



Evaluación de la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) presente en el follaje del banano en la zona del Urabá antioqueño

Yennifer Adriana Hinestroza Durango

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Asesores

Dalma Elizabeth Marsiglia López, Magíster (MSc) en Ingeniería Química

Diego Hernando Lozada Bedoya, Ingeniero agrónomo

Universidad de Antioquia
Facultad de ingeniería
Ingeniería Bioquímica
Carepa, Antioquia, Colombia

2023

Cita	Hinestroza Durango [1]
Referencia	[1] Y. A. Hinestroza Durango, “Evaluación de la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Bacillus subtilis</i> para el control biológico de la Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) presente en el follaje del banano en la zona del Urabá antioqueño”, Trabajo de grado, Ingeniería Bioquímica, Universidad de Antioquia, Carepa, Antioquia, Colombia, 2023.
Estilo IEEE	
(2020)	



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Julio César Saldarriaga Molina

Jefe departamento: Lina María Gonzáles Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia, ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Memento mori «Recuerda que vas a morir» Incluso para aquellos que ostentan un gran poder, la vida es breve. Solo hay una manera de derrotar a la muerte: convertir nuestra vida en una obra maestra. Debemos aprovechar cada oportunidad de ser compasivos y de amar plenamente.

ORIGEN ~ DAN BROWN

Esta obra va dedicada a mi hijo Austin, mi serotonina incondicional; A mi madre, Marisela, por su amor invaluable y constante apoyo; A Christian, Mine Liebe, por enseñarme que podemos realmente vivir, por sacar lo mejor de mí y por el apoyo incondicional en este trabajo; A mi tío Pedro por creer que podría ser Ingeniera, Doctora o lo que sea que hubiese elegido ser.

Agradecimientos


Agradezco a las personas, quienes desinteresadamente colaboraron con sus críticas constructivas, sugerencias y buenas energías; A mi familia quienes me han apoyado en este viaje (Mi madre, mis tíos, mi padre), a Dalma Elizabeth, mi asesora por prestarme la ayuda y el apoyo que necesitaba para iniciar una de las etapas más importantes de mi vida; a todos los docentes que ayudaron a formarme y a ser quien soy ahora (Stella Monsalve, Alba Mosquera, Alejandro Jaramillo, Alejandro Acosta, Juan E. Vásquez, Andrés Echeverri, Zenón Zapata, David Gómez, , Rigoberto Rios, Jairo Álvarez, Mauricio Sierra, Natalia Gómez; a esas personas que conocí en la UdeA y al día de hoy son mis grandes amigos [Yineth, Cris, Aleja, Matth, Jader, Sebas, Cami V, Keily, Lau G, David G, Guille, Vivi, Shirley, Mafe, Ange, Orle, Yorla] ; al personal del laboratorio Leidy y Hernan, a Fitoplant por acogerme y permitirme florecer como Ingeniera, a las becas y a mi Alma mater, La Universidad de Antioquia, agradezco infinitamente .

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
III. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
IV. MARCO TEÓRICO	20
4.1. Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet)	20
4.3. Métodos convencionales para el control de la Sigatoka negra.....	22
4.3.1 Control químico	22
4.3.2 Control biológico	23
4.4 Generalidades de las especies <i>Bacillus</i> (<i>subtilis</i> y <i>amyloliquefaciens</i>)	23
4.4.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	23
4.4.2. <i>Bacillus subtilis</i>	24
4.5 Biosurfactantes	25
4.6 Lipopéptidos.....	25
4.6.1 Surfactina	25
4.6.2 Fengicina.....	26
4.6.3 Iturina.....	26

4.7 Aprovechamiento de residuos agroindustriales.....	26
4.7.1 Raquis de palma.....	26
V. METODOLOGÍA	27
5.1. Conservación y activación del consorcio de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>subtilis</i>	27
5.2. Medición de la actividad enzimática.....	27
5.3. Aislamiento de <i>M. Fijiensis</i>	28
5.4. Cuantificación de la biomasa bacteriana.....	28
5.4.1 Cinética de crecimiento bacteriano.....	28
5.4.2 Peso seco.....	29
5.5 Hidrólisis de la harina de banano (almidón)	29
5.6 Hidrólisis del raquis de palma.....	30
5.6.1 Ácida.....	30
5.6.2 Alcalina.....	31
5.7 Fermentación.....	31
5.8. Extracción de lipopéptidos.....	35
5.9. Cuantificación de lipopéptidos.....	35
5.10. Curva de calibración albúmina de suero bovino	35
5.11.Evaluación de sensibilidad in vitro	36
5.11.1 Preparación del medio.....	36
5.11.2 Descarga de ascosporas.....	37
5.11.3 Inhibición del tubo germinativo.....	37
5.12. Diseño experimental – Lipopéptidos.....	38
5.13. Diseño experimental - Sensibilidad.....	38
5.14. Análisis estadístico.....	38
5.15. Diseño mecánico del reactor	39

VI. RESULTADOS	40
6.1. Estudio microscópico	40
6.1.1. Bacterias del género <i>Bacillus</i>	40
6.1.2 Hongo.....	40
6.2. Estudio macroscópico	41
6.1.1. Descripción macroscópica de BAS.....	41
6.2.2 Descripción macroscópica de <i>M. fijiensis</i>	41
6.3. Cinética de crecimiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>B. subtilis</i>	42
6.4. Hidrólisis	43
6.4.1. Harina de banano	43
6.4.2. Raquis de palma.....	44
6.5. Curva de calibración albúmina de suero bovino	44
6.6. Fermentación	45
Verificación de supuestos y análisis residual.....	52
Homogeneidad de varianza.....	54
Independencia de los residuales.....	55
6.7. Contenido proteico	55
6.8. Sensibilidad	57
6.8.1 Inhibición del tubo germinativo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	57
Análisis residual.....	64
Homocedasticidad residual	65
Independencia residual.....	66
Comparaciones múltiples.....	67
6.9. Plano del reactor diseñado.....	69
VII. ANÁLISIS	70

VIII. CONCLUSIONES72
IX. RECOMENDACIONES74
REFERENCIAS75
ANEXOS84

LISTA DE TABLAS

TABLA I. TAXONOMÍA DEL HONGO	20
TABLA II. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DE DESARROLLO DE LA SIGATOKA NEGRA EN EL BANANO	21
TABLA III. TAXONOMÍA <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24
TABLA IV. TAXONOMÍA <i>Bacillus subtilis</i>	24
TABLA V. HIDRÓLISIS DE LA HB	29
TABLA VI. MEDIOS DE CULTIVO	31
TABLA VII. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ESTANDAR DE BSA	36
TABLA VIII. RESULTADOS DE LA HIDRÓLISIS DE LA HB.	43
TABLA IX. RESULTADOS HIDRÓLISIS RAQUIS DE PALMA	44
TABLA X. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>M. fijiensis</i>	57
TABLA XI. PRUEBA DE TUKEY	67

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Ciclo de la enfermedad y epidemiología	21
Fig. 2 Estados de la enfermedad Sigatoka negra según escala de Fouré, fotografías realizadas en la estación experimental de Fitoplant S.A.S en Chigorodó.	22
Fig. 3 Muestra de medio de cultivo 1, 2, 3 y 4.	32
Fig. 4 Preinóculo de BAS en 4 medios de cultivo.	33
Fig. 5 Cultivo 1 – Postinóculo	33
Fig. 6 Cultivo 2 – Sistema de fermentación final 15, 32 – 37 y 40 °C.	34
Fig. 7 Tinción gram de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en consorcio con <i>Bacillus subtilis</i> , fotografías realizadas en un Microscopio compuesto binocular digital AmScope en objetivo A:10 X, B: 40 X, C: 100 X	40
Fig. 8 Tinción con azul de metileno de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , fotografías realizadas en un Microscopio binocular, Conidios <i>M. fijiensis</i> A: 10 X y B: 100 X, C: conidióforos y conidios <i>M. fijiensis</i> .	40
Fig. 9 Cultivo de BAS en caja Petri - Agar nutritivo.	41
Fig. 10. Cultivo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a 32 °C en agar PDA A: Cultivo luego de 8 días de incubación; B: Cultivo luego de 15 días de incubación; C: Cultivo luego de 20 días de incubación.	42
Fig. 11. Cinética de crecimiento de BAS - Medio Luria Bertani (a) absorbancia 600 nm (b) peso seco.	43
Fig. 12. Curva estándar de Albúmina de Suero Bovino.	44
Fig. 13 Fermentación de los 4 medios de cultivo a las temperaturas 15 - 32 - 37 y 40 °C 36 horas de reacción.	45
Fig. 14 Resumen de la ANOVA: Perspectiva bifactorial (medio y temperatura).	46
Fig. 15 Diagrama de caja y bigotes.	47
Fig. 16 Efectos de los tratamientos.	48
Fig. 17 Efectos principales.	49
Fig. 18 Efectos de interacción entre los factores.	50
Fig. 19 Matriz gráfica medio – temperatura. Media ajustada.	51

Fig. 20 Histograma de frecuencia.	52
Fig. 21 Distribución de probabilidad normal de los residuales.	53
Fig. 22 Normalidad QQ-PLOT.	54
Fig. 23 Homocedasticidad residual.	55
Fig. 24 Soluciones con lipopéptidos.	56
Fig. 25 Proteína total.	56
Fig. 26 Testigo: Ascosporas de <i>M. fijiensis</i> . (a): sin germinar; (b) Ascosporas germinada a las 48 h.	58
Fig. 27 Ascosporas de <i>M. fijiensis</i> 10 X - Control 1: <i>SICO</i> . (c): sin germinar; (d) Cultivo a las 48 h.	58
Fig. 28 Ascosporas de <i>M. fijiensis</i> 10 X - Control 2: <i>Serenade</i> . (e): sin germinar; (f) Cultivo a las 48 h.	59
Fig. 29 T ₁ M ₃ : (g) Ascosporas sin germinar de <i>M. fijiensis</i> 10 X ; (h) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.	59
Fig. 30 T ₂ M ₂ : (i) Ascosporas sin germinar de <i>M. fijiensis</i> 10 X ; (j) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.	60
Fig. 31 T ₃ M ₄ : (k) Ascosporas sin germinar de <i>M. fijiensis</i> 10 X ; (l) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.	60
Fig. 32 T ₄ M ₃ : (m) Ascosporas sin germinar de <i>M. fijiensis</i> 10 X ; (n) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.	61
Fig. 33 Resumen comportamiento del tubo germinativo.	61
Fig. 34 Resumen ANOVA sensibilidad..	62
Fig. 35 Efectos de los tratamientos en el desarrollo del tubo germinativo.	62
Fig. 36 Gráfico de caja y bigote – Sensibilidad.	63
Fig. 37 Distribución de los residuales del modelo.	64
Fig. 38 QQ-PLOT.	65
Fig. 39 Homocedasticidad residual - Prueba de sensibilidad.	66
Fig. 40 Resumen gráfico de la prueba Tukey.	68
Fig. 41 Plano fermentador.	69

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

BAS	Consortio de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> con <i>Bacillus subtilis</i>
UdeA	Universidad de Antioquia
hb	Harina de banano
HB	Hidrolizado de harina de banano
HR	Hidrolizado de raquis de palma
Min	Minutos
h	Hora
mg	Miligramos
μL	Microlitros
Aprox.	Aproximadamente
AR	Azúcares reductores
LPS	Lipopéptidos
PDA	Agar patata dextrosa
BSA	Albúmina de Suero Bovino
T1	Temperatura 1: 15 °C
T2	Temperatura 2: 32 °C
T3	Temperatura 3: 37 °C
T4	Temperatura 4: 40 °C
T##	El primer número indica el medio de cultivo y el segundo la temperatura.
gds	Cantidad de lipopéptidos obtenidos por gramo de sustrato seco inicial.
ASME	Sociedad Americana de Ingenieros Mecánicos
V_{Trabajo}	Volumen de trabajo
V_{Total}	Volumen de total del tanque
V_T	Volumen de las tapas
mpy	Milésima de pulgada de penetración anual.
L_T	Longitud del tanque
L_T	Longitud de las tapas
D_T	Diámetro del tanque
r	Radio

h	Altura
t_c	Tolerancia por corrosión
t_{camisa}	Espesor de la camisa
t_{tapa}	Espesor de la tapa
t_N	Espesor nominal
t_r	Espesor total de diseño
in	Pulgadas (Inches)
m	Metros
kPa	KiloPascales
P	Presión interna de diseño
R	Radio interior de la camisa $D_t/2$
S	Esfuerzo admisible en tensión
E	Eficiencia de la junta.
L	Radio interior esférico o de corona para torisférico ($L = D_t$)
M	Factor en las ecuaciones para cabezas torisféricas dependiendo de la proporción de cabeza
S	Esfuerzo admisible en tensión
E_j	Menor eficiencia de cualquier junta de Categoría A en la cabeza

RESUMEN

Mycosphaerella fijiensis es el hongo fitopatógeno causal de la enfermedad Sigatoka negra presente en los cultivos de banano y plátano en Colombia. En la actualidad, el control químico es el mecanismo más usado para mitigar el avance de la enfermedad, sin embargo, su aplicación genera problemas económicos y ambientales haciendo necesaria la búsqueda de otras alternativas de control como el biológico. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra presente en el follaje del banano en la zona del Urabá Antioqueño. El proceso consistió en un sistema fermentativo desarrollado en 4 medios de cultivo, 2 alternativos (hidrolizado de raquis de palma e hidrolizado de harina de banano), y 2 convencionales (Luria y Landy) bajo las temperaturas de 15, 32, 37 y 40 °C respectivamente. Luego de esta primera etapa, se procedió a efectuar la separación y extracción del metabolito seguido de la cuantificación de proteína total mediante el método Bradford. Finalmente, se evaluó la capacidad antifúngica de los lipopéptidos producidos sobre las ascosporas del hongo mediante una prueba de sensibilidad. La mayor producción de lipopéptidos fue de 19,37 µg/L en medio Landy a 37 °C, 94,04 µg/L en medio Luria a 32 °C, 91,37 µg/L en el HR a 37 °C y 123,31 µg/L en el HB a 40 °C. El extracto lipopeptídico del tratamiento T₄M₃ alcanzó una inhibición del 97,3 % en la germinación de ascosporas de *M. fijiensis*. Se concluye que los lipopéptidos producidos por BAS contribuyen al control del hongo, sin embargo, se requieren más estudios a fin de dilucidar el modo de acción biológica de estos compuestos para optimizar tanto el perfil de producción como el rendimiento.

Palabras clave — Sigatoka negra, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Mycosphaerella fijiensis*, lipopéptidos, Sensibilidad, hidrolizado de raquis de palma, hidrolizado de almidón

ABSTRACT

Mycosphaerella fijiensis is the phytopathogenic fungus that causes the Black Sigatoka disease present in banana and plantain crops in Colombia. At present, chemical control is the most used mechanism to mitigate the advance of the disease, however, its application generates economic and environmental problems, making it necessary to search for other control alternatives such as biological control. The objective of this study was to evaluate the production of lipopeptides from the consortium of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* for the biological control of black Sigatoka present in banana foliage in the Urabá Antioqueño. The process consisted of a fermentative system developed in 4 culture media, 2 alternative (palm rachis hydrolyzate and banana flour hydrolyzate), and 2 conventional (Luria and Landy) under temperatures of 15, 32, 37 and 40 °C respectively. After this first stage, it proceeded to carry out the separation and extraction of the metabolite followed by the quantification of total protein using the Bradford method. Finally, the antifungal capacity of the lipopeptides produced on the ascospores of the fungus was evaluated by means of a sensitivity test. The highest production of lipopeptides was 19.37 µg/L in Landy medium at 37 °C, 94.04 µg/L in Luria medium at 32 °C, 91.37 µg/L in HR at 37 °C and 123.31 µg/L in the HB at 40 °C. The lipopeptide extract of the T₄M₃ treatment achieved a 97.3 % inhibition in the germination of *M. fijiensis* ascospores. It is concluded that the lipopeptides produced by BAS contribute to the control of the fungus, however, more studies are required to elucidate the mode of biological action of these compounds to optimize both the production profile and the yield.

Keywords — Black Sigatoka, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Mycosphaerella fijiensis*, lipopeptides, Sensitivity, palm rachis hydrolyzate, starch hydrolysate.

I. INTRODUCCIÓN

El Urabá Antioqueño es una subregión de gran potencial en el desarrollo de la economía nacional, posee una extensión de 11.664 Km² [1]. Se caracteriza por ser una zona agropecuaria con extensiones de tierra dedicadas a la ganadería, y a tecnologías agrícolas basadas en los cultivos de piña, cacao, banano y plátano, principalmente. El cultivo de banano representa gran importancia dentro de la subregión, para el año 2021 el área sembrada de banano en la región fue cerca de 35.000 Ha, y 52.270 Ha en todo Colombia [2], este tipo de monocultivo ocupa la mayor extensión de tierras y en conjunto con el Magdalena, lideran las exportaciones hacia el exterior [3].

Los cultivos de banano presentan una problemática para la economía local debido a la presencia de la Sigatoka negra, la cual es una enfermedad producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* y representa un riesgo económico debido a que es una de las plagas más devastadora del banano a nivel mundial. En el continente americano, se identificó por primera vez en Honduras en el año de 1972 [4], de donde se diseminó a todos los países donde se encuentran esta clase de monocultivos. Específicamente en Colombia, se observó por primera vez en 1981 en la zona de Urabá [5]. El hongo se encuentra principalmente en el microbiota terrestre y es transferido al cultivo en los primeros días de desarrollo. La enfermedad se caracteriza por una decoloración de las hojas que progresivamente mata las células foliares generando necrosis hasta secar la zona atacada y finalizar con una coloración café [6]. Debido a esto, la planta no puede asimilar suficiente energía solar ni intercambiar gases necesarios para la fotosíntesis, lo que conduce a un desarrollo incompleto del fruto, es decir, estos crecen con tamaños muy pequeños y con bajos valores nutricionales necesarios para su exportación [7].

En contraposición a la enfermedad producida por el hongo, se han desarrollado tecnologías que permiten mantener altas tasas productivas a partir del control de la plaga. El uso de controladores químicos representa la práctica de control más común. Sin embargo, aun cuando el uso de químicos ha favorecido al monocultivo de plátano y banano, las divergencias sobre su uso trae problemas colaterales como la contaminación ambiental (suelo, agua, aire) , desequilibrio ecológico y pérdida

de sensibilidad del hongo a muchos de los fungicidas usados; y aún más importante, sus usos como precursores de enfermedades humanas lo convierten en una práctica potencialmente destructiva dentro de las sociedades modernas incumpliendo como práctica ecosostenible. Por estas razones, es necesario plantear nuevas alternativas de manejo integrado de la enfermedad mediante un control orgánico, biológico o genético que permitan reducir la carga química por el uso de fungicidas [8].

El uso de controladores biológicos como los entes bacterianos y los metabolitos provenientes de los mismos, pueden ser una solución para contrarrestar los efectos de la enfermedad de la Sigatoka negra. Uno de los controladores microbiológicos más estudiado hasta el momento son las bacterias del género *Bacillus*. Diversos estudios han mostrado la actividad antagonista de esta bacteria sobre hongos del género *Fusarium* [9], *Botrytis cinerea* [9] y *M. fijiensis*, esto se debe a que la bacteria produce metabolitos que presentan actividad antimicrobiana [10],[11].

Los lipopéptidos son moléculas anfifílicas que consisten en cadenas lineales cortas o estructuras cíclicas de aminoácidos, las bacterias del género Gram-positivas *Bacillus* producen numerosos lipopéptidos cíclicos, son secretados en el medio natural donde pueden tener funciones defensivas contra organismos competidores, o pueden ayudar a la interacción con su entorno, tienen propiedades tensioactivas, antibacterianas, antifúngicas, insecticidas con un menor riesgo de problemas de toxicidad [12].

A razón de lo expuesto, en este trabajo se evaluará la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra presente en el follaje del banano en la zona del Urabá Antioqueño.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El banano es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz, se cultiva en todas las regiones tropicales y tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo [13]. En Colombia, para el año 2021, se sembraron 52.270 Ha de banano y la productividad promedio en ese mismo año para la región de Urabá fue de 2.007 cajas por hectárea , En ese sentido, para el año 2028 se estima que habrá una producción mundial de 135 millones de toneladas de banano [14] .

La Sigatoka negra, el moco, el mal de Panamá, y plagas como los nemátodos, picudos y sinflidos, son enfermedades asociadas a los cultivos de banano en el mundo, la implementación del control químico contra estos patógenos se ha convertido en un obstáculo para la comercialización por los altos contenidos de agroquímicos residuales en la fruta. Además, la autora [15] reportó que las plantas han adquirido resistencia a los pesticidas de uso común, de modo que se ha incrementado la frecuencia de aplicación y las dosis de los productos, lo anterior ha generado efectos secundarios que involucran la salud humana y la del ambiente.

La ciencia aplicada con ayuda de la ciencia básica trata de comprender la biología de las enfermedades para así implementar nuevas metodologías que permitan un manejo integrado de plagas y enfermedades, promoviendo el uso de metabolitos obtenidos a partir de organismos vivos con capacidad antagonica como hongos, bacterias y extractos de plantas reduciendo la dependencia de los pesticidas químicos [16], [17] . El presente trabajo investigativo permitió evaluar la producción de metabolitos secundarios (Lipopéptidos) a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico del hongo *M. fijiensis*.

A. Pregunta de investigación

¿Se podrá evaluar la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra presente en el follaje del banano en la zona del Urabá Antioqueño?

1) *Hipótesis nula*: la cantidad de lipopéptidos que se obtienen se ve afectada por el tipo de medio utilizado para la producción y la temperatura de trabajo de fermentación.

a) *Hipótesis alterna*: los cambios en los medios y la temperatura de fermentación no afectan la producción de lipopéptidos.

III. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo general*

Evaluar la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) presente en el follaje del banano en la zona del Urabá Antioqueño.

3.2. *Objetivos específicos*

- Evaluar dos fuentes de carbono alternativa para el medio de crecimiento y producción de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* en la inducción de los lipopéptidos.
- Determinar la producción de los lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.
- Evaluar la capacidad antifúngica de los lipopéptidos producidos por el consorcio de *Bacillus* en el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)

M. fijiensis un hongo sexual heterotálico (requiere dos parejas compatibles para realizar la reproducción sexual), es un ascomicete haploide perteneciente a la clase *Dothideomycetes*, familia *Mycosphaerellaceae*, orden *Capnoidiales* (ver **TABLA I**) [18]. La enfermedad de mancha foliar también conocida como raya negra, es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*; La sigatoka negra fue reportada por primera vez en Fiji en 1964 [6]. Esta enfermedad foliar afecta a plantas del género *Musa* (banano y plátano) y se encuentra ampliamente distribuida en el mundo; en estos cultivos es uno de los principales problemas fitopatológicos [19].

TABLA I.
TAXONOMÍA DEL HONGO

Taxonomía	
Reino	Fungi
Phyllum	Ascomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Capnoidiales
Suborden	Seudophaerineae
Familia	Mycosphaerellaceae
Género	<i>Mycosphaerella</i>
Especie	<i>fijiensis</i>

Fuente: [18],[20].

La enfermedad Sigatoka negra requiere la presencia de su estado anamorfo y telemorfo para completar su ciclo de vida en las plantaciones de banano [21][22]. Tiene células sexuales “ascosporas” producidas en los pseudotecios (peritecios) cuando ocurre la fertilización de las ascas por las espermatias. Las ascosporas son el principal agente de diseminación de la enfermedad a largas distancias entre plantaciones [23], [24].

Las células asexuales “conidios” se forman sobre los conidióforos [22], la diseminación en las plantaciones se da de forma local o de corta distancia, mediante la lluvia y el viento. El proceso infeccioso del hongo puede iniciarse a partir de conidios o ascosporas (**Fig. 1**)

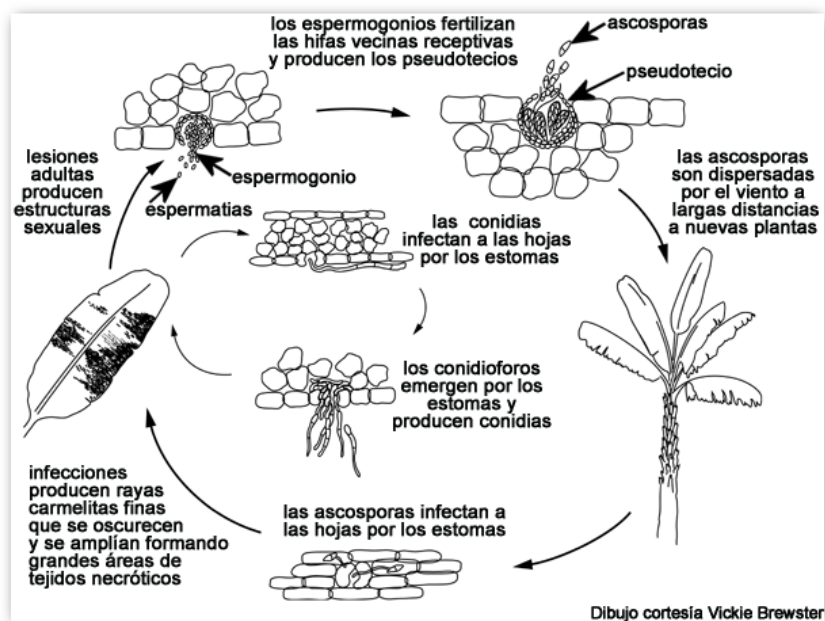


Fig. 1 Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Nota: fuente [25].

4.2. Etapas de la enfermedad

En 1969, Meredith y Lawrence realizaron la descripción de las etapas de la enfermedad (**TABLA II**) [6].

TABLA II.
DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DE DESARROLLO DE LA SIGATOKA NEGRA EN EL BANANO

Etapas	Descripción
1	Las manchas son levemente visibles en la superficie de la hoja (etapa inicial de pequeñas manchas 0,25 mm de diámetro), de color marrón rojizo en la superficie inferior de la hoja.
2	En esta etapa, las rayas color marrón rojizo son más visibles en la superficie inferior de la hoja que en la superior. Las manchas iniciales se alargan hasta 3 - 4 mm; (Es la etapa óptima para el tratamiento).
3	Las rayas se alargan un poco, el color marrón rojizo pasa a marrón oscuro o casi negro, en esta etapa la raya es visible en la superficie superior de la hoja.
4	La raya se ensancha y se vuelve más o menos fusiforme o de contorno elíptico.
5	Las manchas se vuelven negras y es posible que estén rodeadas por un halo amarillo.
6	Al secarse el centro de la mancha, se torna gris o beige, la mancha está rodeada por un borde de color marrón oscuro o negro.

Fuente: Autora.



Fig. 2 Estados de la enfermedad Sigatoka negra según escala de Fouré, fotografías realizadas en la estación experimental de Fitoplant S.A.S en Chigorodó.

Nota: fuente [26].

4.3. Métodos convencionales para el control de la sigatoka negra

Entre los métodos convencionales que se emplean actualmente para el control de la sigatoka negra, está el uso continuo de fungicidas (control químico) y las buenas prácticas de cultivo (métodos culturales), esta última consiste en reducir las condiciones favorables para el desarrollo y establecimiento del patógeno [27].

4.3.1 Control químico

En la agricultura, el control químico consiste en el uso de pesticidas como fungicidas, bactericidas, desinfectantes o nematocidas, pero para que este sea efectivo se debe usar un sistema integrado con controles culturales y biológicos. Existen fungicidas de contacto (protectores) que se aplican para proteger las partes aéreas de la planta [27]. Los fungicidas erradicantes (sistémicos) se usan para el tratamiento de los cultivos cuando ya están enfermos, este tipo de productos se absorbe por medio de las raíces o el follaje y se desplaza por toda la planta [28]. Se ha reportado que existe una tendencia a desarrollar resistencia o tolerancia en *M. fijiensis* hacia fungicidas sistémicos, es por ello que se aplica en combinaciones o alterando con fungicidas protectores [29].

4.3.2 Control biológico

Este tipo de control consiste en el uso de microorganismos o los metabolitos producidos por ellos, para destruir poblaciones de agentes patógenos de forma parcial o total, también se usa para proteger la planta de los patógenos en el sitio de infección; Se ha reportado que los géneros *Bacillus spp.* y *Serratia spp.* brindan un nivel de control similar al control químico debido a la secreción de enzimas líticas (quitinolíticas y glucanolíticas) y su capacidad para sobrevivir en el filoplano [8].

Los hongos del género *Trichoderma* también han sido usados como agentes de control biológico de muchos patógenos de plantas [30]. Por otra parte, la especie *Bacillus subtilis* es una de la más reportada en la literatura por el control biológico efectivo, se ha evidenciado que la biomasa y los metabolitos de *B. subtilis EA-CB0015* controlan la enfermedad de la Sigatoka negra en invernadero y en campo [31].

4.4 Generalidades de las especies *Bacillus (subtilis y amyloliquefaciens)*

Las especies de *Bacillus* son bacterias gram positivas que poseen forma de bastón, pueden habitar en suelos, incluyendo la rizosfera de algunas plantas, alimentos y medios acuáticos como el mar [32]. Generalmente los *Bacillus* se caracterizan por su actividad antimicrobiana a través de la generación de compuestos que son utilizados en aplicación de control biológico [33].

4.4.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens es una rizobacteria perteneciente al género *Bacillus*, esta tiene la habilidad de mantenerse en medios con altas temperaturas, altas presiones y acidez, comúnmente coloniza con facilidad las raíces de las plantas, lo cual le permite atacar los patógenos presentes en las mismas [34]. *B. amyloliquefaciens* destaca por ser productora de sustancias antimicrobianas de síntesis no ribosomal, como lo son los lipopéptidos cíclicos [35]. En la **TABLA III**, se muestra la taxonomía de este microorganismo.

TABLA III.
TAXONOMÍA *Bacillus amyloliquefaciens*

Taxonomía	
Reino	Bacteria
Phyllum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>B. amyloliquefaciens</i>

Fuente: [36].

4.4.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria aerobia gram positiva, tiene alta capacidad para producir endosporas que le posibilitan crecer en condiciones difíciles. En la **TABLA IV**, se muestra la taxonomía de este microorganismo. Esta rizobacteria ha sido altamente reconocida por los lipopéptidos que produce, ya que funcionan como una alternativa de los pesticidas en la lucha contra las afecciones en plantaciones [37].

TABLA IV.
TAXONOMÍA *Bacillus subtilis*

Taxonomía	
Reino	Bacteria
Phyllum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: [38].

4.5 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son biomoléculas tensoactivas que se excretan o producen en la superficie de las células microbianas y reducen la tensión superficial e interfacial. Dentro de sus características destaca su baja toxicidad, su capacidad emulsionante y des emulsionante, la permanencia de su actividad en ambientes con pH y salinidad alta, su biodegradabilidad y su actividad antimicrobiana. Son producidos por bacterias, hongos filamentosos y levaduras [39][40]. Estos compuestos tienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos claramente definidos, los principales tipos de biosurfactantes son las lipoproteínas o lipopéptidos, los glicolípidos, los poliméricos y los fosfolípidos [41].

4.6 Lipopéptidos

Los lipopéptidos (LP) son metabolitos secundarios microbianos que presentan funciones biológicas, estos actúan como agente tensoactivo (surfactante) con actividades citotóxicas o antimicrobianas [42]. La surfactina tiene actividad antibacteriana y las iturinas y las fengicinas son los lipopéptidos que presentan actividades antifúngicas, estas últimas han mostrado tener actividad de control biológico contra cepas de *M. fijiensis* [43].

4.6.1 Surfactina

La surfactina es un lipopéptido cíclico bacteriano producido por *Bacillus subtilis* mediante fermentación, sus propiedades anfifílicas ayudan a que esta sustancia sobreviva en ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos, no se sintetizan ribosomalmente, sino por sistemas especializados, llamados péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) [44]. Este antibiótico lipopeptídico cíclico presenta actividad antifúngica, antiviral, antimicoplasma, hemolítica y antibacteriana [45].

4.6.2 Fengicina

La fengicina es un lipopéptido con actividad antifúngica que inhibe hongos filamentosos pero no es efectivo contra bacterias y levaduras, contiene cinco subunidades no ribosomales de péptidos sintetizadas (NRPS): FenA (406 kDa), FenB (146 kDa), FenC (287 kDa), FenD (290 kDa) y FenE (286 kDa) [46].

4.6.3 Iturina

La familia Iturina comprende la bacilomicina, micosubtilina e iturina, estos son lipopéptidos cíclicos están unidos por un residuo β -aminoácido. Los miembros de esta familia tienen moderada actividad surfactante y fuertes propiedades antibióticas [47], [48].

Se han expuesto diferentes formulaciones para el control biológico con *Bacillus*. Las bioformulaciones generalmente están compuestas por el microorganismo (suspensión bacteriana), sus metabolitos, agua o aceite. Una mezcla a base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 ha mostrado inhibición del tubo germinativo de *M. fijiensis* con un porcentaje inhibición de 66,1 % sin diferencias significativas con el control químico (Dithane) y biológico (Rhapsody) [49].

4.7 Aprovechamiento de residuos agroindustriales

4.7.1 Raquis de palma

El raquis de palma es un subproducto lignocelulósico de la extracción primaria de aceite de palma. Colombia es el primer país productor de palma de aceite en América latina, para el año 2022 su producción fue de 7.882.225 toneladas de racimo de fruto seco; durante el proceso de extracción de aceite se estima que se producen entre 120 y 260 kg de frutos vacíos de palma (raquis) por cada tonelada de fruto fresco [50]. El raquis como residuo agroindustrial presenta una fracción hemicelulósica rica en carbohidratos fermentables, que está constituida por celulosa la cual a su vez está compuesta de glucosa que puede ser utilizada como sustrato en innumerables procesos biotecnológicos [51]. Estos residuos son una biomasa lignocelulósica abundante en diferentes regiones del país como Urabá y es un material prometedor para elaborar productos de alto valor industrial [52].

V. METODOLOGÍA

Las actividades desarrolladas en esta tesis se llevaron a cabo en los laboratorios de la sede Tulenapa en Carepa. Este trabajo fue un estudio cuantitativo de tipo experimental en el que inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica donde se plantearon los métodos convencionales utilizados a lo largo del tiempo para el control de la enfermedad Sigatoka negra, los microorganismos usados para el control biológico, los tipos de metabolitos que producen las bacterias de la especie *Bacillus*, las características de los lipopéptidos, el aislamiento de *M. fijiensis*, los medios de cultivo para la inducción de la producción del metabolito de interés (alternativo y convencional), la separación y extracción, el método idóneo para la cuantificación y finalmente la evaluación del control biológico.

5.1. Conservación y activación del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *subtilis*

La cepa de *BAS* se obtuvo de una formulación bacteriana con una concentración de 1×10^9 UFC/mL, inicialmente se tomó una muestra de 5 mL y se almacenó en un tubo falcón de 15 mL, se llevó al laboratorio de la UdeA en la sede Tulenapa. La conservación se realizó usando el método de congelación, para el cual se usó glicerol como agente crioprotector. Se tenían tubos de ensayos con 5 mL de caldo nutritivo, se tomó un tubo de ensayo estéril y se adicionó 1 mL de suspensión bacteriana, 5 mL de caldo nutritivo y 20 % de glicerol estéril (1,2 mL). Después se repartió de a 1 mL en tubos Eppendorf y se conservó a -20°C .

5.2. Medición de la actividad enzimática

Se hizo la medición de la actividad enzimática de la enzima Termamyl® 120L y la enzima G - zyme® 480. Las enzimas se obtuvieron del grupo de Biotransformación de la Universidad de Antioquia. Inicialmente se preparó una solución de almidón de banano 25 % m/v (62,5 mg), se vertieron 2,5 mL de solución en tubos de ensayo por triplicado y se llevaron al baño maría a una temperatura de 90°C durante 3 minutos, después se agregaron 0,5 mL de enzima en cada tubo (se

evaluaron diferentes concentraciones de la enzima 1:10 – 1:50 – 1:100) por cada dilución se realizaron triplicados, se agito y se dejó reaccionar durante 30 minutos en el baño maría a 90 °C, luego se adicionaron 0,5 mL de NaOH 3 M para detener la reacción. Finalmente se realizó la medición de los azúcares reductores en el espectrofotómetro a 540 nm usando la metodología propuesta por [53], el blanco que se usó fue la solución de almidón preparada inicialmente.

5.3. Aislamiento de *M. Fijiensis*

El aislamiento de cepas de *M. Fijiensis* se realizó en las plantaciones de banano Cavendish de la estación experimental Fitoplant departamento técnico S.A.S en Julio de 2022. Con una tijera se cortaron 4 hojas infectadas que se encontraban en estadio entre 5 y 6, luego se recolectó la parte infectada en bolsas Ziploc (14 x 20) cm. En el laboratorio de la UdeA en la sede Tulenapa, se cortaron las hojas en un tamaño 2 x 2 cm (ver **ANEXO 1**), luego se desinfectaron usando hipoclorito 5 % durante 5 minutos, etanol 95 % 2 minutos y agua destilada durante 2 minutos, al finalizar la inmersión se sacaron cada uno de los recortes y de pusieron sobre una servilleta estéril, después se usó una pinza para poner los recortes por el envés de la hoja sobre un círculo de papel kraft del tamaño de la tapa de la caja Petri y se graparon (ver **ANEXO 2**), posteriormente, en agua destilada se sumergieron los discos que contenían los recortes durante 15 minutos, luego se sacaron y se pusieron sobre toallas de papel estériles para retirar la humedad, finalmente se dispusieron en bolsas ziploc (17 x 25) cm durante 96 horas.

Luego, se pasaron los discos a cajas Petri que contenían agar - agar y se realizó la descarga de ascosporas, dando pequeños golpes a la caja. Se incubó durante 72 horas y posteriormente se verifico en el microscopio la presencia de ascosporas, se tomaron y se pasaron a cajas Petri con PDA que contenía 200 mg/L de amoxicilina y se incubó durante 15 días a 32 °C.

5.4. Cuantificación de la biomasa bacteriana

5.4.1 Cinética de crecimiento bacteriano

Se tomo una muestra de la cepa del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *subtilis*, previamente crecida en agar nutritivo durante 24 horas a 32 °C, y se inoculo en un Erlenmeyer de 100 mL con 75 mL de caldo Luria Bertani con la finalidad de preparar el preinóculo. 24 horas

después, se midió la absorbancia a 600 nm del cultivo y se inoculo el 10 % en un Erlenmeyer de 1000 mL con 180 mL de medio LB, se tomó 1 mL del caldo de fermentación y se midió absorbancia en el espectro a 600 nm, se realizaron muestreos desde 0 h hasta 72 h. Se tomó como blanco el medio de cultivo estéril.

5.4.2 Peso seco

El peso seco es una medida directa de crecimiento microbiano, en un Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de caldo Luria se inoculó con el 10 % de un preinóculo del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *subtilis*, se agito levemente y se tomó una muestra de 5 mL y se puso en un tubo falcón de 15 mL, se centrifugo durante 10 minutos a 6000 rpm, se retiró el sobrenadante y se llevó el falcón al horno durante 3 horas a 105 °C, luego se pesó hasta obtener un peso constante. El procedimiento anterior se hizo cada 1 hora desde 0, hasta 10 h, y cada 2 horas, desde 16, hasta 72 h. Se realizó la marcación y el pesado de cada tubo falcón previo a iniciar el ensayo.

5.5 Hidrólisis de la harina de banano (almidón)

Se realizaron diferentes combinaciones entre la hidrólisis ácida y enzimática (ver **TABLA V**). El almidón, al ser tratado con un ácido permite el rompimiento de las cadenas cortas de dextrina, cuando se hace el tratamiento enzimático la enzima alfa amilasa (α - amilasa) se encarga de desdoblar o romper el almidón.

TABLA V.
HIDRÓLISIS DE LA HB

N°	Tipo de hidrólisis	Descripción
1	Ácida	H ₂ SO ₄ [2 %]
2	Enzimática	Termamyl ®
3		G – Zyme ®
4		Termamyl ® + G – zyme ®
5	Ácida - Enzimática	H ₂ SO ₄ [2 %] + Termamyl ®
6		H ₂ SO ₄ [2 %] + Termamyl ® + G - zyme ®

Fuente: Autora.

Hidrólisis 1: Aprox. 10 g de hb se pusieron en contacto con 80 mL de H₂SO₄ al 2 %, se transfirieron a un Erlenmeyer de 100 mL, se le puso un tapón y se llevó a la autoclave a 120 °C durante 1 h, se

dejó enfriar, se filtró y se realizó la medición de los azúcares reductores en el espectrofotómetro a 540 nm.

Hidrólisis 2: Aprox. 1 g de hb se disolvieron en 60 mL de buffer fosfato pH 5.4, se llevó a baño maría a 80 °C durante 15 minutos, luego se agregaron 100 µL de enzima Termamyl ® y se llevó a baño maría con agitación a 90 °C durante 40 min, se dejó enfriar y se midió AR a 540 nm

Hidrólisis 3: Aprox. 1 g de hb se disolvieron en 60 mL de buffer acetato de sodio pH 4.3, se agregaron 1,5 µL de enzima G – zyme ® se llevó a baño maría con agitación a 60 °C durante 1 h, se dejó enfriar y se midió AR a 540 nm.

Hidrólisis 4: Se realizó el procedimiento descrito en la hidrólisis 2, se ajustó el pH a 7 con NaOH y luego se procedió con el método detallado en la hidrólisis 3.

Hidrólisis 5: Se realizó el procedimiento descrito en la hidrólisis 1, se ajustó el pH a 7 con NaOH y luego se procedió con el método detallado en la hidrólisis 2.

Hidrólisis 6: Se realizó el procedimiento descrito en la hidrólisis 1, se ajustó el pH a 7 con NaOH. Se prepararon 0,1 mL de enzima Termamyl ® en 0,9 mL de buffer fosfato y luego a la solución resultante en la hidrólisis 1 se añadieron 8 µL de enzima Termamyl/ g de hb , se llevó a baño maría a 80 °C durante 1 h, se dejó reposar y se ajustó el pH a 7 con NaOH; Se diluyeron 150 µL de enzima G- zyme ® en 1,35 mL de buffer acetato de sodio pH 4,3 y se añadieron 1,5 µL de enzima / g de hb a la solución obtenida en el paso anterior, se llevó a baño maría a 60 °C durante 1 h, finalmente se midió AR a 540 nm.

5.6 Hidrólisis del raquis de palma

Se realizaron 2 hidrólisis ácidas y 1 hidrólisis alcalina del material lignocelulósico:

5.6.1 Ácida

En un Erlenmeyer de 500 mL, con una relación 1:8 sólido / líquido, tomando 20 g del raquis y 160 mL de H₂SO₄ al 2 % m/m. La solución se llevó a la autoclave durante 30 min, a 121 °C y, posteriormente, se sumergieron en un baño de hielo, para detener la hidrólisis. Finalmente, se filtró todo el contenido del hidrolizado y se ajustó el pH a 7 con NaOH y se midió AR a 540 nm. El hidrolizado obtenido no se purificó.

En un Erlenmeyer de 100 mL, se agregaron 300 mg de raquis de palma seco, 84 mL de agua destilada y 3 mL de H₂SO₄ al 72 %, se autoclavó a 121 °C durante 1 h, se dejó enfriar, se filtró y se ajustó el pH a 7 con NaOH, y se midió la concentración (g/L) de azúcares reductores totales según [53].

5.6.2 Alcalina

La muestra de raquis seca se molió hasta obtener un tamaño de 10 mm Aprox., se usó una relación 100 g por 3 L de solución, se agregó NaOH al 2 % (m/m), se autoclavó a 121 °C durante 30 min, se dejó enfriar, se filtró y se ajustó el pH a 7 con HCl, y se AR a 540 nm.

5.7 Fermentación

El experimento se llevó a cabo en 4 medios de cultivo (ver **TABLA VI**), cada uno de ellos fue evaluado a 4 temperaturas (15 / 32 / 37 y 40) °C.

TABLA VI.
MEDIOS DE CULTIVO

Medio	Descripción
M1	Luria – Bertani
M2	Landy
M3	Hidrolizado de harina de banano
M4	Hidrolizado de raquis de palma

Fuente: Autora.

La composición de los medios fue la siguiente:

Luria – Bertani (Triptona 10 g; extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; el pH se ajustó a 7.0) [54].

Landy (Glucosa 10,0 g; MgSO₄ 0,5 g; KCl 0,78 g; KH₂PO₄ 1,0 g; FeSO₄ 0,05 mg; MnSO₄ 5,0 mg; CuSO₄ 0,16 mg; el pH se ajustó a 7,2) [55].

Hidrolizado de almidón de banano 1 L, MgSO₄ 0,37 g/L, KH₂PO₄ 0,75 g/L, extracto de levadura y NH₄Cl (5:3 p/p) 10 g/L, KCl 0,16 g/L, FeSO₄·6H₂O 0,24 mg/L, MnSO₄ 0,76 mg/L pH 7,0) [56].

Hidrolizado de raquis de palma 1 L, MgSO₄ 0,37 g/L, KH₂PO₄ 0,75 g/L, extracto de levadura y NH₄Cl (5:3 p/p) 10 g/L, KCl 0,16 g/L, FeSO₄·6H₂O 0,24 mg/L, MnSO₄ 0,76 mg/L pH 7,0) [56].

Se debe tener en cuenta que para preparar los hidrolizados, se seleccionó el método que permitió obtener una mayor concentración de azúcares reductores.

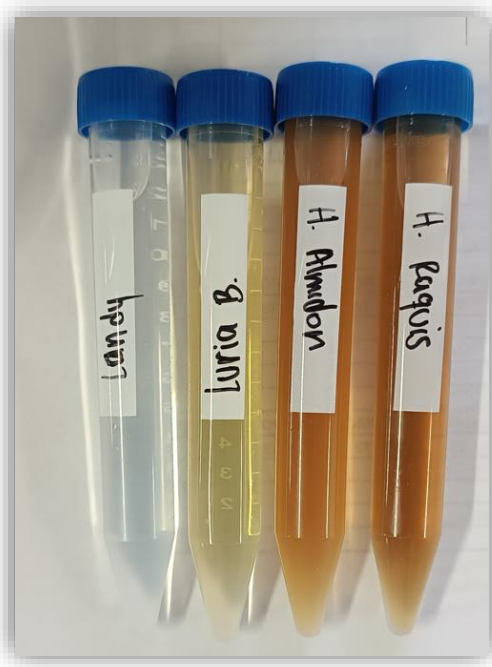


Fig. 3 Muestra de medio de cultivo 1, 2, 3 y 4.

Nota: fuente autora.

A partir de un cultivo de BAS crecido en caja Petri en agar nutritivo a 28 °C durante 16 h, se inoculó un Erlenmeyer de 100 mL con 50 mL de agua peptonada al 1 % y se incubó a 28 °C durante 12 h. Luego, se tomó 1 mL del cultivo anterior y se inoculó en un Erlenmeyer de 100 mL con 50 mL de medio de cultivo y se incubó a 28 °C durante 16 h (preinóculo) ver **Fig. 3**.

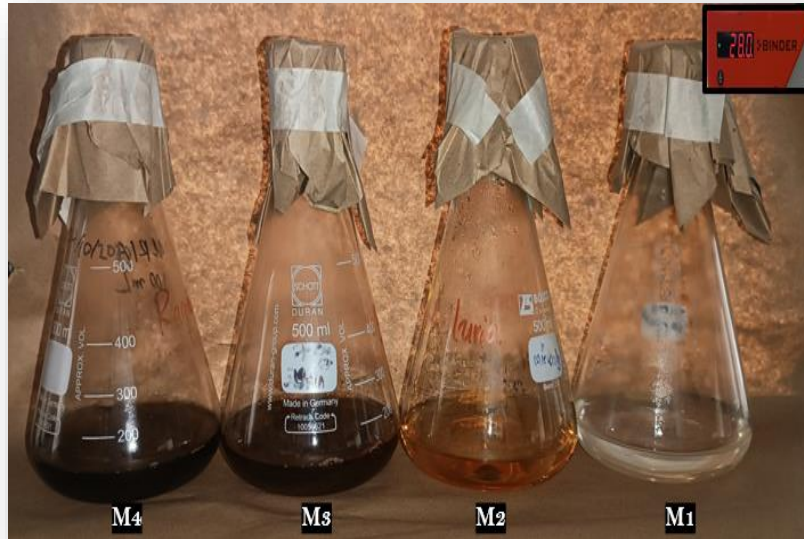


Fig. 4 Preinóculo de BAS en 4 medios de cultivo.

Nota: fuente autora.

Luego, en Erlenmeyer de 250 mL, con 70 mL de medio de cultivo, se inoculó el 10 % respecto al volumen total del medio, se ajustó el pH a 7 y se mantuvo a 37 °C durante 24 h (Cultivo 1).

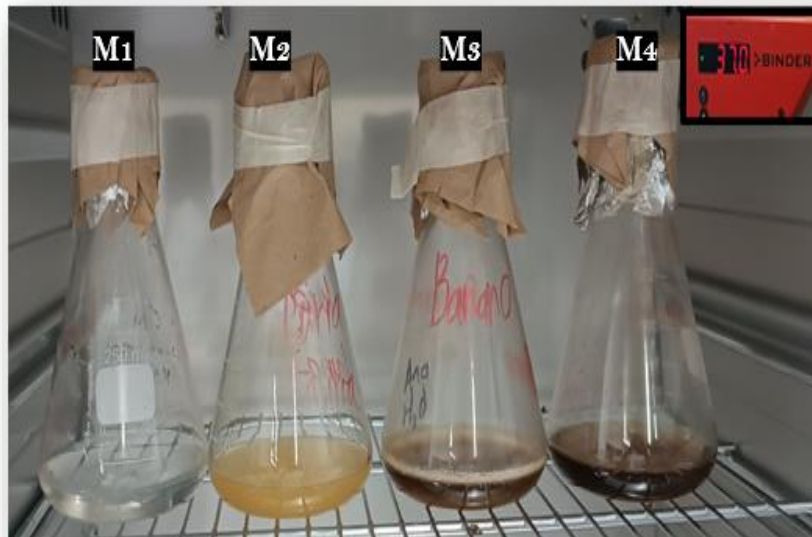


Fig. 5 Cultivo 1 – Postinóculo

Nota: fuente autora.

Finalmente, a partir del cultivo anterior se inoculó 5 % v/v un Erlenmeyer de 500 mL que contenía 100 mL de medio de cultivo con pH ajustado a 7 durante 36 h (Cultivo 2). Este procedimiento se realizó con cada uno de los medios propuestos. El último montaje de la fermentación (Cultivo 2) se hizo por duplicado para cada una de las temperaturas evaluadas.



Fig. 6 Cultivo 2 – Sistema de fermentación final 15, 32 – 37 y 40 °C.

Nota: fuente autora.

5.8. Extracción de lipopéptidos

Para la extracción de los metabolitos de interés, se siguió la metodología propuesta por [57], [58] modificada. Luego de la fermentación, el medio que contenía las células bacterianas se centrifugo a 6000 rpm durante 15 min, después los LPS se precipitaron usando HCl 6 M (pH 2,0). La precipitación que se obtuvo, se le ajustó al pH a 7 usando NaOH 4 M. Para la extracción final de los metabolitos se usó etanol al 100 %. De este modo se separó la capa de solvente de la fase acuosa y se dejó en reposo hasta evaporar el etanol durante 12 h , Posteriormente los lipopéptidos se disolvieron en agua destilada pH 7 y se secaron en el horno a 60 °C durante 4 h [57], [58] [59].

5.9. Cuantificación de lipopéptidos

El método Bradford permite determinar la concentración de proteínas en los biosurfactantes de alto peso molecular. Este método consta de la unión de proteínas con el azul brillante de Coomassie, la cual genera un cambio de color que puede ser cuantificado usando un espectrofotómetro [60].

Para conocer la cantidad de lipopéptidos obtenidos en los diferentes sistemas de fermentación, se agregó 1 mL de reactivo de Bradford y 20 µL de la muestra a examinar en tubos de vidrio, se mezcló bien y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (cubetas de plásticas), usando agua destilada como el blanco cero [61].

5.10. Curva de calibración albúmina de suero bovino

Inicialmente se preparó una solución patrón de Albúmina de suero Bovino, en la que se disolvieron 30 mg de BSA en 20 mL de agua destilada a temperatura ambiente, obteniendo así una solución a una concentración de 1,5 mg/L. La solución madre de BSA se diluyó para obtener el rango de 0,1 – 1,5 mg/mL, como se muestra en la **TABLA VII**.

TABLA VII.
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ESTANDAR DE BSA

[BSA] mg/mL	Volumen (μL) de BSA Stock	Volumen (μL) agua destilada pura
0,1	33	467
0,24	80	420
0,38	125	375
0,52	175	325
0,66	220	280
0,8	267	233
0,94	313	187
1,08	360	140
1,22	407	93
1,36	453	47
1,5	500	0

Fuente: Autora.

Se mezclaron 60 μL de cada estándar con 940 μL de reactivo de Bradford. Esto se repitió tres veces para cada concentración, lo que permitió realizar tres mediciones para cada concentración de estándar. Cada muestra se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y no más de 30 min antes de medirla.

La absorbancia de cada estándar se midió a 595 nm contra un blanco que estuvo compuesto por 60 μL de agua y 940 μL de reactivo de Bradford. Se graficó la absorbancia contra [BSA] y se generó una ecuación.

Evaluación de sensibilidad in vitro

5.11.1 Preparación del medio

Inicialmente se preparó el agar - agar , se pasó a un Erlenmeyer de 1000 mL y se tapó con papel aluminio y papel Kraft y se fijó con cinta de papel, luego se llevó al autoclave a 121 °C durante 15 minutos, se dejó reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente y en un área previamente esterilizada, se sirvieron entre 25 – 30 mL de agar en cada caja, se tapó la caja Petri y se esperó hasta que el agar se solidificara, después, con una micropipeta se agregaron 80 μL de solución antifúngica correspondiente a cada caja, y se distribuyó muy bien usando un asa de Digraslsky.

5.11.2 Descarga de ascosporas

A partir de la hoja infectada de Sigatoka negra en estadio 6, se recortaron fragmentos de 2 x 2 cm y con una pinza de disección metálica se pusieron los recortes por el envés de la hoja (superficie expuesta) sobre un círculo de papel Kraft del tamaño de la tapa de la caja Petri (Se montaron 9 recortes/disco), se fijaron los recortes al papel Kraft usando una grapadora, después, se sumergieron los discos en agua destilada durante 20 minutos, esto se hizo con el objetivo de hidratar los pseudotecios.

Transcurridos los 20 minutos, usando la pinza, se sacaron los discos y se pusieron sobre una servilleta estéril para retirar el exceso de humedad. Se guardaron en otra servilleta estéril en una bolsa Ziploc y se dejaron en un lugar oscuro durante 48 h.

Posteriormente, se tomó el disco y se puso en la tapa de la caja Petri que contenía agar - agar, se procedió a realizar la descarga, dando golpes sobre la tapa de la caja Petri, se miró en el microscopio y se le agregó a cada tratamiento la solución correspondiente.

Terminadas las descargas, las cajas de Petri fueron selladas con papel chicle y se colocaron dentro de la incubadora a una temperatura de 28 °C, por un periodo de 48 horas tiempo en el cual el tubo germinativo de las ascosporas se comienza a desarrollar.

5.11.3 Inhibición del tubo germinativo

Se evaluaron las cajas Petri en el microscopio, observando 20 ascosporas por cada caja, se midió la longitud del tubo germinativo de las ascosporas usando la aplicación “Image J”. El resultado de la actividad antifúngica se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición en relación con los tratamientos control (Sin solución antifúngica) usando la ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{C - I}{C} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

C: Longitud del tubo germinativo del control (mm)

I: Longitud del tubo germinativo de la muestra tratada con la solución antifúngica (mm).

Testigo: Agar – agar con la descarga de ascosporas.

Control 1: Agar – agar + 80 µL de SICO + descarga de ascosporas.

Control 2: Agar – agar con 80 µL de Serenade + descarga de ascosporas.

Agente antifúngico: A partir de los resultados obtenidos sobre la producción de lipopéptidos, se seleccionó para cada temperatura el sistema de cultivo que presentó mejor producción, según el análisis estadístico (Diagrama de caja y bigote).

Se seleccionó el fungicida **SICO**, que tiene como principio activo el difenoconazol 250 g/L, por su acción como fungicida Sistémico/translaminar/ protectante y curativa para el control de la Sigatoka negra [62].

El **Serenade**, es un fungicida que tiene como ingrediente activo *Bacillus subtilis* QST713 SC, su modo de acción es protectante, los lipopéptidos se encargan de perforar la membrana celular de los hongos destruyendo el tubo germinativo y el micelio [63]. Este control se seleccionó basándose en que las soluciones producidas en este trabajo contienen lipopéptidos.

5.12. Diseño experimental – Lipopéptidos

El estudio consistió en el análisis de varianza sobre un diseño factorial 4^k en el cual se tenían dos factores, cada uno desplegado en 4 niveles. Dado que se cuenta con 2 factores, $k = 2$, el diseño factorial específico correspondiente fue un diseño factorial 4^2 . Los factores involucrados en este diseño eran la temperatura y el medio de cultivo (fuente de carbono) y la variable respuesta fue la absorbancia muestral como medida indirecta de la concentración de lipopéptidos.

5.13. Diseño experimental - Sensibilidad

El estudio consistió en un análisis de varianza de un modelo de regresión lineal sobre un diseño unifactorial. La variable regresora o explicativa del modelo fue el tipo de fungicida y la variable respuesta fue la longitud media del tubo germinativo del hongo.

5.14. Análisis estadístico

El análisis de varianza y las comparaciones múltiples se desarrollaron usando el software estadístico R - Studio versión 4.1.2.

5.15. Diseño mecánico del reactor

Se realizó el diseño mecánico de un fermentador agitado con un sistema de calentamiento para la etapa de reacción del proceso, con una chaqueta. Se efectuó el dimensionamiento del reactor acorde a los requerimientos para su funcionalidad usando la norma técnica de ingeniería **ASME**, se seleccionó el material que presentó compatibilidad con las sustancias involucradas en el proceso de producción del metabolito, se tuvo en cuenta las condiciones de operación y diseño como presión, temperatura, características estructurales y la vida útil del equipo. Los detalles de la ejecución del diseño se pueden ver en el **ANEXO 9**.

VI. RESULTADOS

6.1. Estudio microscópico

6.1.1. Bacterias del género *Bacillus*

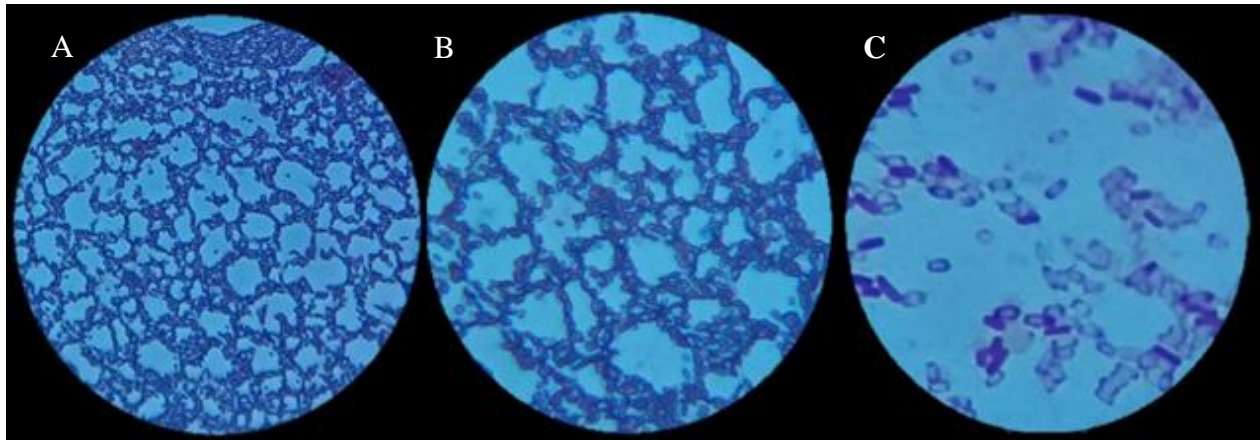


Fig. 7 Tinción gram de *Bacillus amyloliquefaciens* en consorcio con *Bacillus subtilis*, fotografías realizadas en un Microscopio compuesto binocular digital AmScope en objetivo A:10 X, B: 40 X, C: 100 X

Nota: fuente autora.

Tras realizar un estudio microscópico en fresco, en la **Fig. 7** se observó una estructura en forma de bastón y morfología planoconvexa, tras la tinción se reveló que las células tienen una tendencia a agruparse. Las observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores [64] [65],[66].

6.1.2 Hongo

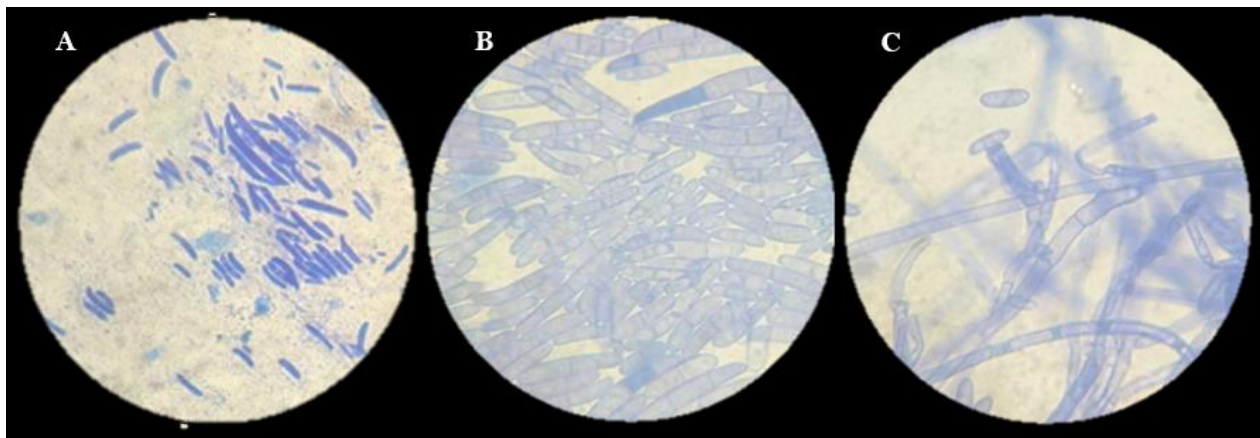


Fig. 8 Tinción con azul de metileno de *Mycosphaerella fijiensis*, fotografías realizadas en un Microscopio binocular, Conidios *M. fijiensis* A: 10 X y B: 100 X, C: conidióforos y conidios *M. fijiensis*.

Nota: fuente autora.

Después de realizar el aislamiento y dejar crecer el hongo en agar PDA durante 14 días (**Fig 5**), fue posible tomar una muestra en fresco, se le hizo tinción con azul de metileno durante 1 min y se observó al microscopio, las morfologías observadas concuerdan con lo reportado por [67], [68].

6.2. Estudio macroscópico

6.1.1. Descripción macroscópica de BAS

La **Fig. 9** muestra el cultivo BAS obtenido en agar nutritivo, las colonias tenían una consistencia pegajosa cuando se manipulaban con un asa, eran planas con apariencia color crema y bordes irregulares.

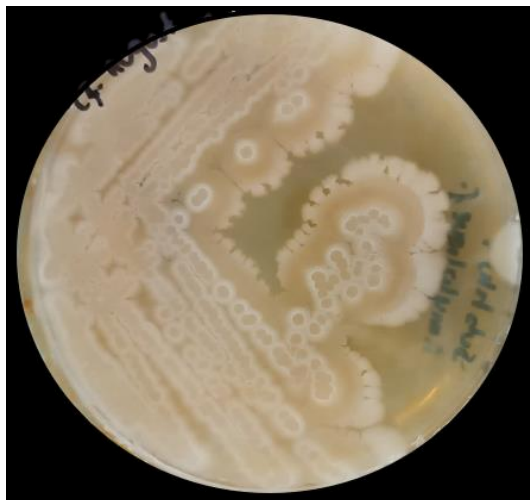


Fig. 9 Cultivo de BAS en caja Petri - Agar nutritivo.
Nota: fuente autora.

6.2.2 Descripción macroscópica de *M. fijiensis*

El hongo mostro un crecimiento lento en la primera etapa (14 días) en PDA, el color iniciaba gris oscuro a pardo y en sus estados avanzados tomó una coloración con tonos entre blanco y rosa, la forma del crecimiento tendía a ser redonda con bordes irregulares tal como se muestra en la **Fig. 10**.

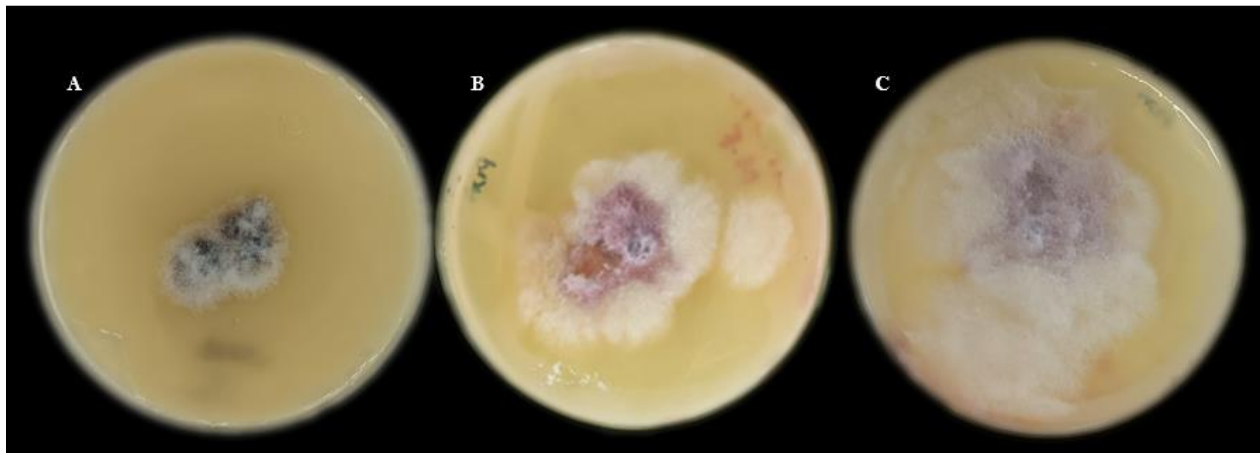
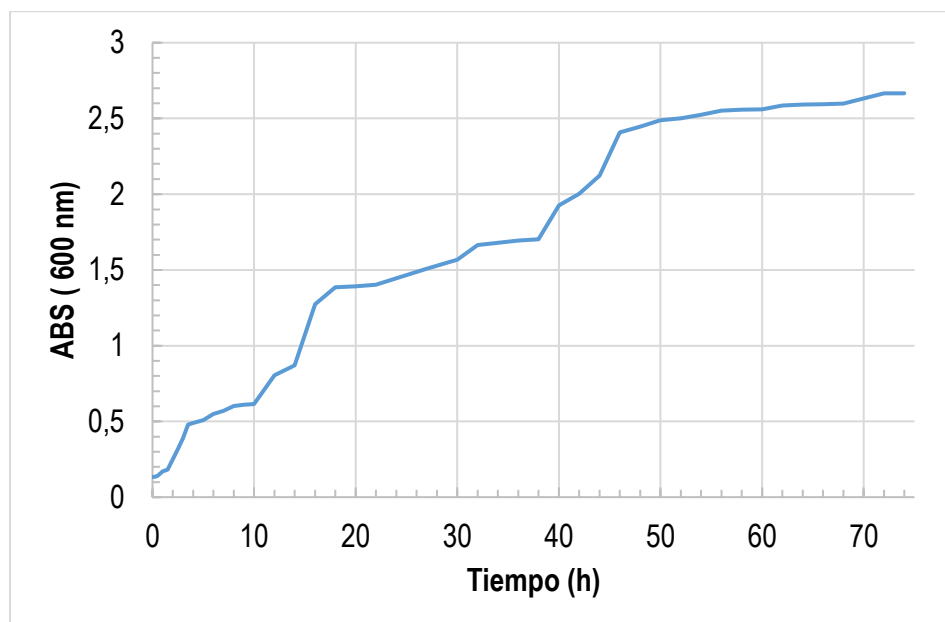


Fig. 10. Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* a 32 °C en agar PDA **A:** Cultivo luego de 8 días de incubación; **B:** Cultivo luego de 15 días de incubación; **C:** Cultivo luego de 20 días de incubación.

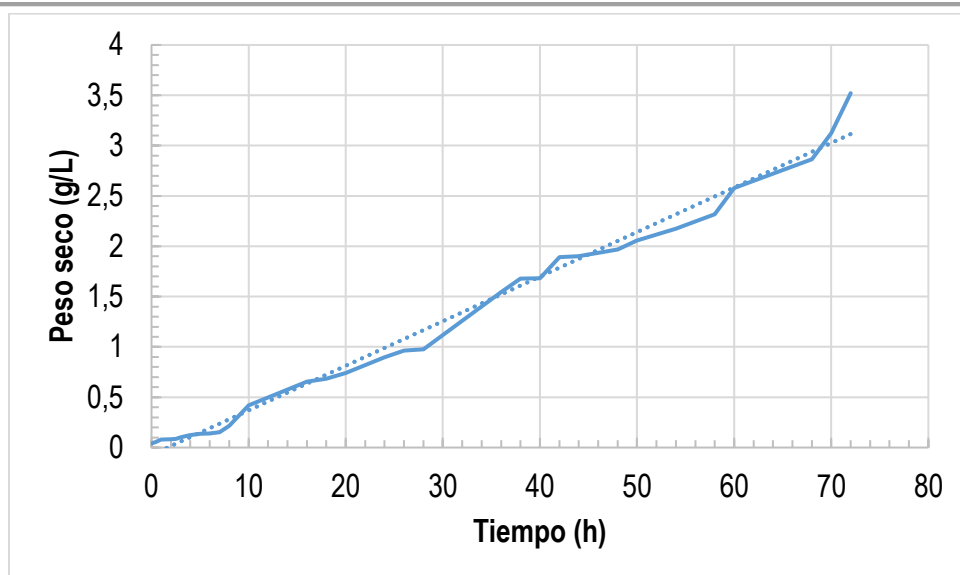
Nota: fuente autora.

*Cabe aclarar que tanto el hongo como la bacteria, son considerados aproximado de género y especie, dado que no se les realizaron pruebas moleculares.

6.3. Cinética de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*



(a)



(b)

Fig. 11. Cinética de crecimiento de BAS - Medio Luria Bertani (a) absorbancia 600 nm (b) peso seco.
Nota: fuente autora.

La concentración inicial de BAS para este ensayo fue de 0,0401 g/L, el crecimiento tuvo un buen desarrollo a pH 7,0, en la **Fig. 11** es posible identificar las fases características del crecimiento de esta bacteria (Latencia, exponencial y estacionaria), alcanzando concentraciones de 3,521 g/L transcurridas 72 h.

6.4. Hidrólisis

6.4.1. Harina de banano

TABLA VIII.
 RESULTADOS DE LA HIDRÓLISIS DE LA HB.

N°	Tipo de hidrólisis	Descripción	Concentración AR (g/L)
1	Ácida	H ₂ SO ₄ [2 %]	27,122
2	Enzimática	Termamyl	4,720
3		G - Zyme	4,308
4		Termamyl + G - Zyme	4,803
5	Ácida - Enzimática	H ₂ SO ₄ [2 %] + Termamyl	52,853
6		H ₂ SO ₄ [2 %] + Termamyl + G - Zyme	54,017

Fuente: Autora.

La concentración de azúcares reductores a partir de harina de banano a escala de matraz a diferentes condiciones experimentales, se muestran en la **TABLA VIII**. La máxima concentración de azúcares liberados $54,017 \text{ gL}^{-1}$ se obtuvo a pH 7 y 100 mL de volumen de trabajo.

6.4.2. Raquis de palma

La **TABLA IX**, muestra que la hidrólisis ácida utilizando H_2SO_4 al 2 % (m/m) presenta mejores resultados que la hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 72 % (m/m) y la básica con NaOH 2 % (m/m).

TABLA IX.
RESULTADOS HIDRÓLISIS RAQUIS DE PALMA

Nº	Tipo de hidrólisis	Descripción	Concentración AR (g/L)
1	Ácida	H_2SO_4 [2 %]; Relación 1:8	11,015
2	Ácida	3 mL H_2SO_4 [72 %] Relación 1:290	0,941
3	Básica	NaOH [2 %] Relación 1:30	3,451

Fuente: Autora.

6.5. Curva de calibración albúmina de suero bovino

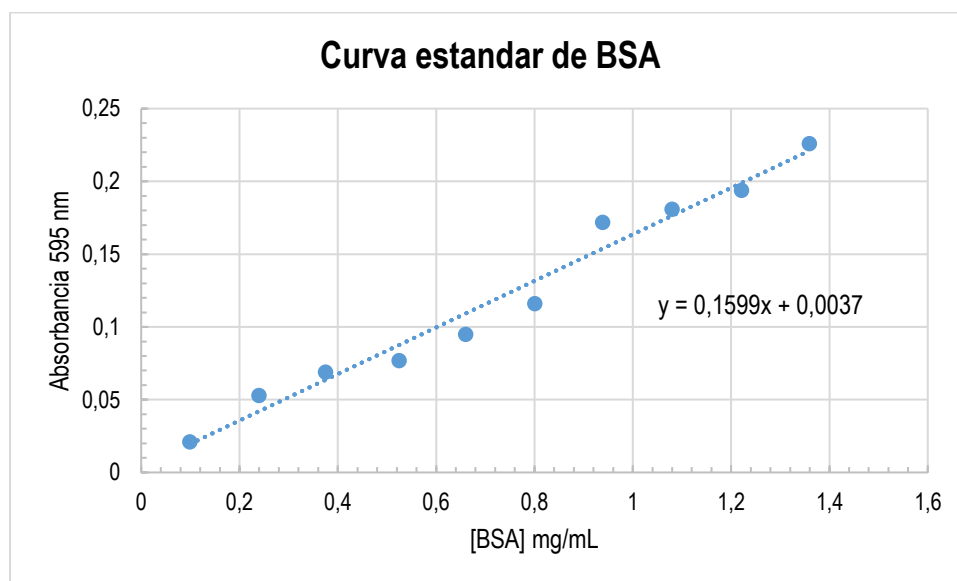


Fig. 12. Curva estándar de Albúmina de Suero Bovino.

Nota: fuente autora.

Se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm frente a un blanco que contenía 60 μL de agua mezclada con 940 μl del reactivo de Bradford. La **Fig. 12**, muestra un ajuste lineal por mínimos cuadrados de la línea, se produjo la siguiente ecuación:

$$y = 0,1599 [BSA] + 0,0037 \quad \text{Ecuación (2)}$$

6.6. Fermentación

Finalizado el proceso de reacción donde se dio la producción de los lipopéptidos **Fig. 13**, se hizo un análisis estadístico para determinar cuál tratamiento proporcionó una mayor concentración de los metabolitos de interés.



Fig. 13 Fermentación de los 4 medios de cultivo a las temperaturas 15 - 32 - 37 y 40 °C 36 horas de reacción.

Nota: fuente autora.

El resumen del ANOVA permite reconocer si los tratamientos desarrollados para la producción de lipopéptidos influyen sobre el valor medio de la absorbancia (como medida indirecta de su concentración) o bien si los tratamientos poseen efectos distintos (o no) sobre la variable respuesta. De acuerdo con la figura siguiente, puede observarse que el valor $\text{Pr}(> F)$ es menor que 0.05 en los 3 casos (medio, temperatura, interacción) y se puede concluir que los tratamientos si influyen sobre la respuesta media de la absorbancia. Es decir, la temperatura influye, el medio influye, así como la interacción entre dichos factores en los niveles de absorbancia encontrados.

Si el valor p es mayor que 0,05 se acepta la hipótesis nula; esta sería que el factor en análisis no tiene efectos sobre la variable respuesta. En contraposición, la alternativa sería que los factores tienen efectos sobre la variable respuesta distintos de 0.

Ahora bien, se podrá identificar qué tratamientos producen mayores efectos en la producción de lipopéptidos **Fig. 14**.

```
> summary(ANOVA1)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
medio          3  2.0760   0.6920  29.823 8.71e-07 ***
temperatura    3  0.2825   0.0942   4.059  0.0254 *
medio:temperatura 9  0.5514   0.0613   2.640  0.0433 *
Residuals     16  0.3713   0.0232
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Fig. 14 Resumen de la ANOVA: Perspectiva bifactorial (medio y temperatura).

El diagrama de caja y bigote permitió evaluar previamente los efectos de los tratamientos sobre la producción de lipopéptidos. En la **Fig. 15** Se puede apreciar que los mayores efectos dentro de cada subgrupo los generan los tratamientos T₃M₁, T₂M₂, T₄M₃ y T₃M₄. Es decir, los tratamientos que presentan mayores efectos positivos sobre la producción de lipopéptidos fueron Landy a 37 °C, Luria a 32 °C, Hidrolizado de harina de banano a 40 °C e Hidrolizado de raquis a 37 °C.

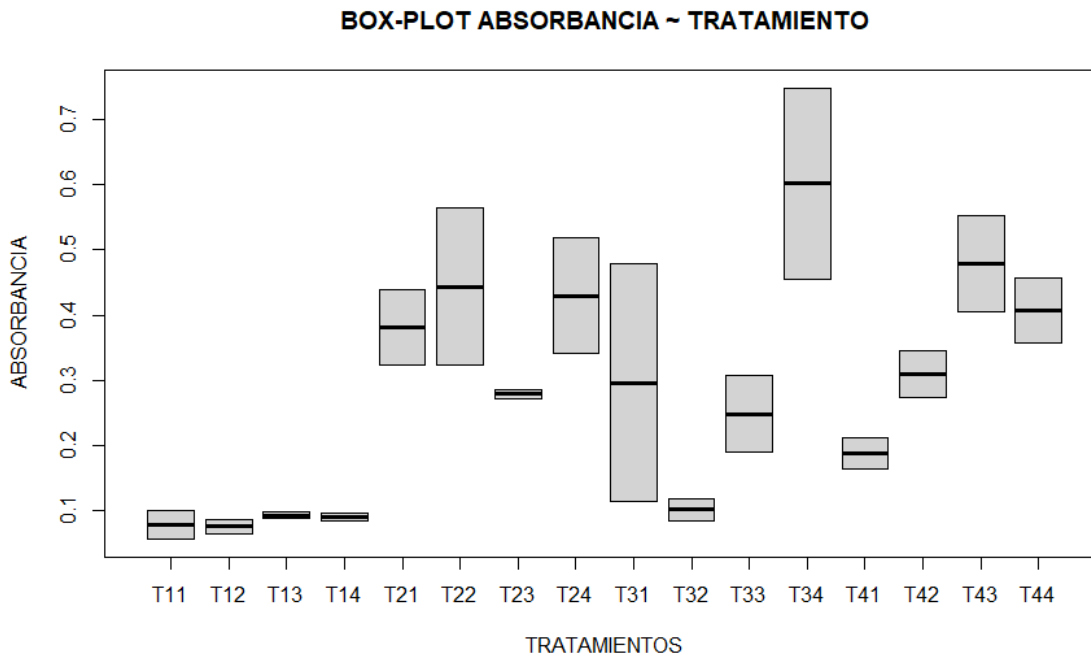


Fig. 15 Diagrama de caja y bigotes.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

La **Fig. 16** muestra, desde un punto de vista global, ya no por subgrupos, que los tratamientos con mayores efectos positivos sobre la variable respuesta “mayor absorbancia” son T₄M₂, T₂M₂, T₃M₄ y T₄M₃. Es decir, Luria a 40 °C, Luria a 32 °C, Hidrolizado de raquis a 37 °C e Hidrolizado de harina de banano a 40 °C; siendo este último, aquel con mayor concentración final del metabolito de interés.

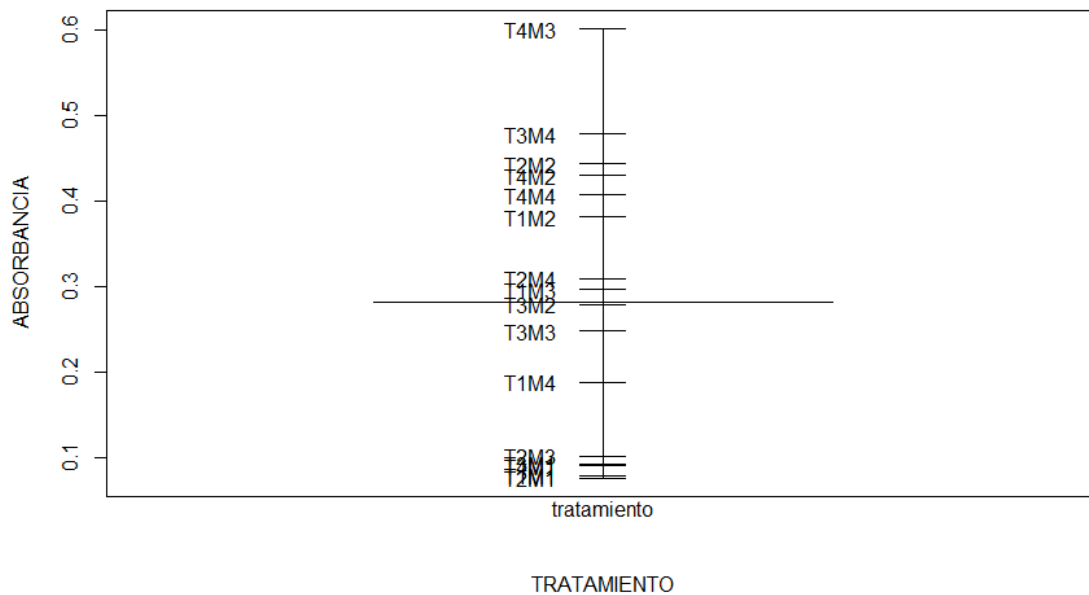


Fig. 16 Efectos de los tratamientos.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

Los resultados expuestos anteriormente se tomarán como válidos siempre que se puedan comprobar ciertos supuestos; estos son la normalidad, independencia y homocedasticidad de los residuales del modelo lineal sometido al análisis de varianza.

La **Fig. 17** permitió reconocer cuáles son los efectos de los factores de manera independiente. Siguiendo esto, se observa que el medio M1 es aquel que produce los menores niveles de absorbancia, mientras que los medios M2, M3 y M4 sugieren que producen un efecto similar sobre los niveles de absorbancia, todos ellos altos en relación con M1, siendo M2 (Luria), aquel que produce los mayores niveles de absorbancia. Por otra parte, las temperaturas T1 y T2 producen el menor efecto sobre los niveles de absorbancia teniendo entre ambos un efecto casi igualitario. Por otra parte, la temperatura T4 (40 °C), la mayor de las temperaturas trabajadas produce los mayores efectos sobre los niveles de absorbancia junto con una marcada diferencia respecto a los efectos producidos por las restantes. Sin embargo, aun cuando el medio M2 y la temperatura T4 parecen producir los mayores efectos positivos sobre el nivel de absorbancia muestral, asumir que es el

tratamiento adecuado y óptimo sería apresurado. Para concluir al respecto, es necesario revisar la **Fig. 18** de efectos de interacción.

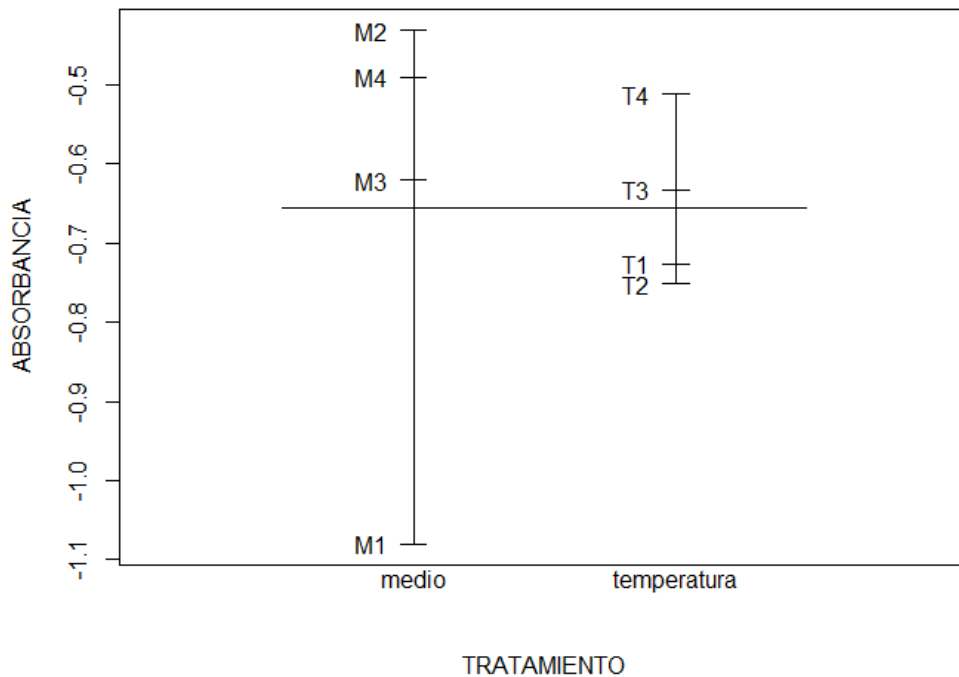


Fig. 17 Efectos principales.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

A partir de la **Fig. 18**, es posible reconocer como los cambios de los niveles de un factor manteniendo el otro fijo, afecta los niveles de absorbancia esperados. Se observa que la línea de color azul, asociada a la temperatura de 40 °C posee niveles de absorbancia mucho mayores que las líneas asociadas a las temperaturas restantes al avanzar en los niveles del factor medio. Aquí, es evidente, que el medio M3 bajo la temperatura T4, corresponde al tratamiento óptimo dentro de este estudio, pues, este maximiza la producción de lipopéptidos.

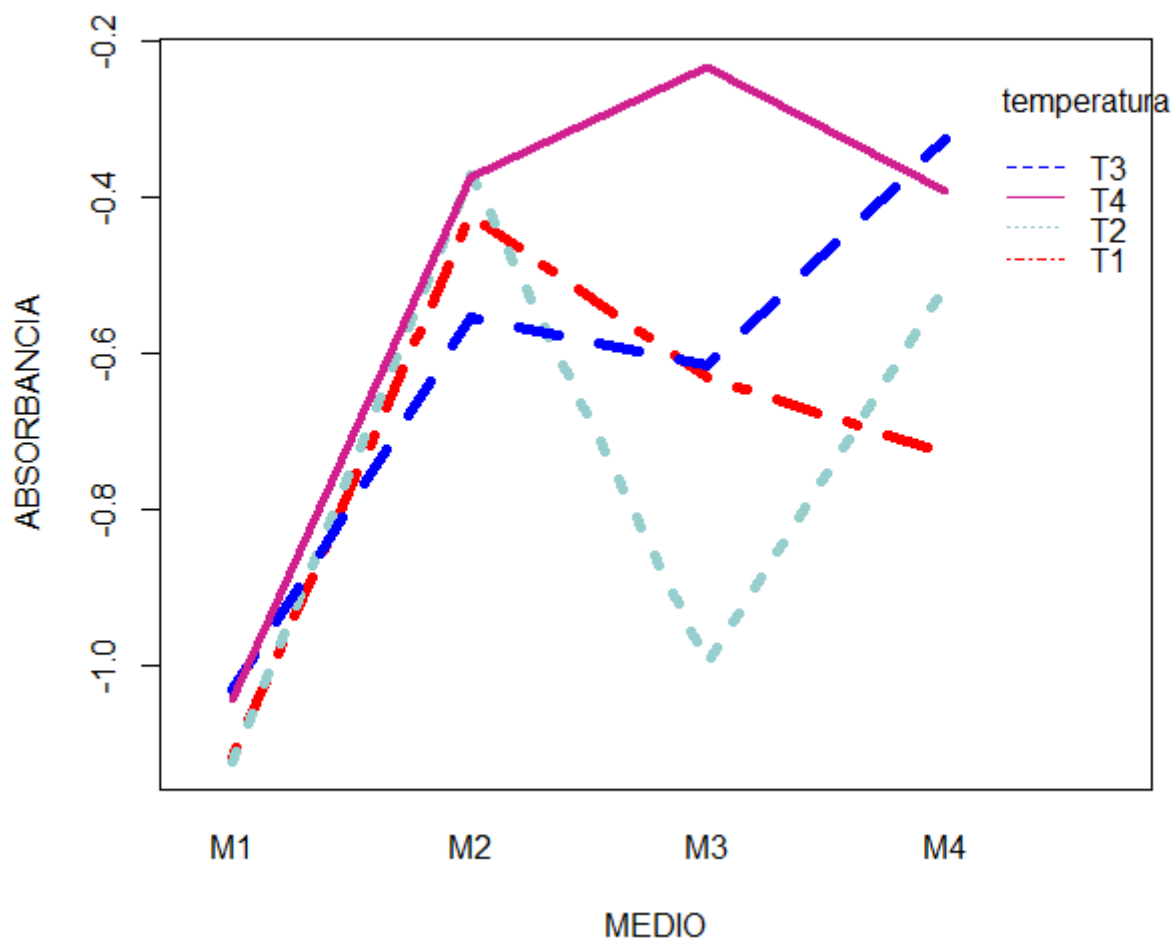


Fig. 18 Efectos de interacción entre los factores.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

Una forma de analizar los efectos principales de los factores sobre los niveles de absorbancia es a través de la matriz gráfica 2x2 presentada en la **Fig. 19**. En las posiciones 1,1 y 2,2 de la matriz se puede observar la tendencia de los efectos de un factor sobre la variable absorbancia a medida que se recorren sus niveles, revisados de izquierda a derecha. De igual manera, en las posiciones 1,2 y 2,1 de la matriz gráfica se evidencia cuál es el comportamiento de los niveles de absorbancia al mantener la variable medio fija (una de las secciones de línea de alguno de los 4 colores) mientras

se avanza en los niveles del factor temperatura de izquierda a derecha así como al mantener la variable temperatura fija mientras se avanza en los niveles del factor medio de izquierda a derecha respectivamente en las posiciones matriciales indicadas anteriormente.

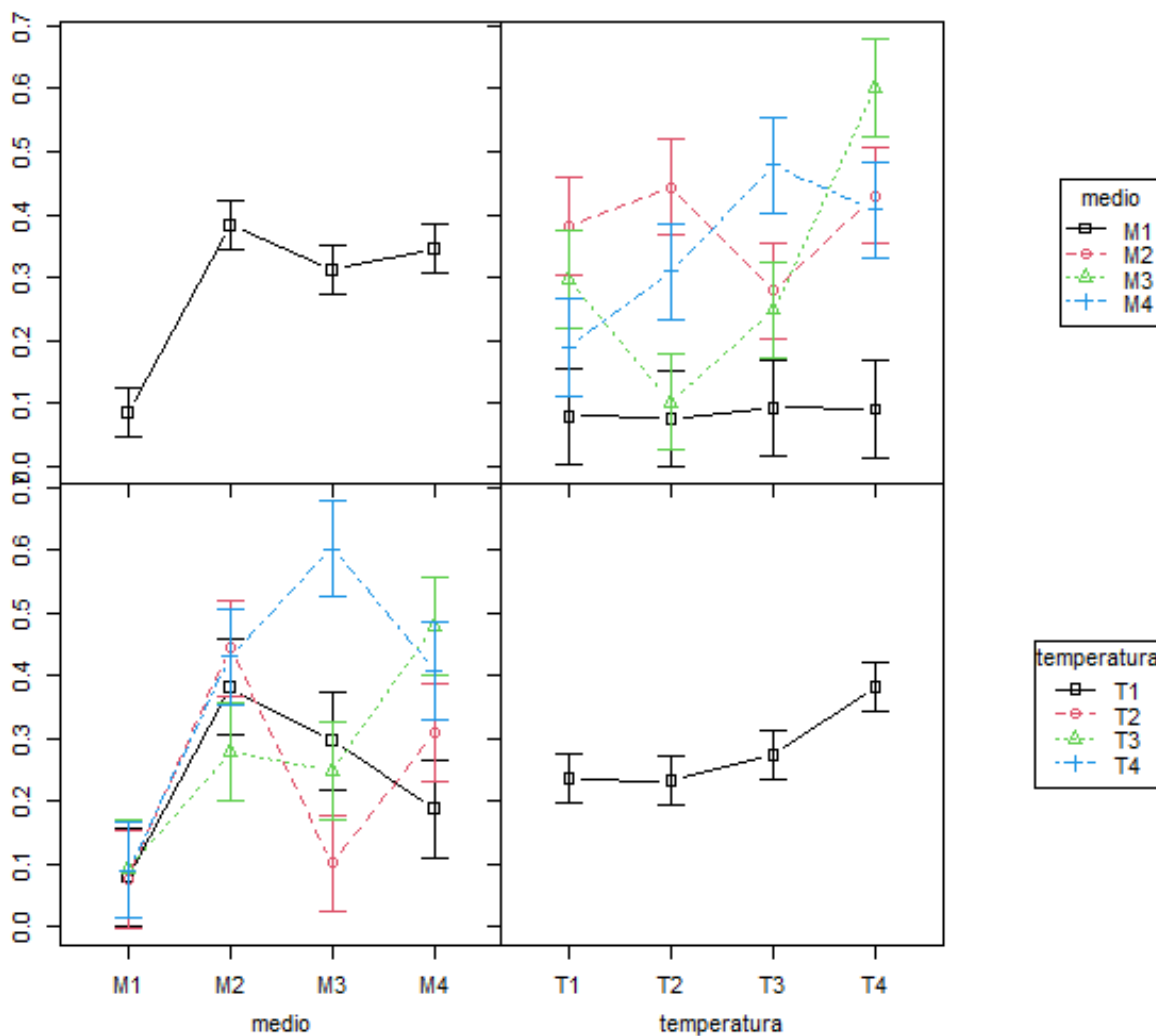


Fig. 19 Matriz gráfica medio – temperatura. Media ajustada.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS Y ANÁLISIS RESIDUAL

NORMALIDAD DE LOS RESIDUALES

PRUEBAS NUMÉRICAS

Siempre que el valor p (*p-value*) sea mayor que 0,05 se puede afirmar con un 95 % de confianza que los residuales presentan distribución normal. Las pruebas mostradas las **Fig. A, B y C** en el **ANEXO 3** permitieron concluir que los residuales se distribuyen de manera normal y se cumple el supuesto.

Por otra parte, es posible reconocer la distribución de probabilidad de los residuales a través del histograma de frecuencias **Fig. 20** y la revisión de la curva de probabilidad **Fig. 21**:

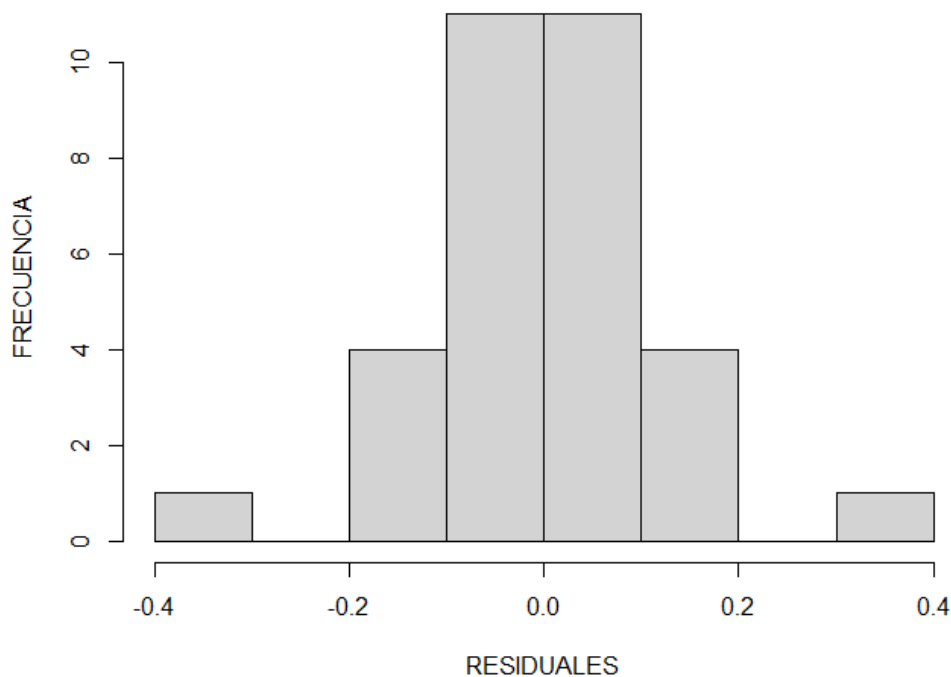


Fig. 20 Histograma de frecuencia.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

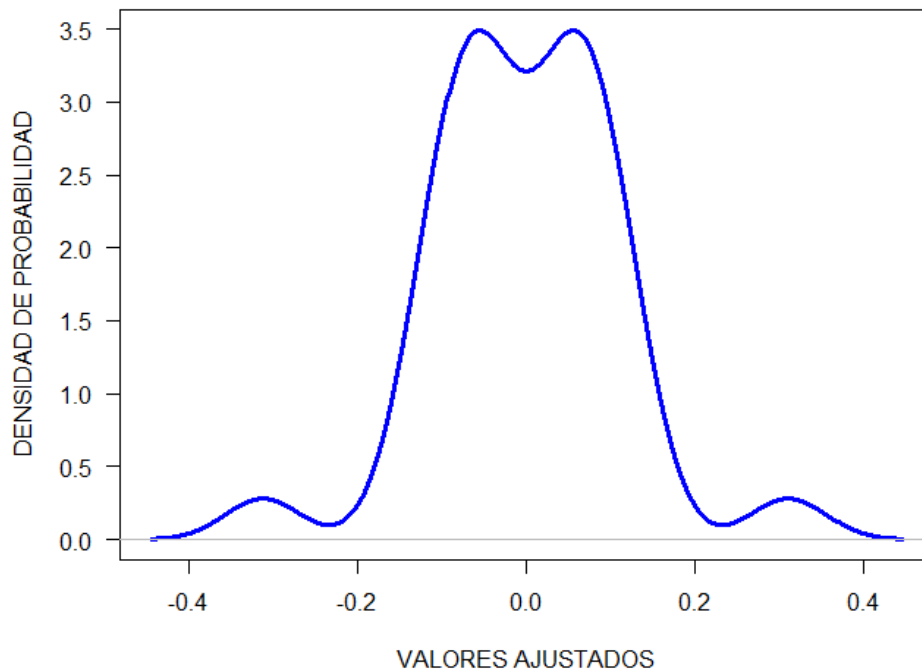


Fig. 21 Distribución de probabilidad normal de los residuales.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

Se confirma que la distribución es de campana con media 0 y varianza casi constante. Podría existir un problema de varianza dado que las colas de la distribución presentan variabilidad sin percibir la campana homogénea. Sin embargo, mediante la prueba de homogeneidad de varianza y la prueba de independencia de los residuales se podrán confirmar cualquier duda al respecto.

La **Fig 22** se usa como una prueba gráfica adicional. Tan solo dos datos parecen no estar incluidos en las bandas que garantizan la normalidad residual. Sin embargo, el supuesto de normalidad se cumple y los residuales del modelo presentan distribución de probabilidad normal.

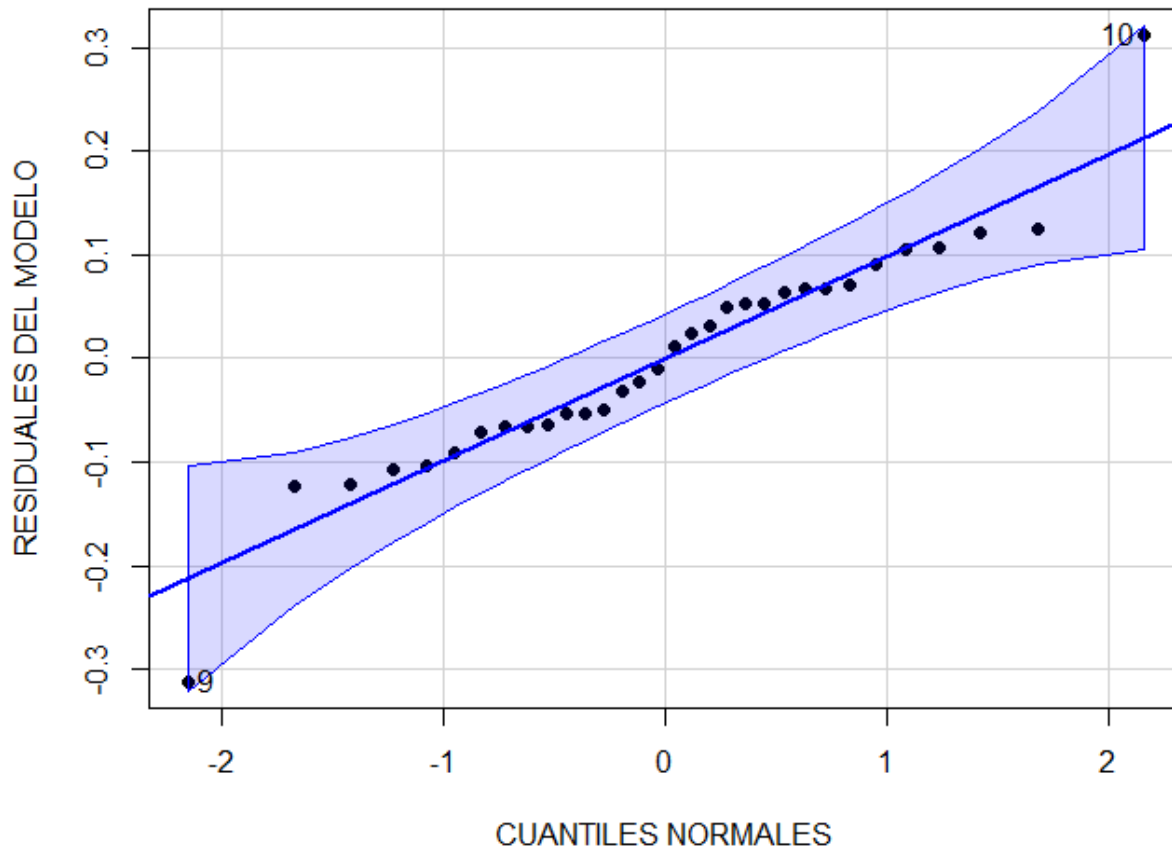


Fig. 22 Normalidad QQ-PLOT.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

HOMOGENEIDAD DE VARIANZA

Siguiendo el test de homogeneidad de varianza, se concluye que los residuales presentan homocedasticidad, pues el valor p es mayor que 0,05. Ver **ANEXO 4**.

La **Fig. 23** permite confirmar lo anterior, pues, no se observan patrones, picos, valles, o alguna figura con cierta tendencia si no que se aprecia una nube de puntos.

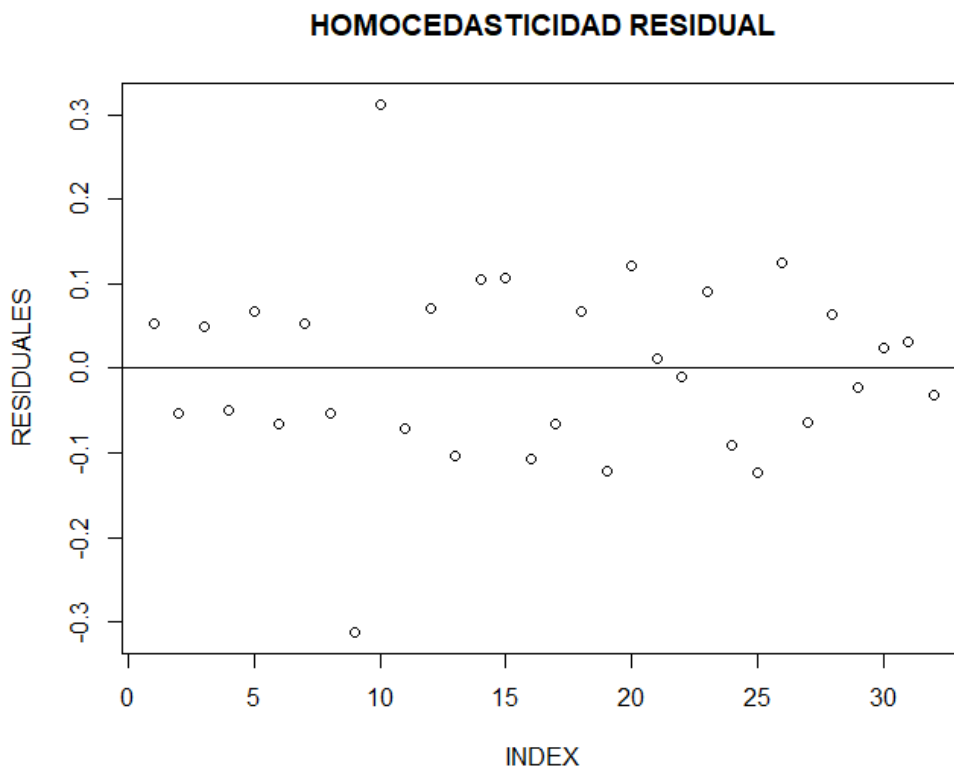


Fig. 23 Homocedasticidad residual.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

INDEPENDENCIA DE LOS RESIDUALES

A través del test de Durbin - Watson también es posible confirmar el cumplimiento del supuesto de independencia dado que el valor p es mayor que 0,05. Ver **ANEXO 5**.

6.7. Contenido proteico

Los extractos obtenidos después de la separación de cada uno de los tratamientos se pueden ver en la **Fig. 24**. La concentración proteica en los fermentados producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus Subtilis* en los distintos medios de cultivo a temperaturas diferentes se determinó mediante la prueba de Bradford.



Fig. 24 Extractos lipopeptídicos.

Nota: fuente autora.

Usando la **ecuación 2** fue posible calcular el contenido proteico de los diferentes tratamientos, la **Fig. 25** muestra la cantidad de proteína cuantificada en cada medio de cultivo a las diferentes temperaturas expresado en $\mu\text{g/L}$.

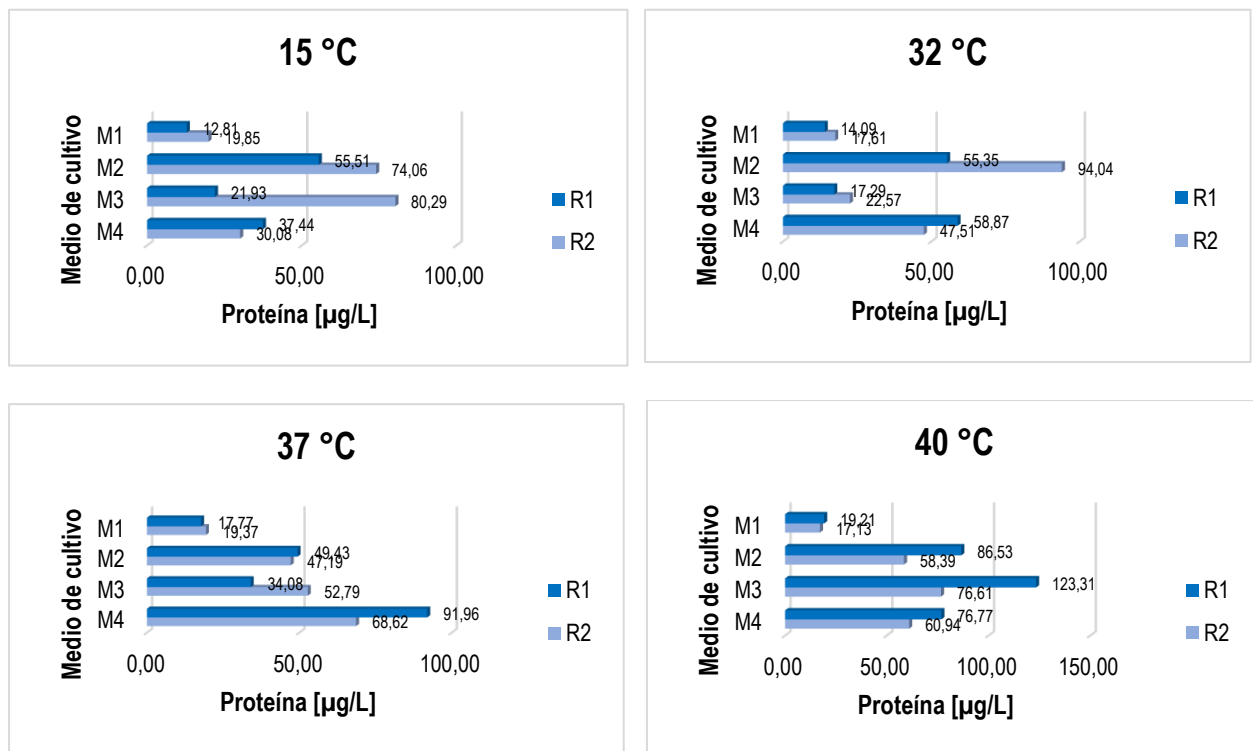


Fig. 25 Proteína total.

Nota: fuente autora.

6.8. Sensibilidad

6.8.1 Inhibición del tubo germinativo de *Mycosphaerella fijiensis*

Con el fin de determinar la capacidad antifúngica de las soluciones, se realizó la descarga de las ascosporas sobre las diferentes cajas con el tratamiento en específico, se tenían dos repeticiones por cada tratamiento, la **TABLA X**, se muestra el porcentaje de inhibición, el cual se calculó usando la **ecuación 1**, en cada tratamiento de evaluaron 20 ascosporas.

TABLA X.
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *M. fijiensis*

Tratamiento	Promedio datos		% Inhibición	% Crecimiento
	Réplica 1	Réplica 2		
Testigo	90,15	90,1	0,00	100
Control 1: Sico	5,25	4,00	94,87	5,13
Control 2: Serenade	8,75	6,55	91,51	8,49
T ₁ M ₃	20,50	21,95	76,44	23,56
T ₂ M ₂	7,40	6,45	92,31	7,69
T ₃ M ₄	5,30	5,55	93,98	6,02
T ₄ M ₃	2,80	2,00	97,34	2,66

Fuente: Autora.

La **Fig. 26**, corresponde al testigo absoluto, se pueden observar las ascosporas globosas, con germinación tipo bipolar, su tamaño fue $\geq 1\mu\text{m}$, mientras que el tamaño del tubo germinativo alcanzó a medir más de $100\mu\text{m}$.

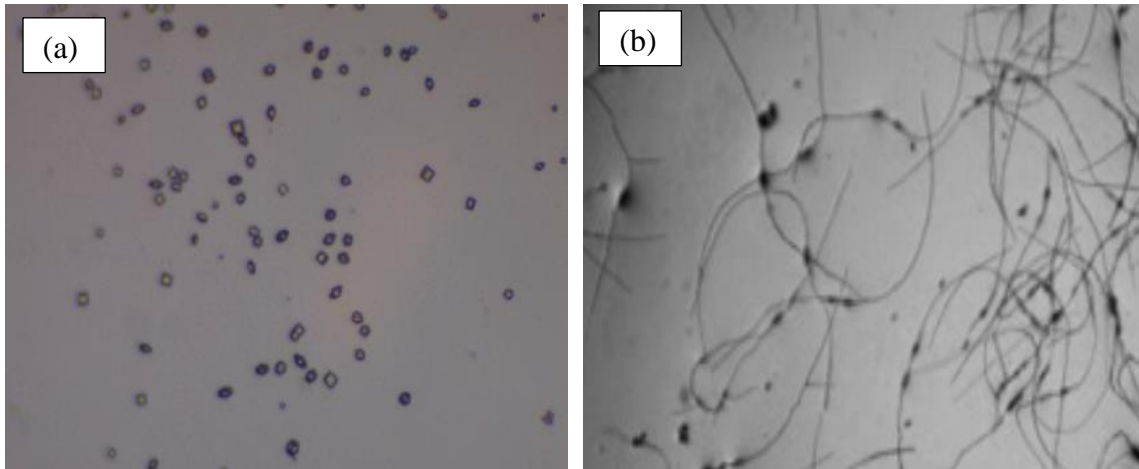


Fig. 26 Testigo: Ascosporas de *M. fijiensis*. (a): sin germinar; (b) Ascosporas germinada a las 48 h.
Nota: fuente autora.

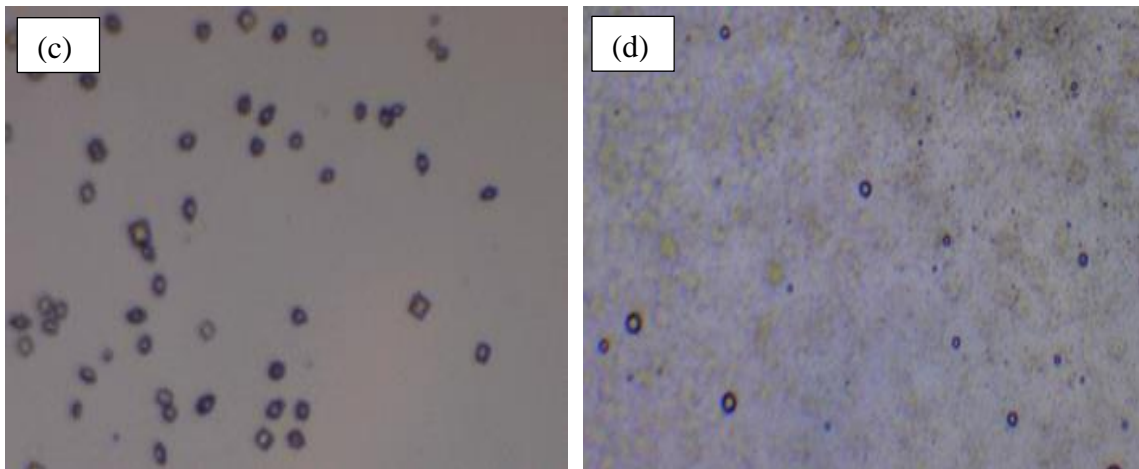


Fig. 27 Ascosporas de *M. fijiensis* 10 X - Control 1: *SICO*. (c): sin germinar; (d) Cultivo a las 48 h.
Nota: fuente autora.

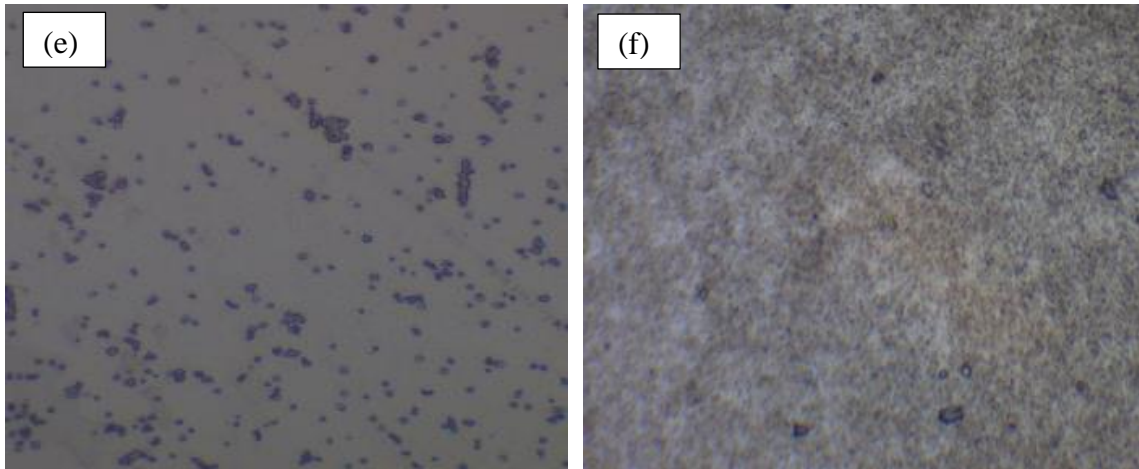


Fig. 28 Ascosporas de *M. fijiensis* 10 X - Control 2: Serenade. (e): sin germinar; (f) Cultivo a las 48 h.
Nota: fuente autora.

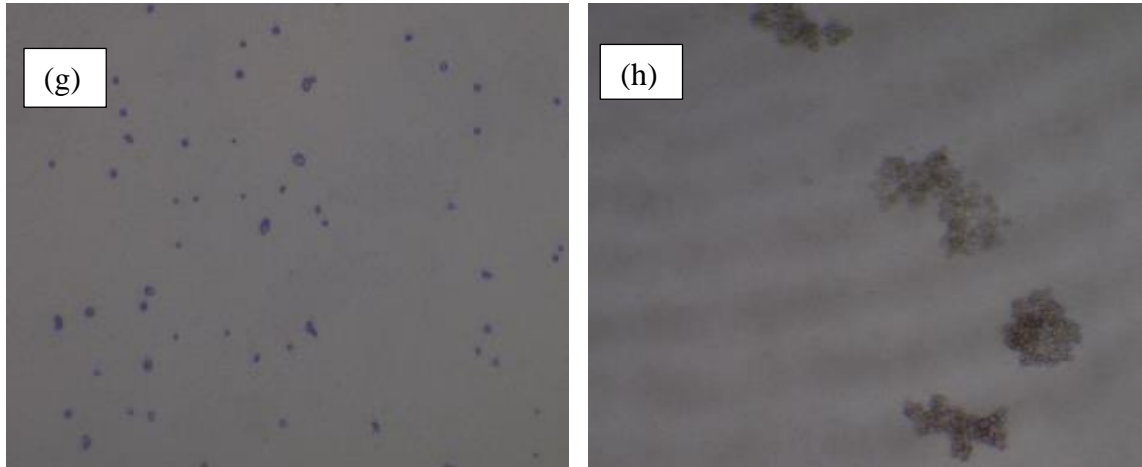


Fig. 29 T₁M₃: (g) Ascosporas sin germinar de *M. fijiensis* 10 X ; (h) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.
Nota: fuente autora.

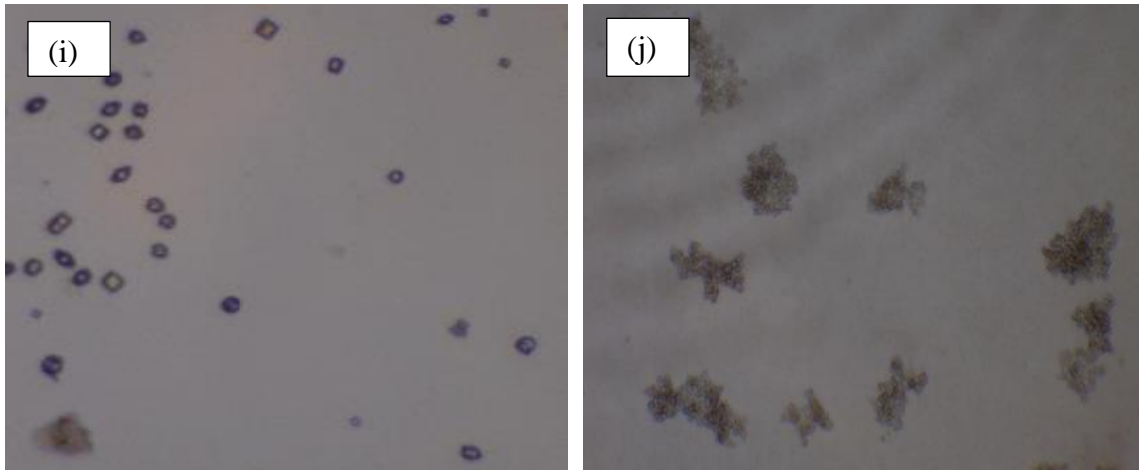


Fig. 30 T₂M₂: (i) Ascosporas sin germinar de *M. fijiensis* 10 X ; (j) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS
Nota: fuente autora.

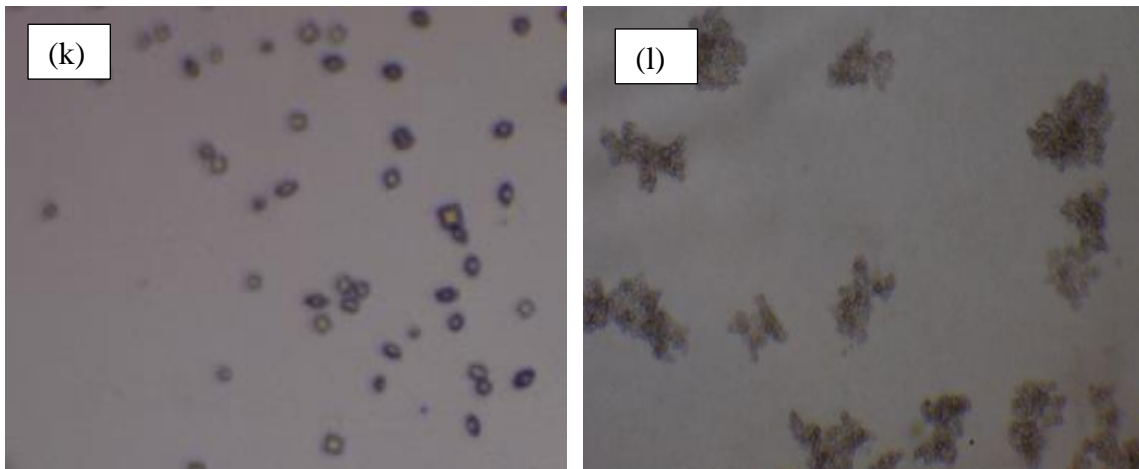


Fig. 31 T₃M₄: (k) Ascosporas sin germinar de *M. fijiensis* 10 X ; (l) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.
Nota: fuente autora.

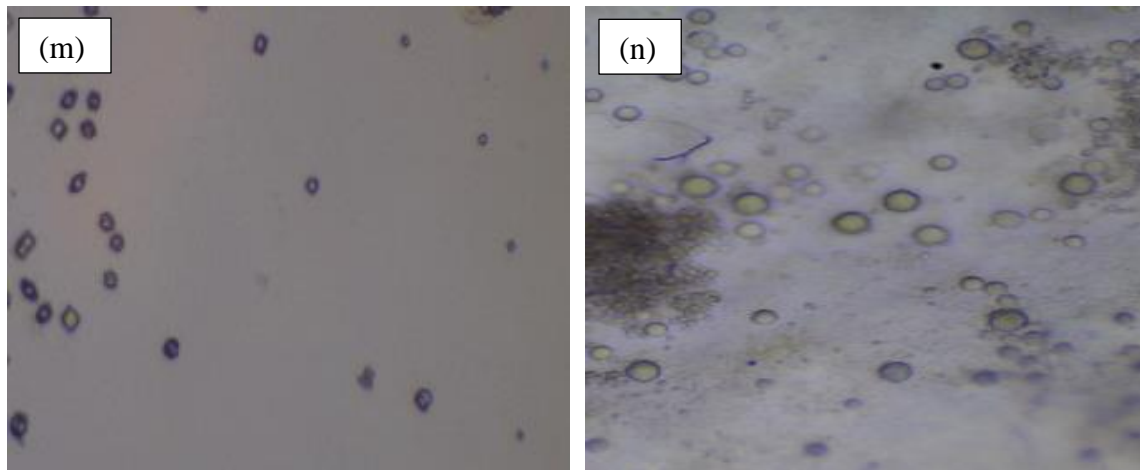


Fig. 32 T₄M₃: (m) Ascosporas sin germinar de *M. fijiensis* 10 X ; (n) Cultivo a las 48 h, presunto cúmulo de BAS.
Nota: fuente autora.

La **Fig 33**. Muestra un resumen del desarrollo del tubo germinativo en los diferentes tratamientos evaluados.

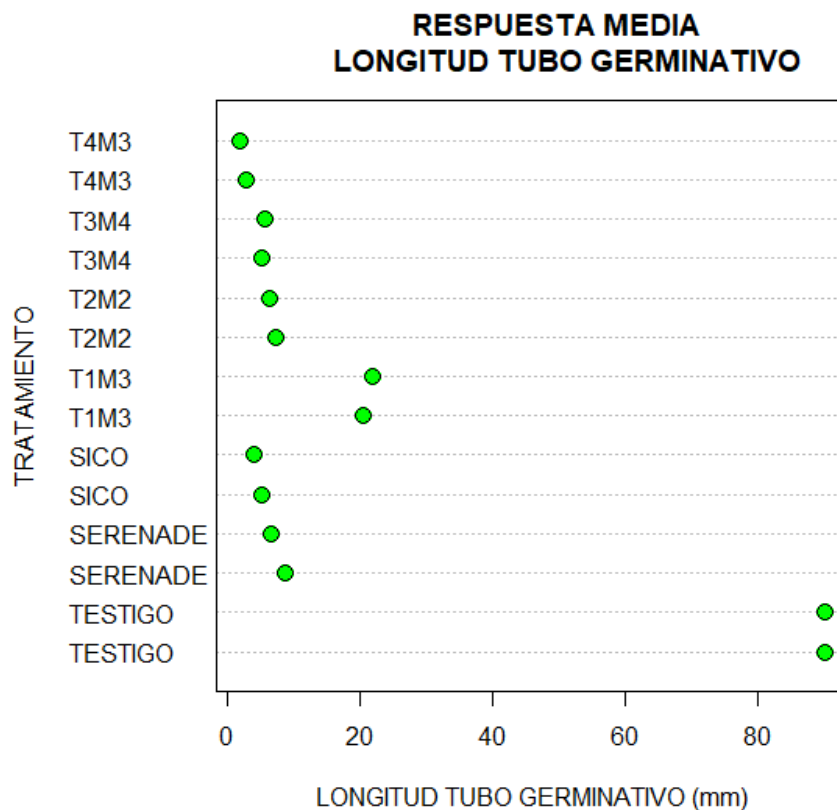


Fig. 33 Resumen comportamiento del tubo germinativo.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

```
> summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
tratamiento 6 12001  2e+03  2769 1.9e-11 ***
Residuals  7     5  7e-01
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Fig. 34 Resumen ANOVA sensibilidad.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

En la **Fig. 34** es posible evidenciar que el valor P en el resumen ANOVA es menor que 0,05 así que existe por lo menos un par de tratamientos con efectos diferentes sobre la variable respuesta. Esto es, existe por lo menos un par de tratamientos (fungicidas) que conducen al crecimiento en distintas longitudes del tubo germinativo del hongo. Ahora bien, esto podrá ser tomado en consideración siempre que se cumplan los supuestos del modelo respecto a los residuales, a saber, el supuesto de normalidad, homocedasticidad e independencia.

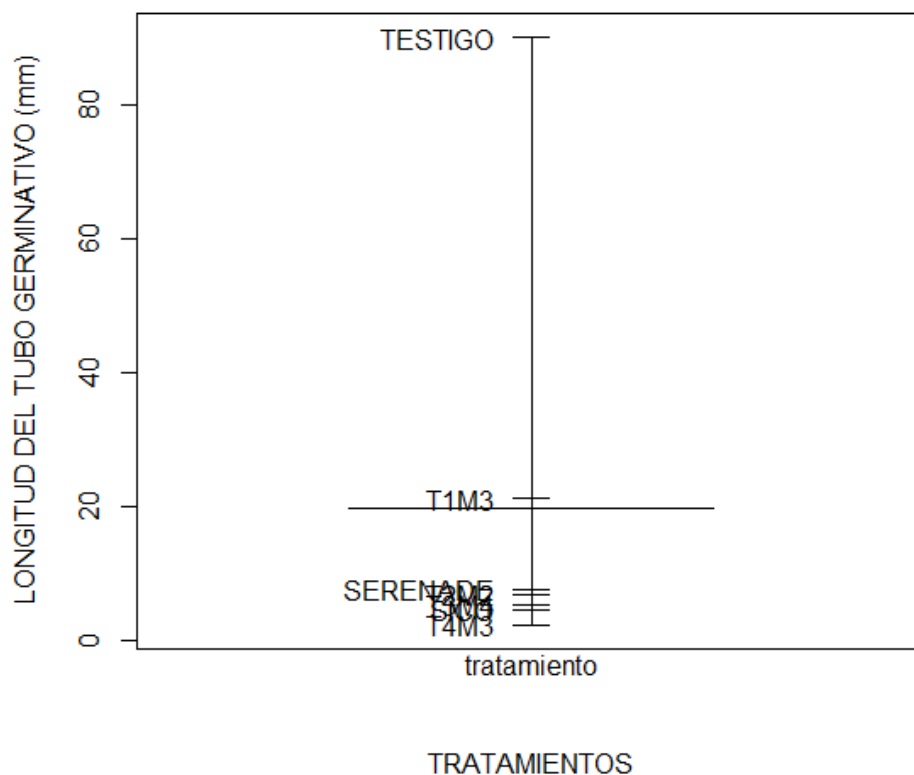


Fig. 35 Efectos de los tratamientos en el desarrollo del tubo germinativo.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

El tratamiento “TESTIGO” no corresponde a alguna sustancia con actividad antifúngica. Este sirve como muestra para contrastar los efectos de los demás tratamientos; en este, el crecimiento del hongo se dio de manera natural sin algún tipo de inhibidor.

En la **Fig. 35**, Se busca reconocer cuál de los tratamientos reduce en mayor medida la longitud del tubo germinativo. Entre estos están Serenade, T₂M₂, T₃M₄, SICO y T₄M₃ en orden de menor a mayor inhibición del crecimiento del tubo, siendo T₄M₃ aquel con mejores efectos en la limitación del crecimiento del tubo germinativo del hongo. Esto, será un poco más evidente en la **Fig 36**.

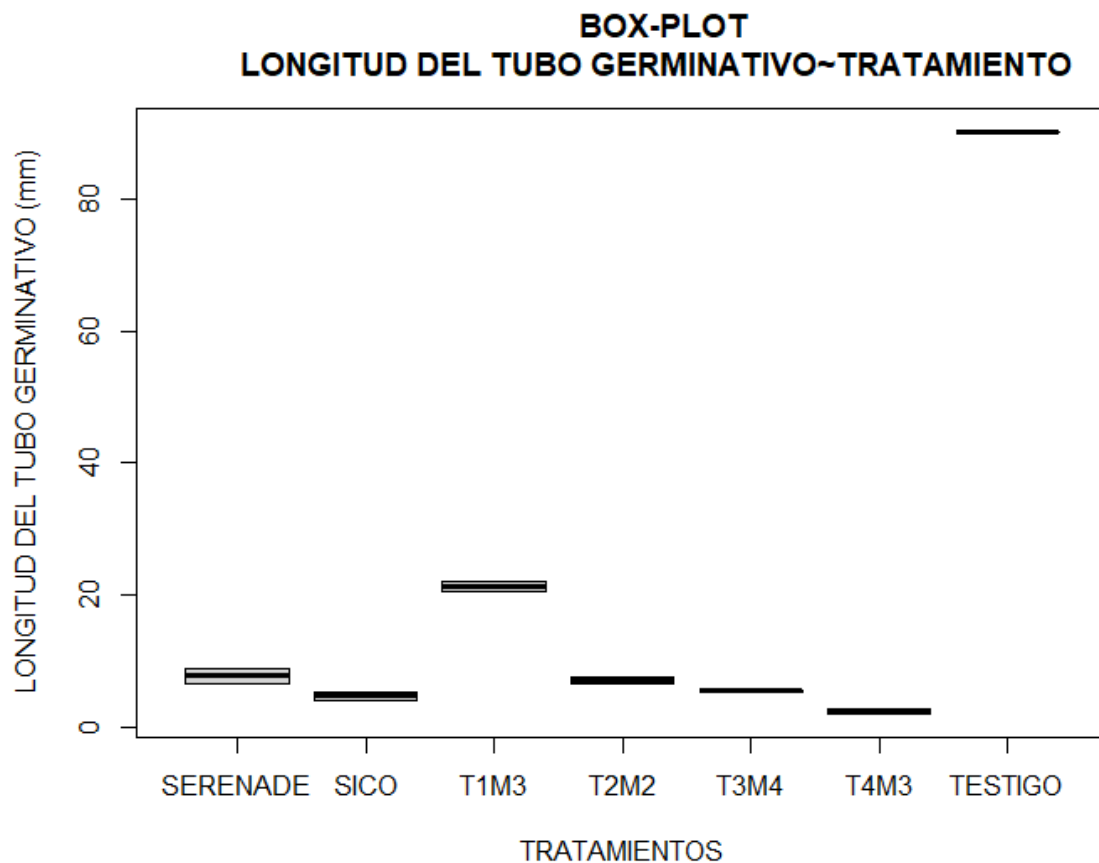


Fig. 36 Gráfico de caja y bigote – Sensibilidad.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

En la **Fig. 36** es mucho más evidente lo que se quería expresar en la **Fig. 35** presentada anteriormente. Los tratamientos T₂M₂, T₃M₄ y T₄M₃ resultan alentadores respecto a los

comercialmente desarrollados como Serenade y SICO, siendo T₄M₃ el mejor de todos los evaluados en este estudio.

ANÁLISIS RESIDUAL

NORMALIDAD RESIDUAL

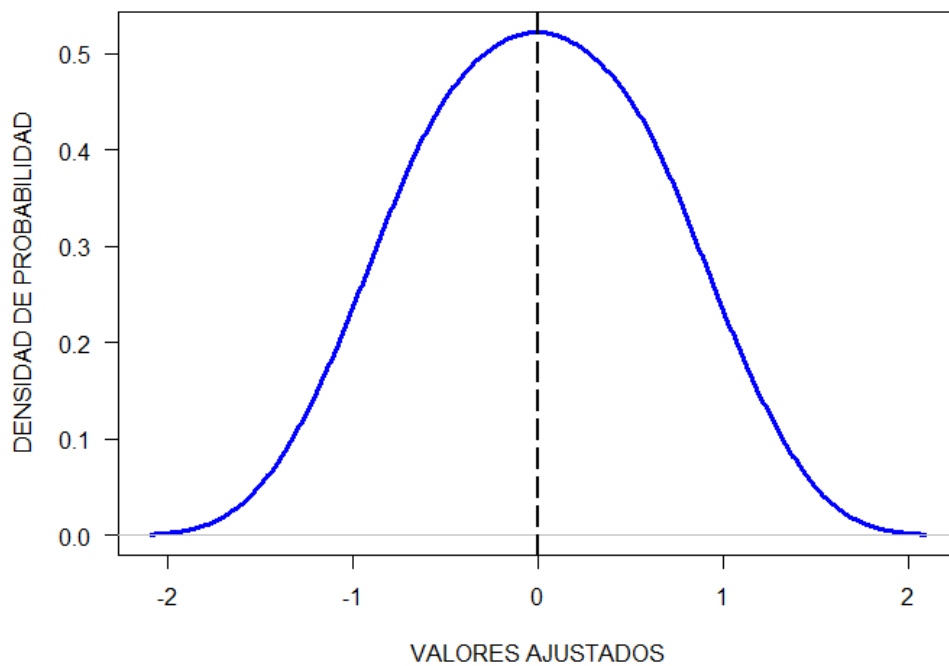


Fig. 37 Distribución de los residuos del modelo.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

En la **Fig. 37**, se evidencia que la distribución de probabilidad de los residuos del modelo es semejante a la distribución de probabilidad normal con media 0. Por otra parte, la **Fig. 38** presenta una tendencia altamente lineal donde se corrobora el hecho anterior. Finalmente, se espera que las pruebas numéricas confirmen este hecho y se afirme que el supuesto de normalidad residual se cumple.

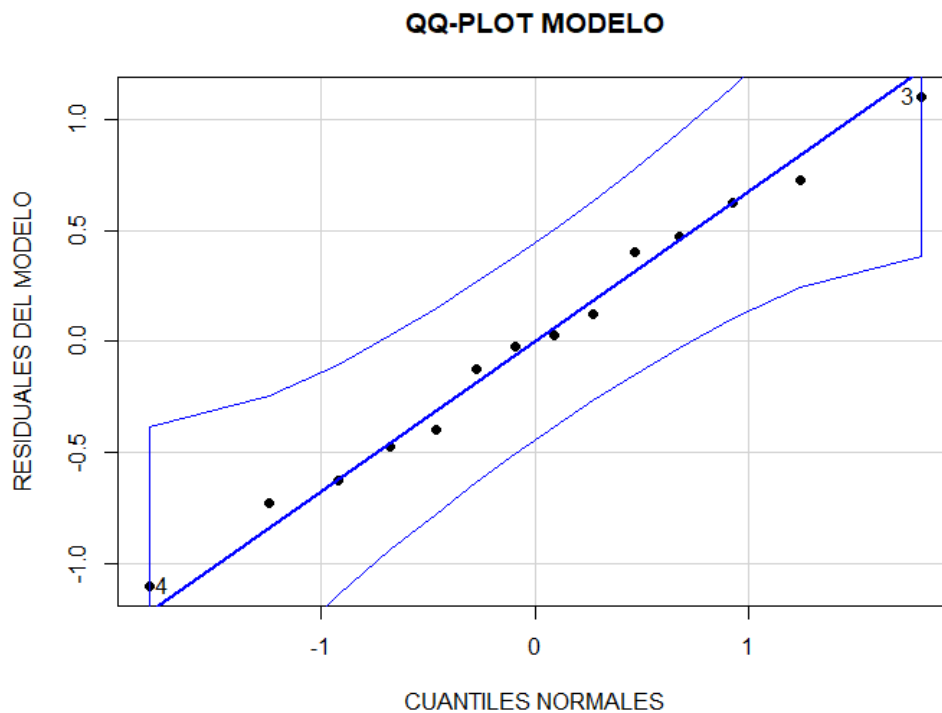


Fig. 38 QQ-PLOT.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

El valor p en las pruebas de normalidad que es mayor que 0,05 por lo que se confirma gráfica y numéricamente que se cumple el supuesto de normalidad, ver ANEXO 6.

HOMOCEASTICIDAD RESIDUAL

Dado que el valor p en el test de Breusch mostrado en el ANEXO 7 es mayor que 0,05 se confirma numéricamente la homocedasticidad de los residuales. Este hecho se confirma gráficamente a partir de la Fig 39; en él no se identifica ningún tipo de diagrama de puntos que viole el supuesto de homocedasticidad y se concluye que los residuales presentan homocedasticidad.

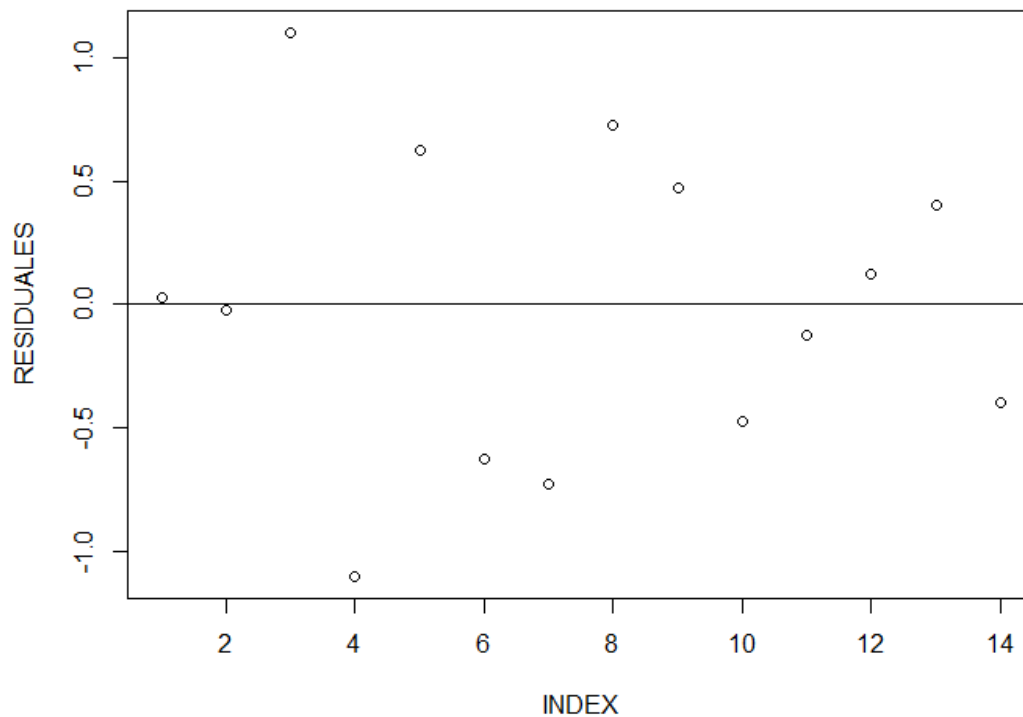


Fig. 39 Homocedasticidad residual - Prueba de sensibilidad.

Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

INDEPENDENCIA RESIDUAL

En el **ANEXO 8**, se evidencia que el valor p es mayor que 0,05 lo cual confirma que los residuales cumplen con el supuesto de independencia. Finalmente, los supuestos de los residuales del modelo se cumplen y se podrán extraer como verdaderas las conclusiones desarrolladas a lo largo del estudio del efecto de los tratamientos sobre la longitud del tubo germinativo.

COMPARACIONES MÚLTIPLES

TABLA XI.
PRUEBA DE TUKEY

```
> TukeyHSD(ANOVA)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = modelo)

$tratamiento
      diff      lwr      upr      p adj
SICO-SERENADE -3.025 -6.393851  0.3438506 0.0806894
T1M3-SERENADE 13.575 10.206149 16.9438506 0.0000108
T2M2-SERENADE -0.725 -4.093851  2.6438506 0.9695414
T3M4-SERENADE -2.225 -5.593851  1.1438506 0.2480135
T4M3-SERENADE -5.250 -8.618851 -1.8811494 0.0047975
TESTIGO-SERENADE 82.475 79.106149 85.8438506 0.0000000
T1M3-SICO      16.600 13.231149 19.9688506 0.0000022
T2M2-SICO      2.300 -1.068851  5.6688506 0.2237528
T3M4-SICO      0.800 -2.568851  4.1688506 0.9526720
T4M3-SICO     -2.225 -5.593851  1.1438506 0.2480135
TESTIGO-SICO   85.500 82.131149 88.8688506 0.0000000
T2M2-T1M3     -14.300 -17.668851 -10.9311494 0.0000074
T3M4-T1M3     -15.800 -19.168851 -12.4311494 0.0000034
T4M3-T1M3     -18.825 -22.193851 -15.4561494 0.0000008
TESTIGO-T1M3   68.900 65.531149 72.2688506 0.0000000
T3M4-T2M2     -1.500 -4.868851  1.8688506 0.6024810
T4M3-T2M2     -4.525 -7.893851 -1.1561494 0.0111414
TESTIGO-T2M2   83.200 79.831149 86.5688506 0.0000000
T4M3-T3M4     -3.025 -6.393851  0.3438506 0.0806894
TESTIGO-T3M4   84.700 81.331149 88.0688506 0.0000000
TESTIGO-T4M3   87.725 84.356149 91.0938506 0.0000000
```

Siempre que el valor p-adj de un par de tratamientos sea mayor que 0,05 podemos afirmar que sus efectos sobre la variable respuesta son iguales. Si usamos como ejemplo el primer par a comparar SICO-Serenade presentado en la **TABLA XI**, podemos observar que su valor p-adj es mayor que 0,05 y se puede afirmar que producen el mismo efecto inhibitorio en el crecimiento del tubo germinativo.

Otra forma de apreciar este hecho es a partir de la **Fig. 40** la cuál es una representación alternativa de la **TABLA XI**. En esta, se considera que un par de tratamientos producen efectos similares sobre el crecimiento del tubo siempre que las líneas horizontales (con 2 tramos) sean atravesadas por la línea vertical que pasa a través del 0. Por otra parte, cada una de las líneas presentadas corresponde a la concerniente en tabla, desde arriba hacia abajo y se presentan los nombres de las comparaciones entre solo 4 tratamientos.

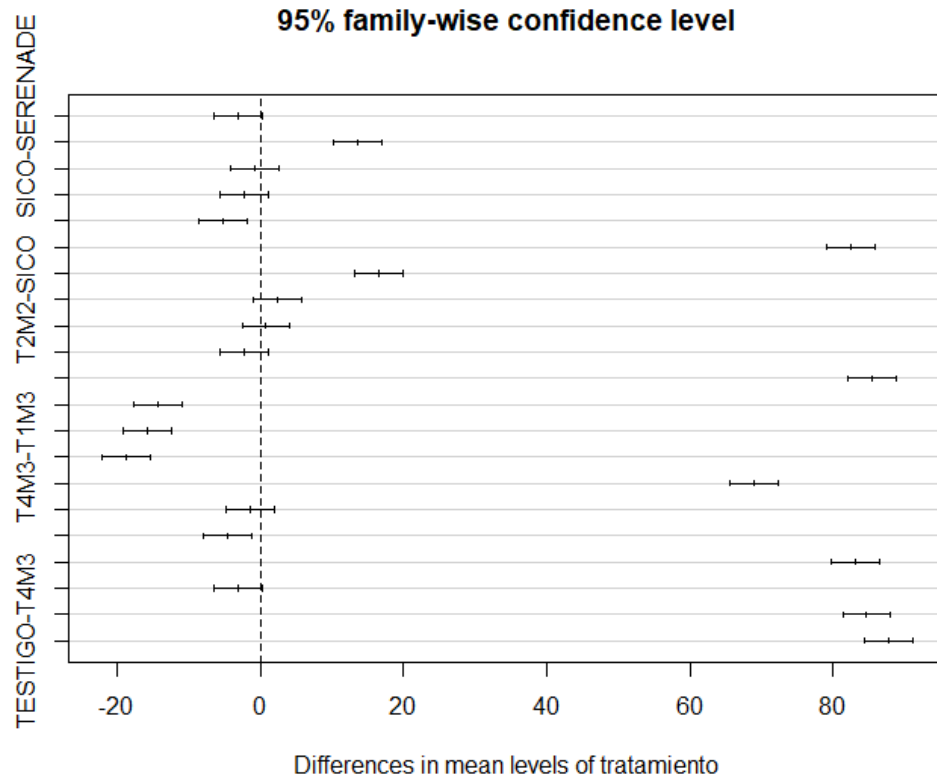


Fig. 40 Resumen gráfico de la prueba Tukey.
Nota: fuente autora, usando el software R - Studio.

De aquí podemos concluir que el tratamiento T₄M₃ es más efectivo que Serenade, pero conduce a una respuesta media igual a la de SICO. Por otra parte, los tratamientos T₂M₂, T₃M₄ y T₄M₃ resultan en una mejor opción frente al tratamiento T₁M₃, y un igual efecto comparados con SICO; los tratamientos T₂M₂ y T₃M₄ conducen a iguales resultados respecto a Serenade. Además, los tratamientos T₃M₄ y T₄M₃ resultan ser igual de efectivos.

6.9. Plano del reactor diseñado

la **Fig. 41** muestra cómo queda el diseño del reactor según el desarrollo propuesto en el **ANEXO 9**.

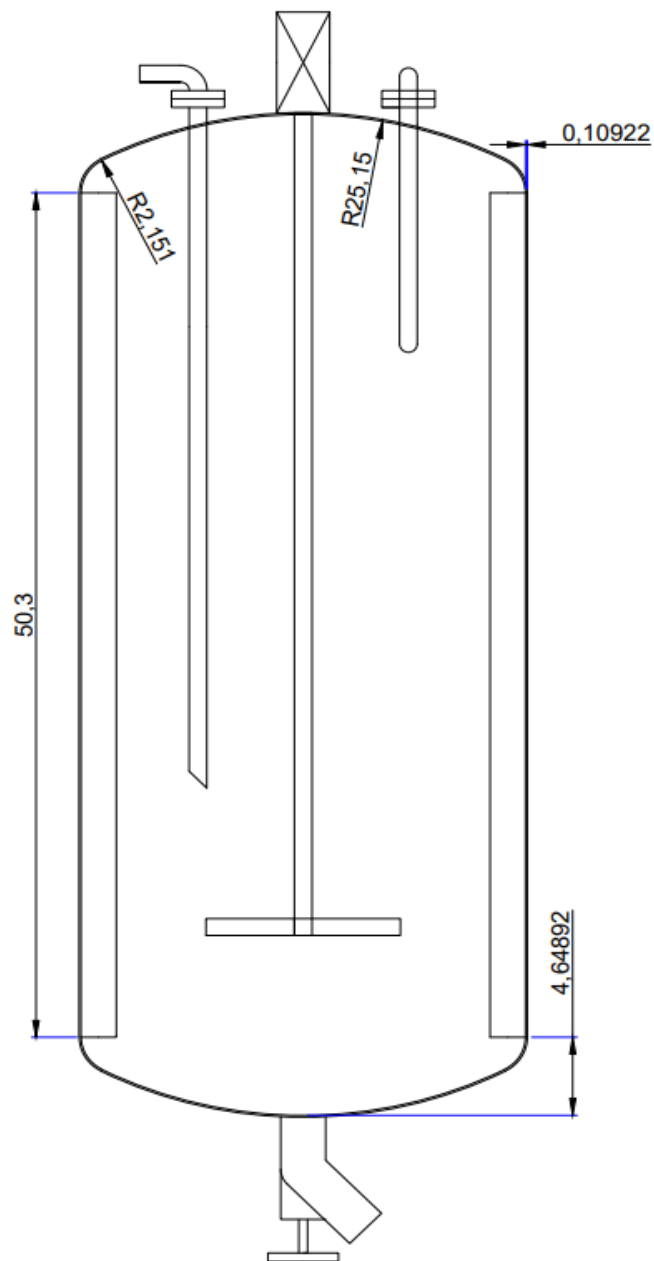


Fig. 41 Plano fermentador.

Nota: fuente autora, usando el software Autocad.

VII. ANÁLISIS

Estudios han demostrado que las condiciones de fermentación son fundamentales para la producción de lipopéptidos [69], [70], tras desarrollar este trabajo, es claro que los medios son uno de los factores más importantes que puede afectar o favorecer la producción de este metabolito. En esta tesis fueron evaluados 4 medios de cultivo numerados del 1 al 4 respectivamente sobre la variable i-ésima: Landy, Luria, Hidrolizado de harina de banano e Hidrolizado de raquis; y 4 temperaturas numeradas del 1 al 4 respectivamente sobre la variable j-ésima: 15 °C, 32 °C, 37 °C y 40 °C, los tratamientos que presentan mayores efectos positivos sobre la producción de lipopéptidos fueron Landy a 37 °C (19,37 µg/L) , Luria a 32 °C (94,04 µg/L), Hidrolizado de harina de banano a 40 °C (123,31 µg/L) e Hidrolizado de raquis a 37 °C (91,37 µg/L). El medio Landy ha sido utilizado por otros autores y generalmente se considera un buen medio para el desarrollo de lipopéptidos [70],[71], sin embargo, en este estudio fue evidente que los tratamientos desarrollados en este medio, presentaron una baja productividad, esto puede estar asociado a la carencia de fuente de nitrógeno la cual favorece la actividad metabólica y síntesis de productos en la bacteria.

Luria Bertani, es un medio que contiene extracto de levadura y peptona, los cuales proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo de los microorganismos de la especie *Bacillus* [72], [54]. En este estudio, los tratamientos desarrollados con este medio favorecieron el crecimiento de BAS y la producción de LPS. De modo que está directamente influenciado por los diferentes factores nutricionales y ambientales. Los medios obtenidos a partir de la hidrólisis de la harina de banano y la hidrólisis del raquis de palma estuvieron sometidos a hidrólisis ácida, estos además de contener azúcares como pentosas y hexosas, también presentan compuestos fenólicos, ácidos alifáticos y aldehídos furánicos que pueden afectar la fermentación si no son previamente purificados [73], En este trabajo no se realizó la purificación total del medio obtenido, aun así se obtuvieron resultados favorables. En otros estudios, la mayor producción de lipopéptidos a partir de *Bacillus subtilis* fue 9,74 g/L en cultivo líquido de Luria Bertani [74] 0,77 g/L usando *B. atropheus* en medio basal [75] 50,01 g de lipopéptidos/ kg seco sólido en medio de

harina de soja y paja de arroz utilizando *B. amyloliquefaciens* [76]. Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los mencionados anteriormente, se evidencia que, si se pretende darles aplicaciones industriales a los extractos, la acumulación de los lipopéptidos requiere mejorar su eficiencia de biosíntesis.

La producción máxima también depende del control de la temperatura, la velocidad de agitación y el pH [55]. La temperatura es uno de los factores más importantes, puesto que puede afectar la cinética del proceso, lo cual afecta la velocidad de fermentación y la producción del metabolito de interés [77]. En otras investigaciones, se ha encontrado que a una temperatura de 37 °C durante la etapa de producción se ha alcanzado producir 55,68 mg/gds [78]. La fengicina, iturina y surfactina, son metabolitos secundarios que se obtienen tras la fermentación de *Bacillus*, aunque en este estudio no se realizó la separación y cuantificación detallada de estas moléculas, se ha encontrado que la temperatura para favorecer la producción de iturina es a 25 °C y de 37 °C para la surfactina [79], así como 15 °C, 25 °C y 30 °C son temperaturas ideales para la producción de fengicina [80],[81]. Es claro que, si se pretende obtener estos metabolitos para aplicaciones donde sea necesario garantizar la pureza del extracto, es necesario estipular el tipo de lipopéptido que se desea producir para seleccionar la temperatura adecuada y garantizar la producción máxima del mismo. Así mismo realizar los procesos downstream necesarios, como lo son la separación y purificación.

La capacidad de infección de *M. fijiensis* está relacionada con la longitud del tubo germinativo de las ascosporas [82], por tanto, la presencia de tubos cortos es un indicativo de la sensibilidad del hongo al ingrediente activo. Los resultados obtenidos, muestran que todos los extractos presentaron actividad antifúngica significativa sobre la elongación del tubo germinativo de conidios de *M. fijiensis*, se encontró malformaciones en el tubo germinal y degradación celular. Todos los tratamientos exceptuando el testigo, presentaron tubos germinativos cortos, entre 1 – 56 µm, y un porcentaje de inhibición de 76,44 % para T₁₃, 92,31 T₂₂, 93,98 T₃₄ y 97,34 para T₄₃. Acorde a esto, la afectividad para el control del patógeno por los tratamientos biológicos propuestos es prometedora, debido a que expone analogías con las respuestas presentadas en la utilización de compuestos químicos como SICO (94,8 % inhibición), y biológicos como Serenade (91,5 % inhibición), productos ampliamente utilizados para el control de *M. fijiensis*.

VIII. CONCLUSIONES

La producción de lipopéptidos a partir del consorcio *Bacillus* es afectada por diversos factores como el medio de cultivo y la temperatura de fermentación. En este estudio, fue muy evidente la mayor influencia del medio de cultivo en la producción del metabolito en relación con la temperatura de fermentación sin restarle importancia a esta última. No obstante, la relación medio - temperatura es relevante y pudo conducir a distintas concentraciones finales de lipopéptidos.

Los fermentados desarrollados produjeron diversos niveles de lipopéptidos. El tratamiento que condujo a la mayor producción de lipopéptidos fue T₄M₃ correspondiente al medio “Hidrolizado de almidón” a una temperatura de fermentación de 40 °C.

Se seleccionaron los tratamientos T₁M₃, T₂M₂, T₃M₄ y T₄M₃ como los mejores de cada grupo, se compararon entre ellos y frente a 2 fungicidas comerciales. A partir de ello se concluyó que el tratamiento T₄M₃ fue más efectivo que Serenade, pero con una respuesta media igual a la de SICO. Por otra parte, los tratamientos T₂M₂, T₃M₄ y T₄M₃ resultaron ser una mejor opción frente al tratamiento T₁M₃ con igual efecto comparados con SICO y los tratamientos T₂M₂ y T₃M₄ conducen a iguales resultados respecto a Serenade. Además, los tratamientos T₃M₄ y T₄M₃ mostraron ser igual de efectivos.

Se obtuvieron extractos lipopeptídicos de alto nivel, pues, uno de los tratamientos (T₃M₄) condujo a los mismos efectos producidos por el fungicida comercial SICO y con mayores efectos sobre el otro fungicida comercial Serenade.

Finalmente, es posible afirmar que los resultados pueden ser tomadas en consideración dado que se cumplen los supuestos sobre los residuales del modelo y se concluye que el mejor tratamiento a llevar a cabo, de acuerdo con este estudio, sobre la producción de lipopéptidos a partir

del consorcio *Bacillus* es aquel desarrollado usando como medio hidrolizado de harina de banano a 40 °C.

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica (Raquis de palma) para generar sustratos que se pueden usar en procesos de fermentación es una buena opción a escala de laboratorio, a escala industrial aún se hayan desafíos debido a los costos de pretratamiento requeridos para poderse usar en las fermentaciones y a la recalcitrancia de esta materia prima. Por otra parte, dado que en la zona de Urabá hay mucha materia prima que no pasa los requerimientos básicos para ser exportada, quedando así el conocido “Banano de rechazo”, se hace factible obtener la harina de banano para su posterior conversión en una fuente de carbono para la formulación de medios de cultivo prometedores.

IX. RECOMENDACIONES

Si se pretende desarrollar cultivos usando el género *Bacillus* para producir lipopéptidos, se recomienda hacer control de las variables que pueden favorecer la productividad del metabolito, como lo son la temperatura, la concentración inicial de inóculo, el pH, el medio de cultivo, el tipo de fermentación (sólida o líquida), la velocidad de agitación, el tiempo de crecimiento del microorganismo y el tiempo de la etapa productiva de lipopéptidos.

Para la cuantificación exacta de los lipopéptidos, se sugiere usar cromatografía, puede ser HPLC o de afinidad, ya que da como resultado la separación de cada estructura (surfactina, iturina, fengicina) en función de la polaridad. Los productos separados se detectan mediante la detección de absorbancia UV y cada pico individual se puede recolectar utilizando un colector de fracciones para un análisis más detallado de su estructura. Así, conocer la fracción de cada tipo de lipopéptido presente en la muestra que este evaluando posibilitará el estudio de la sensibilidad in vitro de *M. fijiensis* a la sustancia pura.

REFERENCIAS

- [1] Cámara de Comercio de Medellín para Antioquia, *Perfiles socioeconómicos de las subregiones de Antioquia*. 2019. [Online]. Available: www.camaramedellin.com.co
- [2] ICA and AUGURA, “El ICA y Augura fortalecen la producción de banano en el Urabá,” 2022. <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-augura-produccion-banano-uraba> (accessed Nov. 08, 2022).
- [3] AUGURA, “Coyuntura bananera,” 2020, Accessed: Jul. 10, 2022. [Online]. Available: <https://augura.com.co/wp-content/uploads/2021/06/Coyuntura-Bananera-2020.pdf>
- [4] AgriSolver, “Gestión integrada de Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) - AgriSolver,” 2022. <https://www.agrisolver.com/blog/gestion-integrada-de-sigatoka-negra-pseudocercospora-fijiensis> (accessed Jul. 10, 2022).
- [5] R. Chica *et al.*, “Impacto y manejo de la Sigatoka negra en el cultivo de banano de exportación en Colombia,” *México Acobat, memorias XVI Reun. Int.*, pp. 53–62, 2004, [Online]. Available: https://www.musalit.org/viewPdf.php?file=IN050659_spa.pdf&id=9609
- [6] D. S. Meredith and J. S. Lawrence, “Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus,” *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 52, no. 3, pp. 459–IN16, 1969, doi: 10.1016/s0007-1536(69)80130-0.
- [7] D. R. Ort *et al.*, “Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 28, pp. 8529–8536, Jul. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1424031112/ASSET/0DC1326B-F4B6-4F72-B78D-1F7723B464B1/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.1424031112FIG03.JPEG.
- [8] M. Guzman, “Control biológico y cultural de la Sigatoka negra,” no. September, 2012, doi: 10.13140/2.1.2927.7442.
- [9] M. M. Rojas Badía, S. Daymara, K. Castro, D. Rosales Perdomo, and M. Lugo, “Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas,” *Rev. Protección Veg.*, vol. 32, no. 2, pp. 2224–4697, 2017.
- [10] A. Schönbichler, S. M. Díaz-Moreno, V. Srivastava, and L. S. McKee, “Exploring the

-
- Potential for Fungal Antagonism and Cell Wall Attack by *Bacillus subtilis* natto,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, no. March, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00521.
- [11] J. J. Arroyave-Toro, S. Mosquera, and V. Villegas Escobar, “Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens,” *Biol. Control*, vol. 114, pp. 195–200, 2017, doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.08.014.
- [12] D. Balleza, A. Alessandrini, and M. J. Beltrán García, “Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides,” *J. Membr. Biol.*, vol. 252, no. 2–3, pp. 131–157, 2019, doi: 10.1007/s00232-019-00067-4.
- [13] FAO, “La economía mundial del banano 1985 - 2002,” 2004. <https://www.fao.org/3/y5102s/y5102s00.htm> (accessed Oct. 01, 2022).
- [14] CENIBANANO, “Coyuntura bananera,” *Angew. Chemie Int. Ed.* 6(11), 951–952., p. 62, 2021.
- [15] G. P. Osorio Salamanca, “Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano,” p. 90, 2006.
- [16] O. M. Mosquera, L. M. Echeverry, and J. Niño Osorio, “Evaluation of the antifungic activity of plant extracts on the fungus *Mycosphaerella fijiensis* MORELET,” *Sci. Tech.*, vol. 15, no. 41, pp. 232–236, 2009.
- [17] P. Moreno Pérez *et al.*, “Antimicrobial evaluation of extracts obtained from tropical micromycetes against phytopathogens,” *Phyton-International J. Exp. Bot.*, vol. 85, no. 130, pp. 7–14, 2016, doi: 10.32604/phyton.2016.85.007.
- [18] G. P. Cañas Gutiérrez, L. F. Patiño, E. Rodríguez Arango, and R. Arango, “Molecular characterization of benomyl resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia,” *J. Phytopathol.*, vol. 154, no. 7–8, pp. 403–409, Aug. 2006, doi: 10.1111/J.1439-0434.2006.01113.X.
- [19] L. Benavides López, “Cuantificación temprana de *Pseudocercospora fijiensis* por medio de qPCR en modelos predictivos de Sigatoka negra en plantas de banano (*Musa AAA*),” pp. 9–162, 2019.
- [20] NCBI, “Taxonomy browser (*Pseudocercospora fijiensis*),” 2022.

-
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=83344>
(accessed Oct. 16, 2022).
- [21] D. H. Marín, R. A. Romero, C. Rica, and T. B. Sutton, “Douglas H. Marín,” vol. 87, no. 3, 2003.
- [22] J. Webste and R. Weber, *Introduction to Fungi*. 2007.
- [23] R. H. Stover, “Sigatoka Leaf Spots of Bananas and,” *Plant Disease*, vol. 64, no. 8. p. 750, 1980. doi: 10.1094/pd-64-750.
- [24] J. Alarcón and Y. Jimenez, “Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp.) Medidas para la temporada invernal,” 2012.
- [25] R. S. Bennett and P. A. Arneson, “Sigatoka Negra,” *Plant Heal. Instr.*, 2005, doi: 10.1094/PHI-I-2005-0217-01.
- [26] O. de las N. U. para la A. y la A. (FAO), “La Sigatoka negra en plátano y banano,” *Cent. Int. Agric. Trop.*, pp. 1–6, 2013.
- [27] R. Trigiano, M. Windham, and A. Windham, *Plant pathology Concepts and laboratory excercises*, vol. 59. 2006.
- [28] IAUSA, “Clasificación de los fungicidas – IAUSA,” 2022. <http://iausa.com.mx/clasificacion-de-los-fungicidas/> (accessed Jun. 15, 2022).
- [29] M. Orozco Santos, J. Orozco Romero, O. Pérez Zamora, G. Manzo Sánchez, J. Farías Larios, and W. D. S. Moraes, “Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos,” *Trop. Plant Pathol.*, vol. 33, no. 3, pp. 189–196, 2008, doi: 10.1590/S1982-56762008000300003.
- [30] P. A. S. Cavero, R. E. Hanada, L. Gasparotto, R. A. Coelho Neto, and J. T. de Souza, “Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*,” *Ciência Rural*, vol. 45, no. 6, pp. 951–957, 2015, doi: 10.1590/0103-8478cr20140436.
- [31] J. A. Gutierrez-Monsalve, S. Mosquera, L. M. González Jaramillo, J. J. Mira, and V. Villegas Escobar, “Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture,” *Biol. Control*, vol. 87, pp. 39–46, 2015, doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.04.012.
- [32] Standards Unit and Public Health England, “UK Standards for Microbiology

-
- Investigations,” *Bacteriol. - Identif.*, vol. 9, no. 3, p. 9, 2018.
- [33] M. Labiadh *et al.*, “Antifungal lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of Citrus trees,” *Rhizosphere*, vol. 19, no. April, 2021, doi: 10.1016/j.rhisph.2021.100399.
- [34] M. Yu *et al.*, “The effect of adding *Bacillus amyloliquefaciens* LSG2-8 in diets on the growth, immune function, antioxidant capacity, and disease resistance of *Rhynchocypris lagowskii*,” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 125, pp. 258–265, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.FSI.2022.05.008.
- [35] A. M. El Hefny, O. A. A. Khalil, Y. E. Hassan, and A. M. Mounir, “Biocontrol effect of *Bacillus amyloliquefaciens* combined with un-irradiated and irradiated beet root as a preservative coating for pomegranate arils,” *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 33–45, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.JRRAS.2022.04.002.
- [36] Priest *et al.*, “Taxonomy of the subspecies *Bacillus amyloliquefaciens*” 1987. <https://www.namesforlife.com/10.1601/tx.22413> (accessed Oct. 31, 2022).
- [37] M. Bouchard Rochette *et al.*, “*Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*” *Biol. Control*, vol. 170, p. 104925, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2022.104925.
- [38] C. Ehrenberg, “*Bacillus subtilis* Taxonomía,” 1835. <https://www.naturalista.mx/taxa/245605-Bacillus-subtilis> (accessed Oct. 31, 2022).
- [39] J. A. V. Costa, H. Treichel, L. O. Santos, and V. G. Martins, “Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications,” *Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng.*, pp. 357–372, 2018, doi: 10.1016/b978-0-444-63990-5.00016-5.
- [40] S. Vijayakumar and V. Saravanan, “Biosurfactants types, sources and applications,” *Res. J. Microbiol.*, vol. 10, no. 5, pp. 181–192, 2015, doi: 10.3923/jm.2015.181.192.
- [41] M. G. Healy, C. M. Devine, and R. Murphy, “Microbial production of biosurfactants,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 18, no. 1–4, pp. 41–57, 1996, doi: 10.1016/S0921-3449(96)01167-6.
- [42] J. J. Hug and R. Müller, *Host Development for Heterologous Expression and Biosynthetic Studies of Myxobacterial Natural Products*, 3rd ed. Elsevier Inc., 2020. doi: 10.1016/b978-

-
- 0-12-409547-2.14818-8.
- [43] M. Khem Raj and K. Shamsheer S, “Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents.pdf,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–9, 2015.
- [44] A. Théatre *et al.*, “The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus spp.*: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 623701, Mar. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2021.623701.
- [45] F. Baruzzi, L. Quintieri, M. Morea, and L. Caputo, “Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp.* and applications in food,” *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. Méndez Vilas*, no. 031918, pp. 1102–1111, 2011, [Online]. Available: <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1102-1111.pdf>
- [46] Y. Ariza and L. Sánchez, MSc., “Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.*,” *Nova*, vol. 10, no. 18, p. 149, 2012, doi: 10.22490/24629448.1003.
- [47] N. Roongsawang *et al.*, “Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: Bacillomycin L, plipastatin, and surfactin,” *Extremophiles*, vol. 6, no. 6, pp. 499–506, 2002, doi: 10.1007/s00792-002-0287-2.
- [48] V. Leclère, R. Marti, M. Béchet, P. Fickers, and P. Jacques, “The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface active properties,” *Arch. Microbiol.*, vol. 186, no. 6, pp. 475–483, 2006, doi: 10.1007/s00203-006-0163-z.
- [49] M. Pazmiño, “Evaluación in vitro de la capacidad de extractos orgánicos de biodiversidad ecuatoriana para inhibir al patógeno *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) causante de la Sigatoka Negra en banano,” vol. 59, 2014.
- [50] Fedepalma, “Informe de Gestión Fedepalma,” 2020.
- [51] K. Ramírez Amador, Ó. Rojas Carrillo, P. Alvarado Aguilar, and J. Vega Baudrit, “Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananascomusus*),” *Uniciencia*, vol. 26, no. 1, pp. 75–89, 2012.
- [52] V. Sierra, “Caracterización del cultivo de palma de aceite,” pp. 1–3, 2019.

-
- [53] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.
- [54] P. Gerhardt, *Methods for general and molecular bacteriology*. 1994. Accessed: Jun. 23, 2022. [Online]. Available: <https://www.worldcat.org/title/methods-for-general-and-molecular-bacteriology/oclc/29031551>
- [55] D. Sun *et al.*, "Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC–MS analysis," *AMB Express*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13568-019-0845-y.
- [56] Y. Luo, G. Zhang, Z. Zhu, X. Wang, W. Ran, and Q. Shen, "Optimization of medium composition for lipopeptide production from *Bacillus subtilis* N7 using response surface methodology," *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, no. 1, pp. 52–59, 2013, doi: 10.4014/kjmb.1207.07020.
- [57] Y. Wang, Z. Lu, X. Bie, and F. Lv, "Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 231, no. 2, pp. 189–196, 2010, doi: 10.1007/s00217-010-1271-1.
- [58] F. E. Mouafi, M. M. Abo Elsoud, and M. E. Moharam, "Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology," *Biotechnol. Reports*, vol. 9, pp. 31–37, 2016, doi: 10.1016/j.btre.2015.12.003.
- [59] A. Sharma, J. Soni, G. Kaur, and J. Kaur, "A Study on biosurfactant production in *Lactobacillus* and *Bacillus sp.*," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 11, pp. 723–733, 2014.
- [60] M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Crop J.*, vol. 5, no. 5, pp. 407–415, 2017, doi: 10.1016/j.cj.2017.04.003.
- [61] T. Smyth, A. Perfumo, S. MsClean, R. Marchant, and I. Banat, "Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology," *Handb. Hydrocarb. Lipid Microbiol.*, 2010, doi: 10.1007/978-3-540-77587-4.
- [62] Syngenta, "Ficha técnica y hoja de seguridad del fungicida SICO 250 EC," 2023. <https://www.syngenta.com.co/product/crop-protection/fungicida/sico-250-ec> (accessed Jan.

-
- 09, 2023).
- [63] Bayer, “SERENADE SC1,34® | Protección de Cultivos | Agro Bayer Colombia,” 2023. https://www.agro.bayer.co/es-co/productos/product-details.html/microbial-agent/serenade_sc134.html (accessed Jan. 09, 2023).
- [64] A. A. Prihanto, R. Nurdiani, H. Muyasharoh, and J. Afifah, “Identification of protease-producing halophilic bacteria isolated from salt-pond soil,” *J. Ilm. Perikan. dan Kelaut.*, vol. 12, no. 1, pp. 181–187, 2020, doi: 10.20473/jipk.v12i1.14725.
- [65] A. Algburi, S. A. Alazzawi, A. I. A. Al-Ezzy, R. Weeks, V. Chistyakov, and M. L. Chikindas, “Potential Probiotics *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 Co-Aggregate with Clinical Isolates of *Proteus mirabilis* and Prevent Biofilm Formation,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 12, no. 4, pp. 1471–1483, 2020, doi: 10.1007/s12602-020-09631-0.
- [66] E. Fikri *et al.*, “The Phenomenon of Medical Waste Recycling in Indonesia: Contact Time and Chlorine Dose as a Disinfectant with the Bio-Indicator *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*” *J. Ecol. Eng.*, vol. 22, no. 4, pp. 47–58, 2021, doi: 10.12911/22998993/133965.
- [67] M. Arzanlou *et al.*, “Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana,” *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi*, vol. 20, no. June 2008, pp. 19–37, 2008, doi: 10.3767/003158508X302212.
- [68] L. Pérez Vicente, “Morfología De Las Especies De *Mycosphaerella* Asociadas a Manchas De Las Hojas En *Musa Spp.*,” *Fitosanidad*, vol. 6, no. 2, pp. 3–9, 2002.
- [69] N. S. Shaligram and R. S. Singhal, “Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 48, no. 2, pp. 119–134, Jun. 2010.
- [70] I. Mnif, S. Chaabouni-Ellouze, and D. Ghribi, “ Optimization of the Nutritional Parameters for Enhanced Production of *B. subtilis* SPB1 Biosurfactant in Submerged Culture Using Response Surface Methodology ,” *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2012, pp. 1–8, 2012, doi: 10.1155/2012/795430.

-
- [71] S. Fahim, K. Dimitrov, F. Gancel, P. Vauchel, P. Jacques, and I. Nikov, "Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21," *Bioresour. Technol.*, vol. 126, pp. 1–6, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.019.
- [72] I. Mandic Mulec, P. Stefanic, and J. D. van Elsas, "Ecology of Bacillaceae," *Microbiol. Spectr.*, vol. 3, no. 2, 2015, doi: 10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013.
- [73] F. R. Frazer and T. A. McCaskey, "Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol," *Biomass*, vol. 18, no. 1, pp. 31–42, 1989, doi: 10.1016/0144-4565(89)90079-6.
- [74] S. Jiao, X. Li, H. Yu, H. Yang, X. Li, and Z. Shen, "In situ enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 4, pp. 832–842, 2017, doi: 10.1002/bit.26197.
- [75] J. Zhang, Q. Xue, H. Gao, H. Lai, and P. Wang, "Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atropheus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0574-8.
- [76] Z. Zhu, G. Zhang, Y. Luo, W. Ran, and Q. Shen, "Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate," *Bioresour. Technol.*, vol. 112, pp. 254–260, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.057.
- [77] G. Beltran, M. Novo, J. M. Guillamón, A. Mas, and N. Rozès, "Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 121, no. 2, pp. 169–177, 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030.
- [78] Z. Zhu, R. Li, G. Yu, W. Ran, and Q. Shen, "Enhancement of lipopeptides production in a two-temperature-stage process under SSF conditions and its bioprocess in the fermenter," *Bioresour. Technol.*, vol. 127, pp. 209–215, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.119.
- [79] A. Ohno, T. Ano, and M. Shoda, "Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 80, no. 5, pp. 517–519, 1995, doi: 10.1016/0922-338X(96)80930-5.

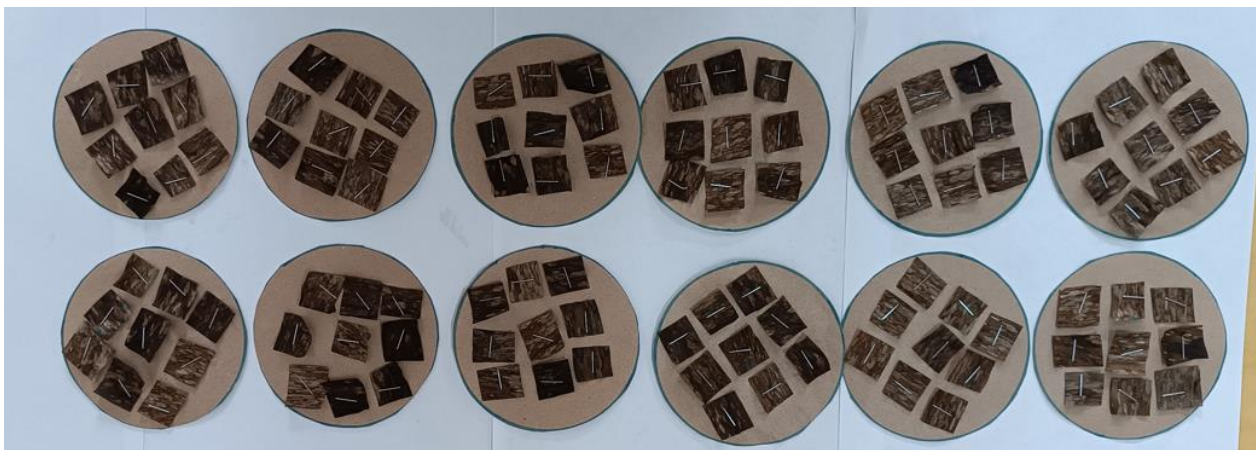
-
- [80] N. Hmidet, H. Ben Ayed, P. Jacques, and M. Nasri, “Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/5893123.
- [81] P. M. Fernando, H. V. de M. Flavio, O. Marc, F. Laurent, E. de S. Paulo, and T. de S. Jorge, “Effect of temperature, pH and substrate composition on production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* 629,” *African J. Microbiol. Res.*, vol. 10, no. 36, pp. 1506–1512, 2016, doi: 10.5897/ajmr2016.8222.
- [82] L. Sepúlveda-R., “Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia,” *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.*, pp. 1–21, 2015, doi: 10.18781/r.mex.fit.1507.8.
- [83] P. Doran, *Bioprocess engineering principles*, vol. 9, no. 1. 1996. doi: 10.1016/s0892-6875(96)90075-8.
- [84] ASME, “Rules for Construction of Pressure Vessels,” *Code Boil. Press. Vessel - VIII Rules Constr. Press. Vessel.*, p. 822, 2013.
- [85] R. C. Hibbeler, “Mecánica de materiales,” *Pearson*, p. 900.
- [86] F. Beer, E. Johnston, J. DeWolf, and D. Mazurek, “Mecánica de materiales,” *Mc Graw Hill*, vol. 238, pp. 319–370, 2010, doi: 10.1007/978-94-024-1771-5_7.
- [87] W. Partlow, “Vessel Design And Aspect Ratio - Reactor Design - Beyond Discovery,” 2023. <https://www.beyonddiscovery.org/reactor-design/vessel-design-and-aspect-ratio.html> (accessed Jan. 13, 2023).
- [88] G. L. Foutch and A. H. Johannes, “Reactors in Process Engineering,” *Encycl. Phys. Sci. Technol.*, pp. 23–43, Jan. 2003, doi: 10.1016/B0-12-227410-5/00654-2.
- [89] W. McCabe, J. Smith, and P. Harriott, *Operaciones unitarias en ingeniería química*, vol. 53, no. 9. 2007. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- [90] Fondeyur, “Fondo Klopper DIN 28011 - Fondeyur.”
- [91] Wesco, “Venta de Acero Inoxidable en Bogotá, Colombia,” 2023. <https://www.wesco.com.co/> (accessed Jan. 19, 2023).
- [92] Universidad autónoma de Barcelona, “Manual de cálculos Planta de producción de ácido fórmico”.

ANEXOS

Anexo 1. Recortes de hoja de banano enferma con Sigatoka negra.



Anexo 2. Discos con recortes se Sigatoka negra.



Anexo 3. Pruebas numéricas – Producción de lipopéptidos

```
> shapiro.test(residuales)

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuales
W = 0.94528, p-value = 0.1058
```

Fig. A Prueba de normalidad Shapiro - Wilk

```
> ad.test(residuales)

Anderson-Darling normality test

data:  residuales
A = 0.52161, p-value = 0.1709
```

Fig. B Prueba de normalidad Anderson - Darling

```
> cvm.test(residuales)

Cramer-von Mises normality test

data:  residuales
W = 0.061118, p-value = 0.3553
```

Fig. C Prueba de normalidad Cramer – von Mises

Anexo 4. Test 1

```
> ncvTest(modelo1)
Non-constant Variance Score Test
Variance formula: ~ fitted.values
Chisquare = 0.1898854, Df = 1, p = 0.66301
```

Fig. D Test ncv.

Anexo 5. Test 2

```
> dwtest(modelo1,alternative = "two.sided")

Durbin-Watson test

data:  modelo1
DW = 3.0406, p-value = 0.6675
alternative hypothesis: true autocorrelation is not 0
```

Fig. E Test de Durbin – Watson.

Anexo 6. Pruebas numéricas - Sensibilidad

```
> shapiro.test(residuales)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  residuales
W = 0.98658, p-value = 0.997
```

Fig. F Prueba de normalidad Shapiro – Wilk (prueba de sensibilidad).

```
> ad.test(residuales)

      Anderson-Darling normality test

data:  residuales
A = 0.12412, p-value = 0.9812
```

Fig. G Prueba de normalidad Anderson – Darling (prueba de sensibilidad).

```
> cvm.test(residuales)

      Cramer-von Mises normality test

data:  residuales
W = 0.018429, p-value = 0.9758
```

Fig. H Prueba de normalidad Cramer – von Mises (prueba de sensibilidad).

Anexo 7. Test 3

```
> ncvTest(modelo)
Non-constant Variance Score Test
Variance formula: ~ fitted.values
Chisquare = 0.8417815, Df = 1, p = 0.35889
```

Fig. I Breusch pagan test.

Anexo 8. Test 4

```
> dwtest(modelo,alternative = "two.sided")

      Durbin-Watson test

data:  modelo
DW = 2.8923, p-value = 0.8971
alternative hypothesis: true autocorrelation is not 0
```

Fig. J Test de Durbin – Watson (prueba de sensibilidad).

Anexo 9. Diseño mecánico de un reactor para la producción de lipopéptidos a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*

DISEÑO MECÁNICO DEL RECIPIENTE

1. Material

El material empleado para el diseño será acero inoxidable 304, debido a la resistencia a la corrosión (< 2 mpy) que presentó para todas las sustancias involucradas en el fermentador donde se llevará a cabo la producción de los lipopéptidos.

2. Condiciones de operación y diseño

a. Volumen (sin tapas)

Se recomienda permitir que exista un espacio en la parte superior del reactor agitado por si hay formación de espumas o se debe retirar las gotas que arrastra el gas de salida. Esto se logra llenando el 70 – 80 % del tanque con líquido [83]. Para este diseño, el volumen del líquido corresponderá al 80 % del volumen total del reactor, por tanto:

$$V_{trabajo} = 20 L$$

$$V_{total} = \frac{V_{trabajo}}{0,80} = \frac{20 L}{0,80} = 25 L \rightarrow 0,0250 m^3 \quad \text{Ecuación (3)}$$

b. Temperatura

La temperatura máxima de diseño no debe ser menor que la temperatura media del metal a través del grosor de la placa en las condiciones de operación [84], así que se establece una temperatura de diseño de 160 °C.

c. Presión

La presión de diseño deberá ser la presión en las condiciones más severas del sistema [84]. El equipo debe ser esterilizado, por ende, se tomará la presión del vapor de agua saturada a 125 °C la cual el recipiente debe soportar cuando es esterilizado (115 kpa ; 16,679 Psi).

d. Factor de seguridad

Este factor estará definido por la relación del esfuerzo último y el esfuerzo permisible para el acero inoxidable 304 [85].

$$F.S = \frac{\text{Esfuerzo último}}{\text{Esfuerzo permisible}} = \frac{\sigma_{\text{máximo}}}{\sigma_{\text{permisible}}} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Considerando cualquier variación que pueda ocurrir en las propiedades del material, cargas, fallas o deterioro que acontezca [86], se establece que el factor de seguridad para llevar a cabo el diseño del equipo será: 2

3. Dimensionamiento básico

a. Tipo de recipiente

Se proporcionan reglas para el diseño de recipientes que son esféricos y cilíndricos [84], por ende, el reactor es un fermentador agitado para el medio de cultivo y el microorganismo (parte del proceso donde se producen los lipopéptidos) y tendrá forma cilíndrica, con base redondeada para eliminar las cavidades y esquinas en las que las corrientes de fluido no pueden penetrar.

b. Diámetro del recipiente

La relación típica entre la longitud diámetro en recipientes con agitación se encuentra entre 1,2 y 3,0, los reactores con una relación $L/D > 1,5$, suelen requerir múltiples impulsores para obtener una mezcla adecuada [87],[88]. En este caso se usará la correlación $\frac{L}{D_T} = 2$

Se obtiene:

$$L = 2 * D_T \text{ Ecuación (5)}$$

$$V_T = \frac{\pi}{2} D_T^3 \text{ Ecuación (6)}$$

A partir de la **ecuación 6** despejamos el D_T

$$D_T = \sqrt[3]{\frac{2 * V_T}{\pi}} \text{ Ecuación (7)}$$

$$D_T = \sqrt[3]{\frac{2 * 0,025m^3}{\pi}} = 0,2515 \text{ m}$$

c. Longitud del recipiente (sin tapas)

Teniendo en cuenta la correlación empleada en el apartado **3.2** obtenemos que la longitud del reactor sin incluir las tapas será:

$$L_T = 2 * D_T = 2 * 0,2515 \text{ m} = 0,5030 \text{ m} \rightarrow 19,8031 \text{ in}$$

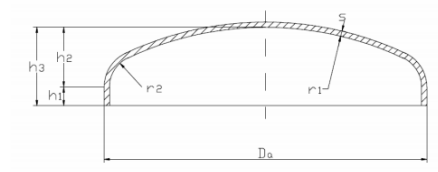
d. Posición

El reactor se dispondrá en posición vertical, esto permite tener una unidad más compacta. Por otra parte, favorece en la agitación y privilegia la difusión de oxígeno [89].

e. Tipo de tapas

Debido a la presión que el equipo deberá soportar en la peor de las condiciones (115 kPa). Las tapas se diseñarán teniendo en cuenta las especificaciones de “ Torispherical head DIN 28011” propuestas por [84], Para la cabeza y para el fondo del recipiente.

Torispherical head DIN 28011



$$\begin{aligned} r_1 &= D_a & h_1 &= 3,5 \times s \\ r_2 &= 0,1 \times D_a & h_2 &= 0,1935 \times D_a - 0,455 \times s \\ & & h_3 &= h_1 + h_2 \end{aligned}$$

Fig. K Relaciones para el tipo de tapa Cabeza torisférica DIN 2801.

3.5.1. Dimensiones

El diámetro de la tapa corresponderá con el diámetro del tanque que se calculó con la **ecuación 7**, entonces: $D_a = D_t = 0,251 \text{ m}$. Luego, teniendo en cuenta las relaciones que se presentan en la **Fig 34**, se obtiene que:

$$\begin{aligned} r_1 &= D_a = 0,2515 \text{ m} & h_1 &= 3,5 * s ; \quad s = t_{tapa} = 0,0046 \text{ in} \\ r_2 &= 0,1 * 0,2515 \text{ m} = 0,0251 \text{ m} & h_1 &= 3,5 * 0,0046 \text{ in} = 0,0161 \text{ in} \\ & & h_2 &= 0,1935 * D_a - 0,455 * s = 0,0466 \text{ in} \\ & & h_3 &= h_1 + h_2 = 0,0627 \text{ in} \\ & & h_{tapa} &= h_3 + s = 0,0673 \text{ in} \end{aligned}$$

Ver información técnica en el **ANEXO 11**.

3.5.2. Volumen de las tapas

El volumen de la tapa puede ser calculado de acuerdo con la **ecuación 8** que plantea el proveedor [90].

$$V_{Tapas} = 0,1 * (D_t)^3 \quad \text{Ecuación (8)}$$

$$V_{Tapas} = 0,1 * (0,2515 m)^3 = 0,0251 m^3$$

3.5.2. Longitud del recipiente (con tapas)

La longitud total del reactor corresponderá con la longitud que aportan las tapas y la que proporciona el recipiente:

$$L_T = L + 2h_{tapa} \text{ Ecuación (9)}$$

$$L_T = 19,8031 in + 2(0,0673 in) = 19,9377 in$$

f. Tolerancias por corrosión y abrasión

Los recipientes principales de un proceso deben diseñarse para alcanzar producciones durante un tiempo estimado de 15 a 20 años [87], por lo anterior y por aspectos económicos donde se requiere garantizar el alcance máximo de las utilidades del proceso, se considera que el tiempo de operación del equipo apropiado debe ser de 20 años, esta apreciación se hace teniendo en cuenta que el fermentador se figura como uno de los equipos principales en la producción de lipopéptidos y que opera las 24 horas del día, dentro de las cuales está incluido el mantenimiento y la limpieza del equipo.

$$2mpy = \frac{0,002 in}{año}$$

$$t_c = 20 años * \frac{0,002 in}{año} = 0,04 in$$

g. Costuras

El código ASME 2013, sección VIII, división 1, (UW-3), especifica las categorías de juntas necesarias para llevar a cabo soldaduras en recipientes. Las categorías requeridas para formar la

coraza cilíndrica del equipo de fermentación se presentan como A y B, descritas como longitudinales y circunferenciales respectivamente.

En UW-11 se detallan las consideraciones necesarias para seleccionar el tipo de examen radiográfico en las soldaduras. Conforme a sus numerales, se puede afirmar que para el diseño del fermentador no es necesario realizar examen radiográfico, declarando que el recipiente no estará funcionando para sustancias peligrosas, la presión de operación es menor a 50 psi y el espesor del tanque es de 1,0922 mm. Además, en busca de una disminución de costos en fabricación, considerando que el equipo no tiene grandes requerimientos de seguridad es posible evitar el radiografiado. Declaradas las categorías de juntas soldadas y el grado de inspección como nulo, la tabla (UW-12) ofrece las eficiencias para las juntas [84]. El tipo de juntas para el diseño del equipo es a tope hechas por doble cordón de soldadura, indicaciones específicas en **TABLA XI**.

TABLA XII.
INDICACIONES PARA EFICIENCIA DE JUNTAS

Característica	Descripción
Tipo	1
Limitaciones	Ninguna
Categorías	A, B, C y D
Eficiencia (E)	0,7

Fuente: [84].

4. **Espesores de diseño y nominal de la camisa y de las tapas que soportan la presión interna.**

4.1 Espesor de diseño de la camisa

El espesor de la camisa requerido para soportar la presión de diseño se calculará empleando la ecuación 11 obtenida de la norma ASME. A partir de la norma ASME se obtiene que **S**: 39,3 ksi → 39.300 psi para el acero inoxidable 304.

$$t_{camisa} = \frac{PR}{SE - 0,6P} \quad \text{Ecuación (10)}$$

$$t_{camisa} = \frac{(16,679 \text{ psi}) \left(\frac{9,9016 \text{ in}}{2} \right)}{(39.300 \text{ psi})(0,7) - 0,6(16,679 \text{ psi})}$$

$$t_{camisa} = 0,0030 \text{ in}$$

El espesor total de diseño t_T es la suma del espesor requerido para soportar la presión y el de la tolerancia por corrosión:

$$t_T = t_{tapa} + t_c$$

$$t_T = 0,0030 \text{ in} + 0,04 \text{ in} = 0,0430 \text{ in}$$

4.2 Espesor nominal de la camisa

El espesor nominal corresponde con el grosor de una lámina comercial que se aproxime al grosor de diseño calculado en el apartado 3.8.1, el proveedor [91] ofrece láminas con espesor de 0,0478 in , entonces:

$$t_N = \frac{1}{18} \text{ in} = 0,0478 \text{ in}$$

4.3 Espesor de diseño de las tapas

El espesor de las tapas que se requiere para soportar la presión de diseño que se estipuló, será calculado con la **ecuación 11** obtenida de [84].

$$t_{tapa} = \frac{PLM}{2SE_j - 0.2P} \quad \text{Ecuación (11)}$$

A partir de la norma ASME se obtiene que $S: 39,3 \text{ ksi} \rightarrow 39.300 \text{ psi}$ para el acero inoxidable 304, por lo tanto, $\frac{L}{r} = \frac{33,858 \text{ in}}{3,3858 \text{ in}} = 10$, entonces en la (ver **ANEXO 10**) el valor de $M = 1,54$ y $E = 0,7$.

$$t_{\text{tapa}} = \frac{(16,679 \text{ psi})(9,882 \text{ in})(1,54)}{2(39.300 \text{ psi})(0,7) - 0.2(16,679 \text{ psi})} = 0,0046 \text{ in}$$

El espesor total de diseño t_T es la suma del espesor requerido para soportar la presión y el de la tolerancia por corrosión, esto se debe a que ese espesor compensa la corrosión que el equipo sufre con las sustancias a medida que pasa el tiempo [92].

$$t_T = t_{\text{tapa}} + t_c$$

$$t_T = 0,0046 \text{ in} + 0,04 \text{ in} = 0,0446 \text{ in}$$

4.4 Espesor nominal de las tapas

El espesor nominal corresponde con el grosor de una lámina comercial que se aproxime al grosor de diseño, calculado en el apartado 3.8.3, el proveedor [91] ofrece láminas con espesor de 0,0478 in, entonces:

$$t_N = \frac{1}{14} \text{ in} = 0,0714 \text{ in}$$

Nota: El espesor calculado en el apartado 2.5.3 también corresponderá al espesor de diseño del recipiente cilíndrico de longitud $L = 19,8031 \text{ in}$.

Anexo 10. Valores del factor M.

1-4

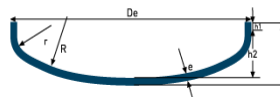
2013 SECTION VIII - DIVISION 1

<i>L/r</i>	1.0	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75	3.00	3.25	3.50
<i>M</i>	1.00	1.03	1.06	1.08	1.10	1.13	1.15	1.17	1.18	1.20	1.22
<i>L/r</i>	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
<i>M</i>	1.25	1.28	1.31	1.34	1.36	1.39	1.41	1.44	1.46	1.48	1.50
<i>L/r</i>	9.5	10.00	10.5	11.0	11.5	12.0	13.0	14.0	15.0	16.0	16 ² / ₃ [Note (1)]
<i>M</i>	1.52	1.54	1.56	1.58	1.60	1.62	1.65	1.69	1.72	1.75	1.77

GENERAL NOTE: Use nearest value of *L/r*; interpolation unnecessary.

NOTE:
(1) Maximum ratio allowed by UG 32(j) when *L* equals the outside diameter of the skirt of the head.

Anexo 11. Información técnica tapas toriesféricas.



Referencia: F1
Norma: DIN

Información técnica

$R = De$
 $r = R/10$
 $h1 \geq 3,5e$
 $h2 = 0,1935De - 0,455e$
 $H = h2 + h1 + e$
 $Dd = 1,11De + 1,85h1$
 $V(h2) = 0,1(Di)^3$

Ejemplo práctico

$De = 2000$
 $e = 10$
 $R = 2000$
 $r = 200$
 $h1 = 50$
 $H = 442$
 $V(h2) = 776$

De: Diámetro exterior
 e: Espesor inicial
 R: Radio esférico interior
 r: Radio rebordeo interior
 h1: Pestaña (Parte recta)
 H: Altura total exterior
 V: Volumen
 Dd: Diámetro disco partida
 Di: Diámetro interior
 h2: Flecha
 Hc: Altura central