y no tratado (control).

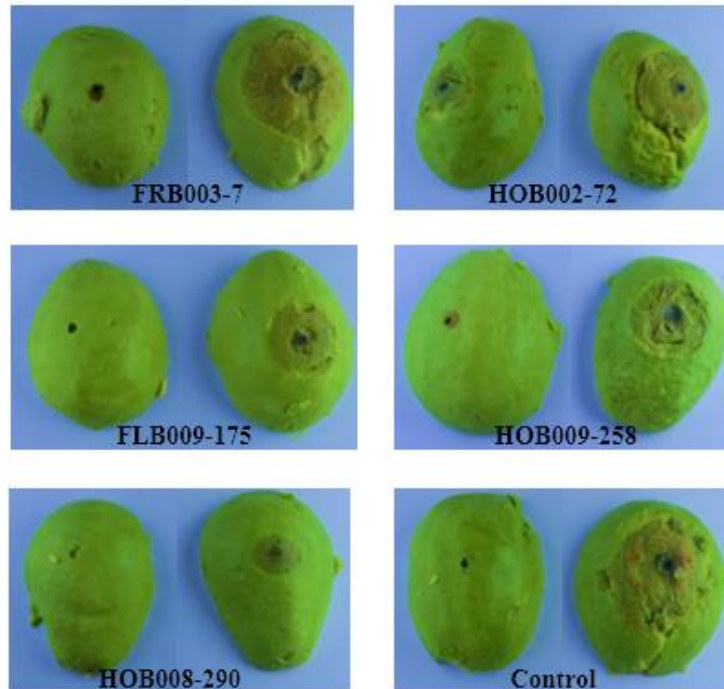


Figura 4. Registro fotográfico. Frutos inoculados con *Lasodiopodia* sp. y tratados con los aislamientos bacterianos. La cara izquierda corresponde al lado inoculado y tratado. La cara derecha corresponde al lado inoculado y no tratado (control).

Los datos del porcentaje de protección se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% y un análisis de medias HSD haciendo uso del software RStudio. Las pruebas de normalidad de los residuales y homogeneidad de varianza se realizaron a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 5 y 6.

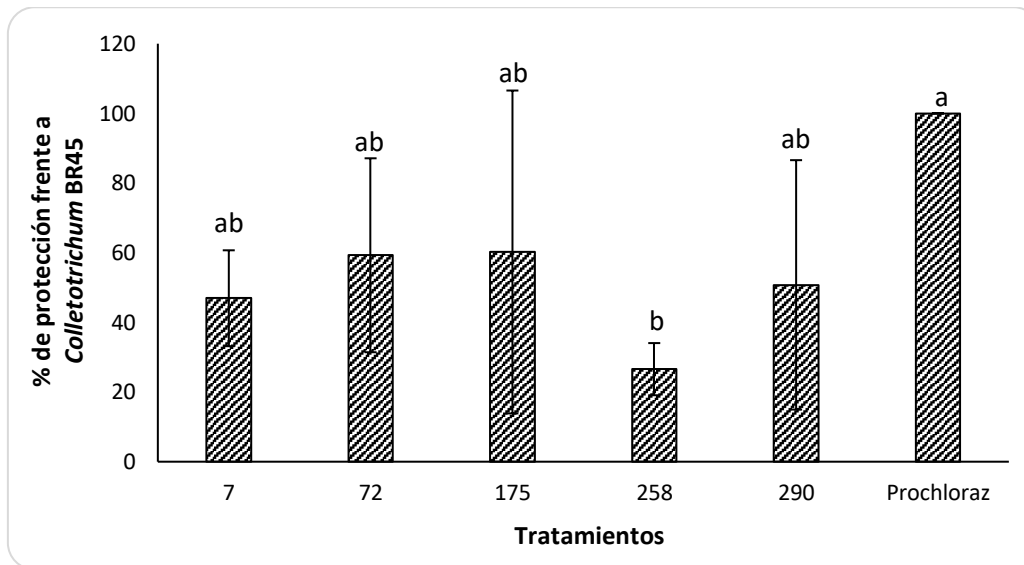


Figura 5. Porcentaje de protección de los frutos inoculados con los aislamientos bacterianos seleccionados frente al desarrollo del patógeno poscosecha *Colletotrichum gloeosporioides*. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0.05$ por HSD test.

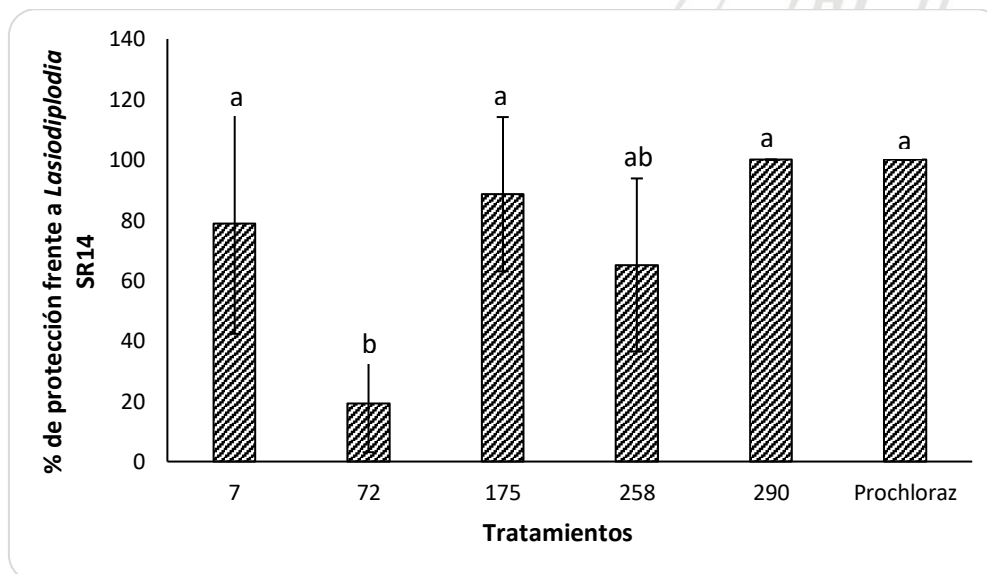


Figura 6. Porcentaje de protección de los frutos inoculados con los aislamientos bacterianos seleccionados frente al desarrollo del patógeno poscosecha SR14 *Lasiodiplodia* sp. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0.05$ por HSD test.

No se evidenciaron diferencias estadística significativa entre los tratamientos debido a las desviaciones presentes en el experimento que, se relacionan directamente con la limitación en el número de unidades asignadas a los diferentes grupos experimentales que dependió de la disponibilidad de frutos, costos del experimento, tiempo y la capacidad de evaluación. También, se usó material experimental no homogéneo por la variabilidad existente en las características de los frutos empleados, principalmente en el estado de madurez. Además, no se



pudo asegurar el control de factores externos como por ejemplo un adecuado manejo durante el transporte de los frutos dado que, al sufrir golpes se pueden generar puntos de entrada para otros patógenos. No obstante, los datos son concluyentes y tienen confiabilidad bajo las condiciones específicas del experimento realizado. De ahí, los aislamientos FLB009-175 y HOB008-290 mostraron un mayor porcentaje de protección frente a los patógenos evaluados. Se seleccionó el aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290 debido a que presenta mayor interés para el grupo de investigación por haber sido objeto de estudio en trabajos anteriores, además de que ha demostrado otras características como una buena capacidad para formar endosporas (48 horas), una fácil manipulación y un rápido crecimiento, que pueden ser interesantes en la industria de los productos biotecnológicos a base de bacterias.

Del mismo modo, se puede concluir que los cinco aislamientos seleccionados en los ensayos *in vitro* mantienen su actividad a nivel *in vivo*, lo que significa que todas las bacterias evaluadas en este proyecto, tienen potencial para ser empleadas en el desarrollo de productos biocontroladores de plagas en aguacate, corroborando así la afirmación de que en el suelo y la rizósfera se encuentran una gran variedad de microorganismos antagonistas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos [27]. Los resultados también permitieron confirmar que los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia* sp pertenecientes a la CIB son patogénicos. Es decir, fueron capaces de producir la infección en frutos de aguacate por la metodología utilizada.

Considerando que son pocas las investigaciones generadas por grupos y centros de investigaciones del país que contribuyan al conocimiento y uso de la diversidad de bacterias endófitas asociadas a especies vegetales en el país, como el aguacate [33], el trabajo desarrollado aporta en la búsqueda de diversidad de bacterias endófitas que permitan tanto reducir las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades postcosecha como el uso de fungicidas químicos que contaminan el medio ambiente, promueven el surgimiento de patógenos resistentes e incluso son perjudiciales para la salud.

Mecanismo de acción de HOB008-290 frente a *Colletotrichum gloeosporoides*

Mediante este ensayo se buscó dilucidar el modo de acción de la bacteria *Bacillus* sp. HOB008-290 frente al patógeno *Colletotrichum gloeosporoides*. Los resultados permiten concluir que el mecanismo por el cual la bacteria es capaz de ejercer un biocontrol del organismo fitopatógeno es complejo, pues no sólo estaría relacionado con la producción de compuestos antimicrobianos presentes en el sobrenadante de la fermentación, sino también con otros mecanismos como parasitismo directo, competencia por nutrientes y estimulación de las defensas del huésped relacionados directamente con la biomasa y las endosporas. En la figura 7 se evidencia entonces una reducción del diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en las caras en las que se aplicó el sobrenadante de la fermentación o la biomasa, en comparación con las caras no

tratadas. En este sentido, muy probablemente un biocontrol efectivo está asociado a la acción sinérgica de varios mecanismos [23].



Figura 7. Registro fotográfico. Frutos inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratados con el aislamiento bacteriano HOB008-290. SD: Sobrenadante directo de la fermentación, 1/10 y 1/100: Sobrenadante de la fermentación diluido, HOB008-290: Fermentación ajustada a 1×10^8 células/mL. La cara izquierda corresponde al lado inoculado y tratado. La cara derecha corresponde al lado inoculado y no tratado (control).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas como puede verse en la figura 8. El sobrenadante libre de células diluido 1 en 100 junto con el material celular (endosporas y células vegetativas) representaron un mayor porcentaje de protección de los frutos. Sin embargo, es necesario realizar una futura identificación del aislamiento a nivel de especie y la caracterización de sus metabolitos, puesto que los resultados sugieren que el microorganismo de estudio produce metabolitos secundarios y compuestos biológicamente activos con gran actividad antibiótica, posiblemente iturinas, fengicinas y surfactinas.

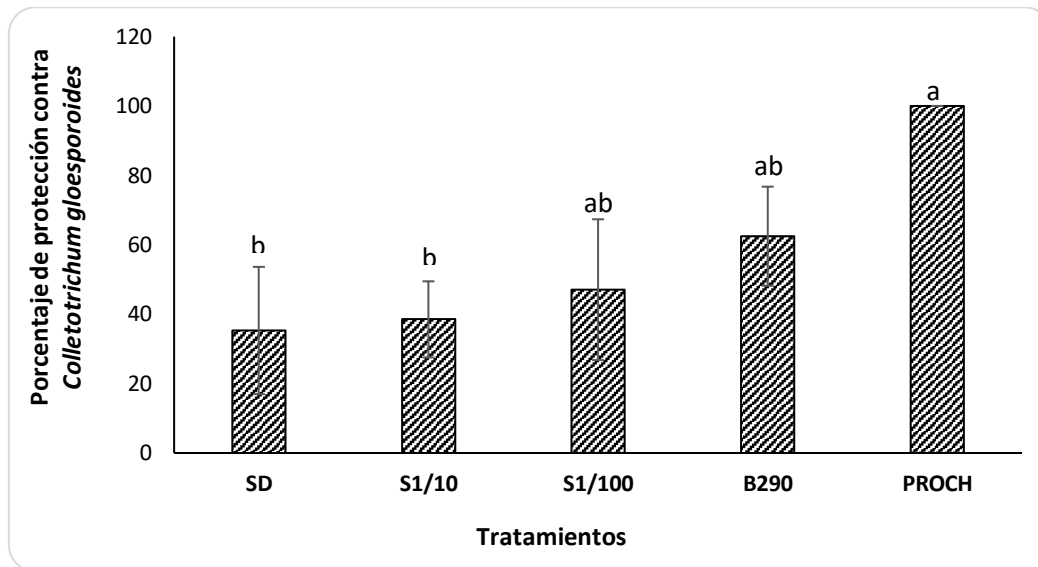


Figura 8. Porcentaje de protección de los frutos inoculados con los diferentes tratamientos a partir de la fermentación de la bacteria HOB008-290 frente al desarrollo del patógeno poscosecha *Colletotrichum gloeosporioides*. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0.05$ por HSD test.

En general, el uso de microorganismos que producen compuestos antifúngicos que inhiben la germinación de las conidias se ha considerado un medio potencial de control biológico de las enfermedades fúngicas. Romero et al., determinaron la presencia de antibióticos lipopéptidos en extractos butanólicos obtenidos de cultivos líquidos de cepas de *B. subtilis*. Los extractos lograron reducir con éxito la germinación de los conidios de *P. fusca* a niveles similares a los obtenidos previamente mediante el tratamiento con células vegetativas [34]. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el presente trabajo donde efectivamente se encontró una acción controladora tanto por parte de la biomasa como de los sobrenadantes de la fermentación, en los que presuntamente hay presencia de compuestos activos.

Después de comprobar que las células vegetales tienen acción controladora sobre el patógeno en condiciones *in vivo*, se define como variable respuesta para la búsqueda de los componentes más adecuados para el crecimiento de la bacteria, la formación de endosporas dado que es sabido que estas son el principal ingrediente activo de los formulados, confiriéndoles una mayor viabilidad en el tiempo [11]. Actualmente, se encuentran en el mercado varios productos biológicos basados en microorganismos del género *Bacillus*, por ejemplo el producto Rhapsody® tiene como componente activo la cepa *B.subtilis* QST173 y el producto Kodiak® es elaborado a partir de la cepa *B.subtilis* GB03 [35].

Cinética de producción de biomasa y formación de endosporas por HOB008-290

La cinética presentada en la figura 9, permite diferenciar un crecimiento vegetativo exponencial hasta las 18 horas de fermentación, comenzando a observarse células esporuladas a partir de las 12 horas hasta las 39 horas de fermentación. También, se puede apreciar una fase lag corta de aproximadamente 2 horas, esto debido a que la fuente de carbono preferida para muchas bacterias es la glucosa, que mantiene una tasa de crecimiento más rápida en comparación con otros azúcares [36]. Por su parte, la fase exponencial, demuestra la replicación de la bacteria entre un lapso de 15 horas posterior a la fase Lag, donde se da un aumento en UFC/mL hasta alcanzar una concentración de 5×10^9 células/mL.

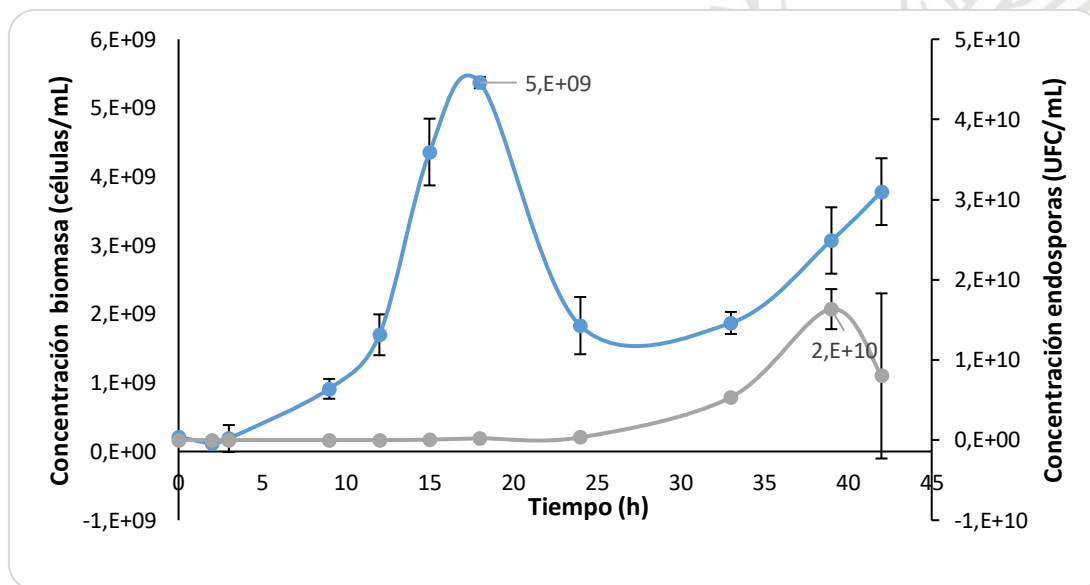


Figura 9. Cinética de producción de biomasa y de endosporas a partir de *Bacillus* sp. HOB008-290 en fermentación líquida usando el medio de cultivo CIB-1. Donde la biomasa corresponde a la línea azul y las endosporas a la línea gris.

Aunque se evidencia una caída de la producción de biomasa a las 24h, en la curva presentada no es posible identificar con claridad las fases de latencia y muerte. No obstante, se observa un descenso que podría estar determinado por el consumo de sustrato, la disminución de factores esenciales para la respiración; aumento en la cantidad de otros metabolitos que pueden ser sustancias tóxicas y variación del pH hacia la acidez [37]. Es recomendable cuantificar el consumo de sustrato, de manera que se puedan correlacionar concretamente los parámetros más relevantes en una fermentación. No se realizó esta medición debido a que en el momento del experimento no se contaba con los medios, además de que la finalidad principal era tener una aproximación del ciclo de esporulación de la bacteria en estudio.

En condiciones ideales, el cultivo iniciará la esporulación a una densidad celular de aproximadamente 1×10^8 células/mL. En este estudio, la esporulación inició cuando la

concentración de células era de 1×10^9 células/mL, notándose un aumento acelerado de la formación de endosporas después de que las células comenzaron a ingresar en la fase estacionaria. Se logró una concentración máxima de esporas de 2×10^{10} células/mL a las 39h de fermentación, lo cual refleja una alta eficiencia de esporulación gracias a que se obtuvo un cultivo de alta densidad celular, lo que hace apto el proceso para ser llevado a escala industrial [38]. A partir de este ensayo se establece un tiempo de fermentación de 48h, pues es suficiente para llegar a una concentración alta de biomasa y de endosporas.

Evaluación de fuentes de carbono y nitrógeno

Se evaluó el efecto de la adición de diferentes suplementos de carbono y nitrógeno en la producción de endosporas a partir de *Bacillus* sp. HOB008-290 en fermentación en estado líquido usando el medio CIB-1 como base. La fuente de carbono que favoreció más la producción de endosporas por HOB008-290 fue la sacarosa. El glicerol puro también incrementó la formación de endosporas; sin embargo, exhibe un costo superior con relación a la sacarosa [39, 40]. Se podría usar el glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel pero, se conoce que genera factores de estrés derivados de la acumulación de agentes tóxicos en el medio de fermentación. De ahí, autores han informado de un deterioro de los parámetros cinéticos en una fermentación realizada con glicerol crudo en comparación con el glicerol puro [41]. Adicionalmente, aunque ambas fuentes exhibieron un comportamiento similar sobre la producción de biomasa (Figura 10), sigue primando la sacarosa dado que el glicerol es de difícil manipulación debido a sus propiedades físicas, como la viscosidad.

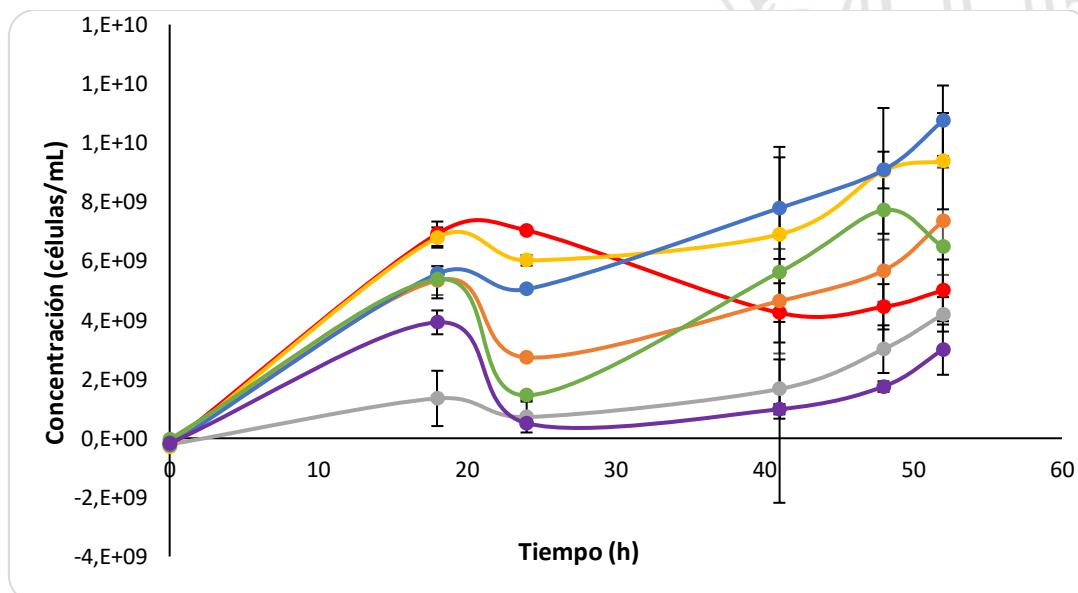


Figura 10. Efecto de la adición de diferentes suplementos de carbono a la fermentación en estado líquido sobre la producción de biomasa por el aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290. Los colores de las líneas corresponden a las diferentes fuentes de carbono evaluadas: Rojo: glucosa, amarillo: sacarosa, azul: glicerol, naranja: maltosa, verde: almidón, morado: sin fuente de carbono y gris: lactosa.

Los suplementos glucosa, maltosa, lactosa, almidón y el control sin adición de suplemento de fuente de carbono al medio base CIB-1, no presentaron un efecto en la producción de endosporas por parte de la bacteria en fermentación en estado líquido, por lo cual no se pudo observar un incremento significativo en la concentración luego de su adición. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó la sacarosa a una concentración de 8g/L como suplemento de carbono adecuado para favorecer la producción de endosporas en *Bacillus* sp. HOB008-290. Los resultados obtenidos luego de la adición de sacarosa mostraron diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos (Figura 11).

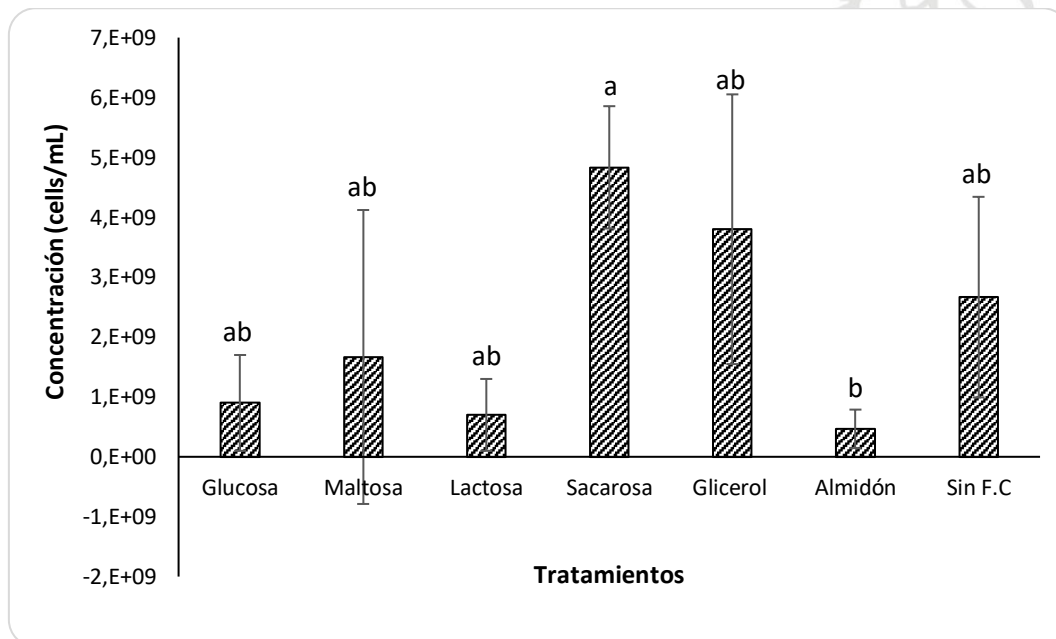


Figura 11. Producción de endosporas del aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290 en fermentación en estado líquido. Evaluación de diferentes suplementos de carbono a una concentración de 8g/L. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0.05$ por HSD test.

Los resultados obtenidos a partir de la adición de diferentes suplementos de nitrógeno destacaron la caseína como la mejor fuente para la fermentación de *Bacillus* sp. HOB008-290. La adición de urea afectó negativamente el crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo y por lo mismo, no se alcanzaron concentraciones de endosporas superiores a 1×10^8 endosporas/mL. Con las demás fuentes de nitrógeno, exceptuando a la peptona y a la proteína aislada de soya, tampoco se observó un aumento significativo en la formación de esporas. Aunque, autores han demostrado que el rendimiento máximo de esporas se obtiene con la velocidad del agitador de 200 rpm y 30°C en 48h de fermentación [38], en la figura 12 no se logra observar la fase estacionaria para los tratamientos evaluados. De ahí, a pesar de que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 13), se quiso realizar una

fermentación más larga, con la finalidad de identificar si después de las 48h la formación de endosporas seguía aumentando.

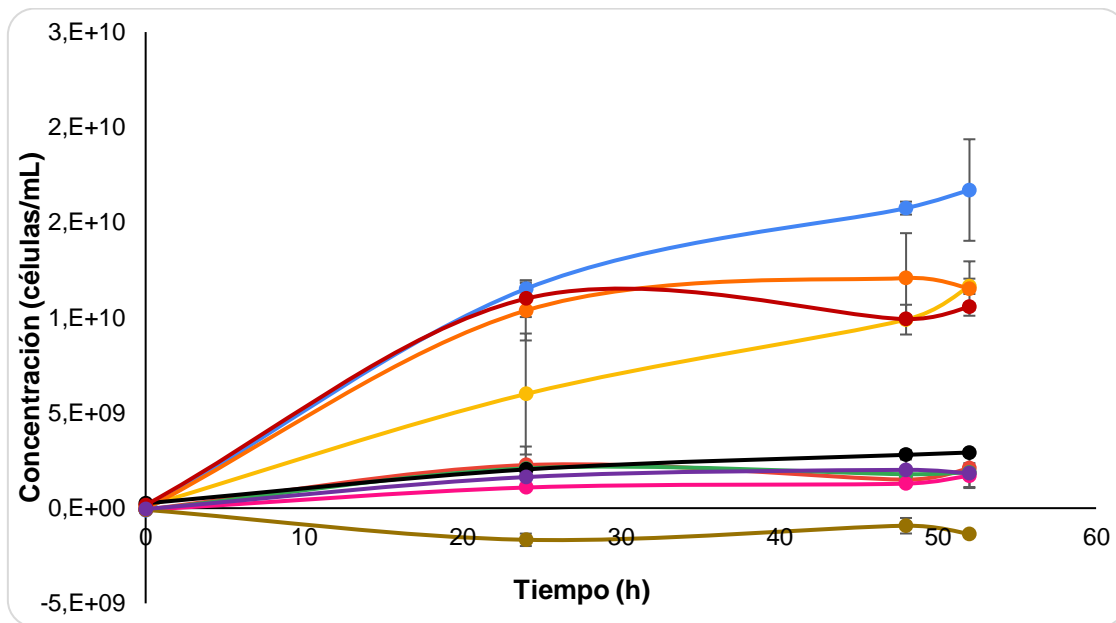


Figura 12. Efecto de la adición de diferentes suplementos de nitrógeno a la fermentación en estado líquido sobre la producción de biomasa por el aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290. Los colores de las líneas corresponden a las diferentes fuentes de nitrógeno evaluadas. Azul: peptona, violeta: extracto de levadura, naranja: caseína, amarillo: proteína aislada de soya, negro: extracto de malta, morado: sin fuente de nitrógeno, verde: sulfato de amonio, rojo: nitrato de amonio, fucsia: nitrato de potasio, café: urea.

Considerando que el tratamiento con peptona fue el que alcanzó una mayor concentración de células vegetativas y que, en la lectura de las endosporas se encontró una alta variabilidad de los resultados, esta fuente fue incluida junto con la caseína en la evaluación anteriormente mencionada. La proteína aislada de soya también evidenció una buena producción de endosporas, pero no se tuvo en cuenta puesto que es un producto que se resuspende y genera ruido en las mediciones por absorbancia de la biomasa. En la figura 14 se aprecia el resultado de la cinética realizada con las dos mejores fuentes de nitrógeno encontradas y la fuente de carbono previamente seleccionada.

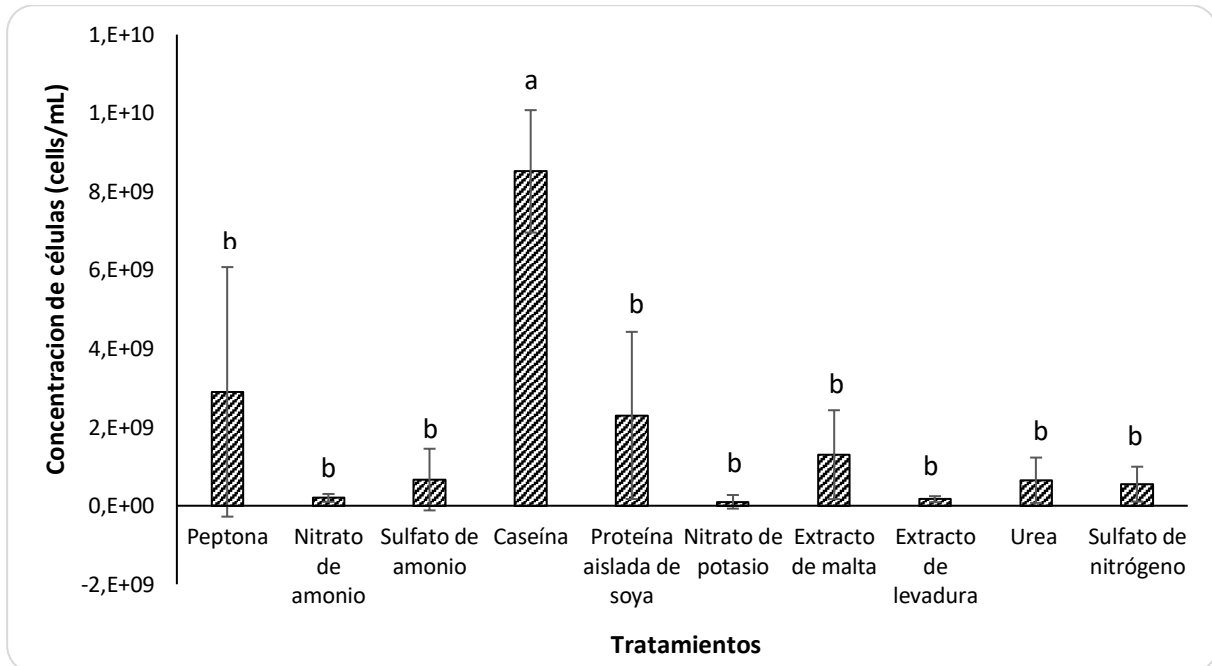


Figura 13. Producción de endosporas del aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290 en fermentación en estado líquido. Evaluación de diferentes suplementos de nitrógeno a una concentración de 8g/L. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0.05$ por HSD test.

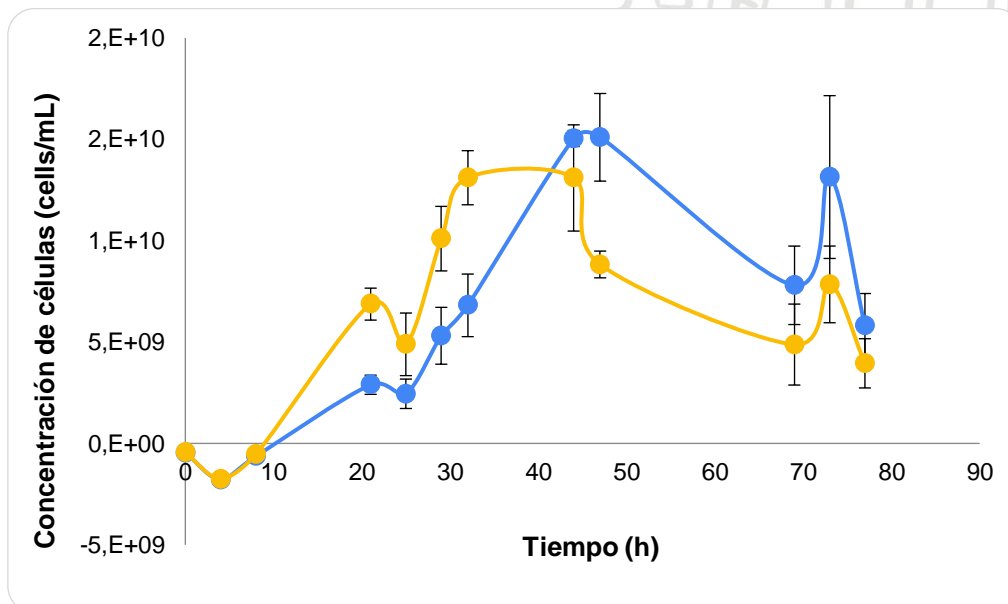


Figura 14. Efecto de la adición de sacarosa como fuente de carbono, peptona y/o caseína como fuentes de nitrógeno a la fermentación en estado líquido sobre la producción de biomasa por el aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290. La línea amarilla corresponde a la caseína y la azul a la peptona.

Este ensayo permitió confirmar que la mayor producción de endosporas se alcanza empleando sacarosa y caseína como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento sacarosa-peptona (Figura 15). Al comparar las figuras 14 y 16, se comprueba que efectivamente cuando se entra en la fase estacionaria, se dispara la producción de endosporas. En el caso de la peptona, la fase exponencial termina a las 44h, mismo tiempo en el que se nota un ascenso acelerado en la formación de las esporas y, para la caseína el punto máximo de biomasa es alcanzado a las 29h, por lo que las esporas empiezan a aparecer con mayor frecuencia y a concentraciones superiores. También, el experimento permite concluir que a mayor tiempo de fermentación, se obtiene una mayor concentración de esporas. Específicamente a las 93h de fermentación, empleando peptona como fuente de nitrógeno la concentración de esporas correspondió a 4×10^{10} esporas/mL, mientras que con caseína fue de 7×10^{10} esporas/mL (Figura 16).

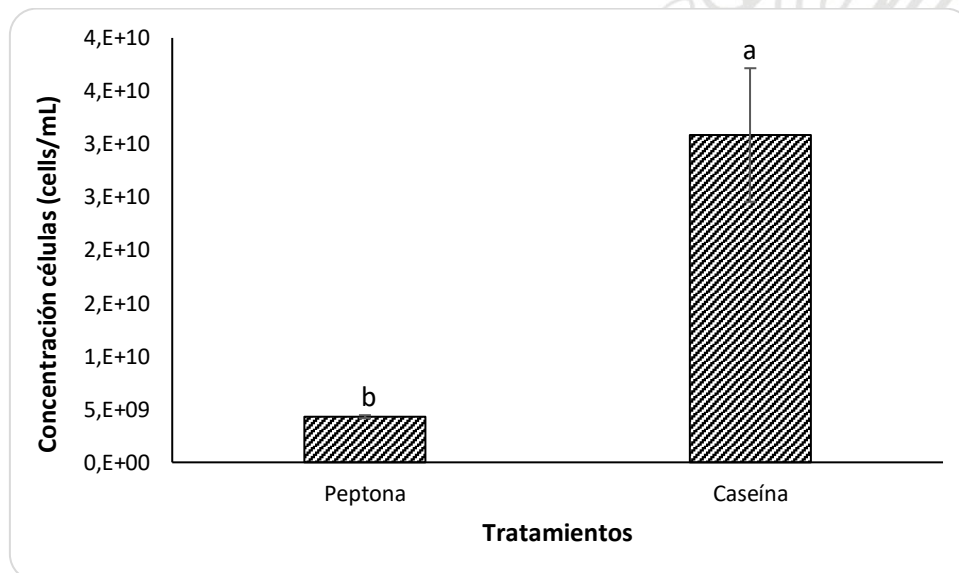


Figura 15. Producción de endosporas del aislamiento *Bacillus* sp. HOB008-290 en fermentación en estado líquido. Evaluación de peptona y caseína como fuente de nitrógeno a una concentración de 8g/L, con sacarosa como fuente de carbono. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0.05$ por HSD test.

Es relevante tener conocimiento de todo el comportamiento de la fermentación, dado que se ha informado que la producción de la iturina y fengicina, metabolitos importantes en la acción de control biológico, es inducida por inanición y regulada por los productos de los genes *spo0A* asociados con la esporulación, de manera que, al final de la etapa de esporulación, se termina la producción de los lipopéptidos [42]. No obstante, es de interés realizar una cinética de la producción de estos metabolitos, mediante su identificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

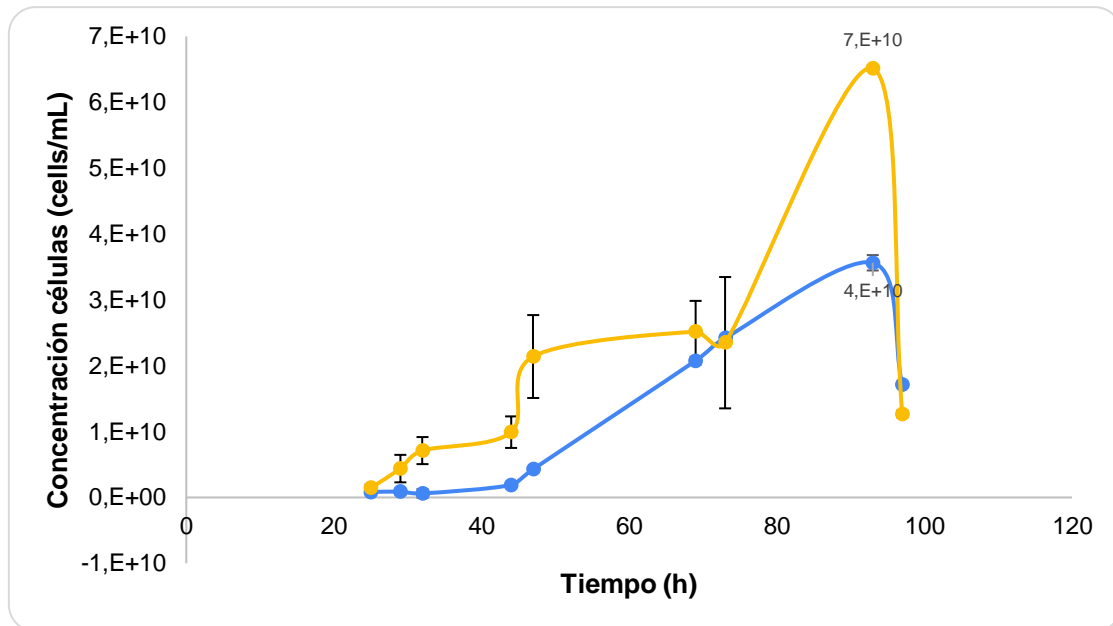


Figura 16. Producción de endosporas del aislamiento *Bacillus sp.* HOB008-290 en fermentación en estado líquido. Evaluación de peptona y caseína como fuente de nitrógeno a una concentración de 8g/L, con sacarosa como fuente de carbono. Los experimentos se realizaron por triplicado. La línea amarilla corresponde a la caseína y la azul a la peptona.

A continuación, se presenta un resumen de las condiciones encontradas para aumentar la concentración de endosporas de *Bacillus sp.* HOB008-290 en fermentación sumergida:

Tabla 3. Condiciones de fermentación de *Bacillus sp.* HOB008-290.

Medio Base	CIB-1
Fuente de Carbono	Sacarosa
Fuente de Nitrógeno	Caseína
Velocidad de agitación	190rpm
Temperatura	30°C
Tiempo de fermentación	48h
Concentración de endosporas	3×10^{10} esporas/mL

Conclusiones

Se estableció el efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos pertenecientes a la Corporación para investigaciones biológicas, frente a *C.gloeosporioides* y *Lasiodiplodia sp.* demostrando que los microorganismos antagonistas previamente aislados de la rizósfera de plantas de aguacate tienen un alto potencial para ser explotados como controladores biológicos. El mejor resultado lo obtuvo el aislamiento HOB008-290 aplicado a una concentración de 1×10^7 células/mL. No obstante, es necesario realizar una futura identificación del aislamiento a



nivel de especie y la caracterización de sus metabolitos, dado que se confirmó que el mecanismo de acción responde al efecto sinérgico de la biomasa y de compuestos activos.

Cabe resaltar que los resultados de eficacia a nivel *in vivo* para la bacteria seleccionada fueron comparables a los de un fungicida sintético comercial (prochloraz), lo que convierte a este aislamiento en candidato potencial para el desarrollo de nuevos biopesticidas como agente de control biológico. Del mismo modo, se puede concluir que las metodologías empleadas en el desarrollo del proyecto fueron adecuadas al permitir realizar tanto la evaluación cuantitativa como cualitativa de la actividad de las bacterias en frutos de aguacate Hass.

El medio de fermentación optimizado para la esporulación de bacterias, CIB-1, desarrollado por el grupo de investigación pudo adaptarse a *Bacillus* sp. HOB008-290 para incrementar su producción de endosporas en fermentación sumergida a escala erlenmeyer a partir de la modificación de las fuentes de carbono y nitrógeno. Las condiciones de cultivo establecidas en este estudio permitieron alcanzar una densidad celular de 1×10^{10} células/mL y una concentración de esporas final de 3×10^{10} UFC/mL a las 48h de fermentación empleando sacarosa y caseína como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. La alta producción de esporas en un corto período de incubación podría representar ahorros en los costos del bioproceso.

Referencias bibliográficas

- [1] MUNHUWEYI, Karen, MPAI, Semakaleng and SIVAKUMAR, Dharini. Extension of avocado fruit postharvest quality using non-chemical treatments. *Agronomy*. 2020. Vol. 10, no. 2.
- [2] ALARCÓN, J. J., et al. Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill). 2012.
- [3] ARIAS, Francisco, MONTOYA, Cesar and VELÁSQUEZ, Oscar. Dinámica del mercado mundial de aguacate. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte*. 2018. No. 55, p. 22–35.
- [4] STA, Por Forbes. Aguacate hass colombiano le daría más de US \$ 100 millones al país en exportaciones. 2020. Disponible en: <https://forbes.co/2020/07/08/negocios/aguacate-hass-colombiano-le-daria-mas-de-us100-millones-al-pais-en-exportaciones/>
- [5] RAMÍREZ-GIL, Joaquín Guillermo and MORALES-OSORIO, Juan Gonzalo. Integrated proposal for management of root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado cv. Hass crops. *Crop Protection*. 2020. Vol. 137, no. June 2019, p. 105271.
- [6] MAFTOONAZAD, N., RAMASWAMY, H. S., MOALEMIYAN, M. and KUSHALAPPA, A. C., 2007. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol. 68, no. 2, p. 341–349.
- [7] KORSTEN, Lise and VILLIERS, D E. Diseases Biological Control of Avocado. 1993. P. 65–69.



- [8] SARKHOSH, Ali, VARGAS, Ana I., SCHAFFER, Bruce, PALMATEER, Aaron J., LOPEZ, Patricia, SOLEYMANI, Asiye and FARZANEH, Mohsen. Postharvest management of anthracnose in avocado (*Persea americana* Mill.) fruit with plant-extracted oils. *Food Packaging and Shelf Life*. 2017. Vol. 12, p. 16–22.
- [9] OBIANOM, Chinelo, ROMANAZZI, Gianfranco and SIVAKUMAR, Dharini. Effects of chitosan treatment on avocado postharvest diseases and expression of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and lipoxygenase genes. *Postharvest Biology and Technology*. 2019. Vol. 147, no. September 2018, p. 214–221.
- [10] GRANADA, David, et al. Bacterial extracts and bioformulates as a promising control of fruit body rot and root rot in avocado cv. Hass. *Journal of Integrative Agriculture*. 2020. Vol. 19, no. 3, p. 748–758.
- [11] VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda, et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. 2018. Vol. 36, no. 1, p. 95–130.
- [12] JANISIEWICZ, Wojciech J. and KORSTEN, Lise. Biological control of postharvest diseases of F Ruits . *Annual Review of Phytopathology*. 2002. Vol. 40, no. 1, p. 411–441.
- [13] RAMÍREZ-GIL, Joaquin Guillermo, MORALES, Juan Gonzalo and PETERSON, A. Townsend. Potential geography and productivity of “Hass” avocado crops in Colombia estimated by ecological niche modeling. *Scientia Horticulturae*. 2018. Vol. 237, no. October 2017, p. 287–295.
- [14] BERNAL ESTRADA, Jorge Alonso. Estudios ecofisiológicos en aguacate cv. Hass en diferentes ambientes como alternativa productiva en Colombia. . 2016. P. 296.
- [15] DREHER, Mark L. and DAVENPORT, Adrienne J. Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013. Vol. 53, no. 7, p. 738–750.
- [16] DUARTE, Patrícia Fonseca, et al. Avocado: Characteristics, health benefits, and uses. *International News on Fats, Oils and Related Materials*. 2017. Vol. 28, no. 3, p. 28–32.
- [17] FINAGRO, 2018. Ficha de inteligencia. . 2018. P. 1–14.
- [18] BILL, Malick, et al. Avocado Fruit Quality Management during the Postharvest Supply Chain. *Food Reviews International*. 2014. Vol. 30, no. 3, p. 169–202.
- [19] TRINIDAD-ÁNGEL, Eddy, et al. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2017. No. 19, p. 3953.
- [20] TWIZEYIMANA, Mathias, et al. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*. 2013. Vol. 97, no. 12, p. 1580–1584.
- [21] KORSTEN, Lise and BEZUIDENHOUT, Jurg. Biological control of postharvest diseases of fruit. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 1988. p. 11–75.
- [22] OBIANOM, Chinelo and SIVAKUMAR, Dharini. Differential response to combined



prochloraz and thyme oil drench treatment in avocados against the control of anthracnose and stem-end rot. *Phytoparasitica*. 2018. Vol. 46, no. 3, p. 273–281.

[23] PEDRAZA, Luz Adriana, LÓPEZ, Camilo Ernesto and URIBE-VÉLEZ, Daniel. Mechanisms of action of *Bacillus* spp. (bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. *Acta Biologica Colombiana*. 2020. Vol. 25, no. 1, p. 112–125.

[24] SHIMSHONI, Jakob A., et al. Postharvest fungicide for avocado fruits: Antifungal efficacy and peel to pulp distribution kinetics. *Foods*. 2020. Vol. 9, no. 2, p. 1–12.

[25] CALVO, Pamela and ZUÑIGA, Doris. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de *Bacillus* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*. 2010. Vol. 9, no. 1–2, p. 31.

[26] MCKENNEY, Peter T., DRIKS, Adam and EICHENBERGER, Patrick. The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. 2013. Vol. 11, no. 1, p. 33–44.

[27] RAMIREZ RESTREPO, Sara. Evaluación de extractos microbianos frente a pudriciones radiculares en aguacate generados por *Phytophthora cinnamomi*. 2016. P. 54.

[28] POSADA-URIBE, Luisa F., ROMERO-TABAREZ, Magally and VILLEGAS-ESCOBAR, Valeska. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015. Vol. 38, no. 10, p. 1879–1888.

[29] RUIZ-SÁNCHEZ, Esaú., et al. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2018. Vol. 5, no. 7, p. 1325.

[30] ALAMA, I., MALDONADO, E. and RODRÍGUEZ GÁLVEZ, E. *Lasiodiplodia theobromae* afectando el Cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalía, ISSN-e 1810-1100, Vol. 11, N°. 2, 2006, págs. 4-13*. 2006. Vol. 11, no. 2, p. 4–13.

[31] TAN, SR Jaffee and TS, 2008. Spore formation in *Bacillus subtilis*. NIH Public Access. *Bone*. 2008. Vol. 23, no. 1, p. 1–7.

[32] SELLA, Sandra R.B.R., VANDENBERGHE, Luciana P.S. and SOCCOL, Carlos Ricardo. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*. 2014. Vol. 169, no. 12, p. 931–939.

[33] PÉREZ, ALEXANDER, HERNÁNDEZ, JESÚS and FUENTES, JUSTO. Uso de bacterias endófitas como control biológico sobre *Phytophthora cinnamomirands* causante de la pudrición Radicular del aguacate (*persea americana* mill.). *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*. 2014. Vol. 6, no. 1, p. 213.

[34] ROMERO, D., et al. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podospaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 103, no. 4, p. 969–976.

[35] PULIDO JIMÉNEZ, Ana Carolina. Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de *Zea mays* y *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero. . 2016. P. 107.



- [36] BREN, Anat., et al. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E.coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, no. April, p. 2–11.
- [37] CASTAÑEDA ALVAREZ, Estefania and CONSUELO SÁNCHEZ, Ligia. Evaluation of growth of four species of the genus *Bacillus* sp., the first step to understand their biocontrol effect on *Fusarium* sp. *Nova*. 2016. Vol. 13, no. 26, p. 53–65.
- [38] RAO, Yerra Koteswara., et al. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*. 2007. Vol. 42, no. 4, p. 535–541.
- [39] ESPECIAL, Incauca Blanco, [no date]. Azúcar Incauca Blanco Especial 1 kg INCAUCA Código de producto: 0460169. Disponible en: <https://www.tiendasjumbo.co/azucar-incauca-blanco-especial-1-kg/p>
- [40] ETIQUETAS, Adicional Opiniones, [no date]. Glicerina 99.7% . . No. 500. Disponible en: <http://www.elementosquimicos.com.co/glicerina-99-7.html>
- [41] SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, Daria. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015. Vol. 18, no. 2, p. 128–133.
- [42] ARIZA, Yesid and SÁNCHEZ, MSC., Ligia. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*. 2012. Vol. 10, no. 18, p. 149.