UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1 8 0 3

Producción de agroinsumos microbianos en INBACTER S.A.S.

Jeila María Cantillo Ujueta

Informe de práctica profesional presentado para optar por el título de Biólogo

Asesores:
Camilo Andrés Ramírez Cuartas, Doctor (PhD) en Biología
Natalia Giraldo Gallego, Microbióloga y Bioanalista

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Biología

Medellín
2025

Cita: (Cantillo Ujueta, 2025)

Referencia, Estilo APA 7 (2020):

Cantillo Ujueta, J. M. (2025) Producción de Agroinsumos Microbianos en la Empresa INBACTER S.A.S. [Informe de práctica]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

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

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

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.

Tabla de contenido

Resumen……. 6

Abstract……....7

1. Introducción……8
2. Objetivos……12
3. Metodología……...13
4. Resultados y Discusión……..21
5. Conclusiones……..33

Referencias……34

Lista de figuras

Figura 1. Porcentaje de producción de inóculos fúngicos por cada integrante del área.

Figura 2. Porcentaje de producción de inóculos bacterianos por cada integrante del área.

Figura 3. Porcentaje de producción de bacteriófagos por cada integrante del área.

Figura 4. Placas de los bacteriófagos líticos M5 y M8 sembrados por el método de doble capa.

Figura 5. Prueba de compatibilidad de Citroemulsión con *B. bassiana*.

Figura 6. *Colletotrichum* sp. Aislado de inflorescencias de aguacate.

Figura 7. Prueba de rango de hospedero realizada mediante el método del *spot*.

Figura 8. Recuentos de UFC de morfologías compatibles con *R. solanacearum* en medio SMSA.

Figura 9. Morfología característica de *R. solanacearum* en TSA al 10%.

Siglas, acrónimos y abreviaturas

PDA Agar de Papa Dextrosa

TSA Agar de Soya y Tripticasa

ICA Instituto Colombiano Agropecuario

FAO Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

SMSA Selective Medium South Africa

Resumen

Los agroinsumos químicos han favorecido al crecimiento de la agricultura, permitiendo una mayor producción de alimentos al disminuir las pérdidas por enfermedades o plagas y aumentar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas. Sin embargo, estudios han relacionado algunos de estos insumos con problemas en la salud humana, de otros animales y el medio ambiente. Por esta razón el desarrollo y producción de insumos agrícolas de origen natural es de suma importancia. INBACTER S.A.S es una empresa privada de base biotecnológica que tiene como objetivo el desarrollo, producción y uso de bioinsumos para el área agrícola. Estos productos, de origen bacteriano, fúngico y viral se desarrollan a partir de conocimientos avanzados en microbiología, ofreciendo al agricultor insumos seguros y de alta calidad en concentración, pureza y eficacia. Estas características hacen a la compañía un excelente escenario de prácticas para estudiantes de biología que quieran dirigir su vida profesional al estudio de los microorganismos en relación con la agricultura. La práctica llevada a cabo en la empresa fue muy significativa, ya que no solo le permitió a la estudiante explorar y desarrollar aprendizajes técnicos y teóricos sobre tres ramas importantes de la microbiología sino también habilidades necesarias para la articulación de las actividades microbiológicas con otros frentes de trabajo, especialmente en contextos multidisciplinarios característicos del entorno empresarial. Estas experiencias fueron fundamentales para entender cómo los principios biológicos se traducen en productos viables técnica y comercialmente.

Palabras clave: agroinsumos, bioinsumos, biocontrol, bioestimulación, bacterias, hongos, bacteriófagos, fitopatógenos, plagas.

Abstract

Chemical agricultural inputs have contributed to the growth of agriculture by enabling higher food production through the reduction of losses caused by diseases or pests and by increasing the availability of nutrients for plants. However, some studies have linked these inputs to health problems in humans, other animals, and the environment. For this reason, the development and production of natural-origin agricultural inputs is of great importance. INBACTER S.A.S is a private biotechnology-based company whose mission is the development, production, and application of bioinputs for agriculture. These products, of bacterial, fungal, and viral origin, are developed based on advanced knowledge in microbiology, offering farmers safe, high-quality inputs in terms of concentration, purity, and effectiveness. These characteristics make the company an excellent training ground for biology students seeking to orient their professional careers toward the study of microorganisms in relation to agriculture. The internship carried out at the company was highly significant, as it not only allowed the student to explore and develop technical and theoretical knowledge in three important branches of microbiology but also the skills necessary to integrate microbiological activities with other work areas, especially in multidisciplinary contexts characteristic of the business environment. These experiences were fundamental to understanding how biological principles are translated into technically and commercially viable products.

Keywords: agricultural inputs, bioinputs, biocontrol, biostimulation, bacteria, fungi, bacteriophages, phytopathogens, pests

1. Introducción

INBACTER S.A.S es una empresa privada de base biotecnológica que tiene como objetivo el desarrollo, producción y uso de bioinsumos para el área agropecuaria y medio ambiental. Estos productos, de origen bacteriano, fúngico y viral se desarrollan a partir de conocimientos avanzados en microbiología, ofreciendo al agricultor insumos seguros y de alta calidad en concentración, pureza y eficacia (INBACTER, s.f.).

Los agroinsumos químicos han favorecido al crecimiento de la agricultura, permitiendo una mayor producción de alimentos al disminuir las pérdidas por enfermedades o plagas y aumentar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas. Entre los años 1960 y 1980, el uso de insumos cómo pesticidas y fertilizantes, fue el factor que más contribuyó al acelerado incremento de la producción mundial de alimentos (OCDE, 2021). Sin embargo, estudios han relacionado algunos de estos insumos con problemas en la salud humana y de otros animales, ya que podrían actuar como disruptores endocrinos, promotores del estrés oxidativo y la neuroinflamación (Franco et al., 2024), y generar enfermedades como el cáncer infantil (Skidmore et al., 2023). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), desde el año de la Sanidad vegetal (2020), invita a invertir esfuerzos en la búsqueda de técnicas de manejo de enfermedades y plagas, que a largo plazo sean menos perjudiciales para el medio ambiente. Por esta razón el desarrollo y producción de agroinsumos de origen biológico, que permitan la nutrición y el cuidado de los cultivos sin afectar negativamente los recursos naturales y la salud de las personas, es de gran importancia para el futuro de la agricultura.

Diversos microorganismos han mostrado tener efectos directos o indirectos en la salud de las plantas por características distintas como la producción de sustancias que promueven el crecimiento vegetal entre estos los sideróforos y el ácido indol acético; y la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenas (Botlagunta & Babu, 2024). Estos microorganismos tienen un alto potencial para el desarrollo de insumos agrícolas, por esta razón, la investigación para la prospección de los microorganismos o los productos provenientes de los mismos, es importante para la reducción del impacto ambiental que genera la agricultura en el planeta.

Los insumos fúngicos comerciales generalmente son ofrecidos en formulaciones secas, que en comparación a la formulación en fresco proveen concentraciones más bajas del hongo de interés y tienen mayor costo de procesamiento, esto hace que sean una opción poco rentable para los agricultores. Debido a esto INBACTER creó la línea de producción "Hongos benéficos en finca", que le permite al agricultor producir hongos benéficos en su propia finca, con una concentración 10 veces mayor que los productos comerciales y reduciendo costos en hasta un 50% (INBACTER, s.f.). La empresa provee al agricultor los inóculos de hongos y la capacitación, de acuerdo a las necesidades de su cultivo, además del acompañamiento en todo el proceso, para que puedan realizar la producción sin requerir personal especializado. Actualmente, la empresa produce hongos para el biocontrol de insectos y ácaros plaga cómo *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea*. Hongos para el biocontrol de nemátodos fitoparásitos, moluscos y sinfílidos, como *Purpureocillium lilacinum syn. Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*. Hongos para el biocontrol de enfermedades y promoción de crecimiento radicular como *Trichoderma asperellum*. Y hongos solubilizadores de fósforo y otros minerales, entre estos *Talaromyces pinophilus syn. Penicillium pinophilum* (INBACTER, s.f.).

Dentro del portafolio de producción de la compañía también se pueden encontrar bacterias fungicidas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, nematicidas de los géneros *Bacillus, Pseudomonas y Serratia*, insecticidas como *Bacillus thuringiensis* y bacterias bioestimulantes y biofertilizantes, entre estas *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas* spp. fluorescentes, productoras de ACC deaminasa.

La empresa también ha logrado el aislamiento y producción de bacteriófagos claves para el control de enfermedades en plantas causadas por bacterias. *Ralstonia solanacearum* es un complejo de cepas bacterianas que pueden causar marchitamiento en plantas de importancia comercial como el tomate (Wei et al., 2013), el tabaco (Zhao et al., 2023), la papa (Yousefvand et al., 2023), plátano y banano (Cellier et al., 2015)., cultivos de gran importancia para Colombia, debido a que son de alto consumo en la canasta familiar, proveen miles de empleos, y son productos de gran importancia en las dinámicas de exportación del país (Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2021a y 2021b). Actualmente, el manejo de esta enfermedad en el país, según la resolución No. 092770 del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA (2021) se lleva a cabo

implementando técnicas de control cultural en conjunto con control químico mediante la inyección de glifosato a plantas enfermas para su erradicación. Este sistema de erradicación y cuarentena perjudica económicamente al agricultor ya que deja el foco sin cultivo por al menos 6 meses mientras se controla la enfermedad, además del tiempo de re siembra para que se de una nueva producción. Por otro lado, el glifosato es un herbicida ampliamente usado en el mundo, sin embargo, se ha reportado su asociación con algunas enfermedades en el ser humano cómo la anemia (Chang et al., 2023) y la osteoartritis (Liang et al., 2024), además de efectos negativos en el crecimiento de plantas no objetivo (Ferreira et al., 2023). INBACTER ha llevado a cabo el aislamiento de fagos específicos para esta especie bacteriana, y ha creado formulaciones con gran eficacia para el tratamiento de la enfermedad en campo, desarrollando así un tratamiento selectivo para su blanco y seguro para las personas y el medio ambiente.

La compañía también se encuentra desarrollando estudios enfocados en la selección y prospección de fagos líticos sobre *Pectobacterium carotovorum*, agente causal de la podredumbre blanda en diferentes especies de plantas de importancia agrícola como el rábano (Lee et al., 2024), la cebolla (Bhatta et al., 2022), la papa (Mallick et al.,2022) y las callas (Buonario et al., 2002). INBACTER se centra en el control de este fitopatógeno en las plantas de callas, una flor de importancia comercial en Colombia, ya que este causa la pudrición blanda del bulbo volviéndose una gran limitante, por su difícil control y costo de manejo. *P. carotovorum* es de las enfermedades más severas que ataca el cultivo, esta bacteria es de fácil diseminación, pudiéndose transmitir por salpicado del agua, insectos y la manipulación de plantas y productos cosechados (ICA, 2014). Todos estos factores hacen necesaria una alternativa de control eficaz.

En la práctica realizada en la empresa INBACTER SAS, la estudiante llevó a cabo el cargo de auxiliar del área de microbiología. En este ejercicio, realizó principalmente la producción de inóculos fúngicos para la línea de Hongos benéficos en finca, la producción de bacteriófagos líticos para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas y de inóculos bacterianos para escalamiento en biorreactores, además de otros ensayos según requerimientos de los clientes como las pruebas de compatibilidad, aislamiento de microorganismos fitopatógenos y reactivación de hongos entomopatógenos, o requerimientos del área de Investigación y desarrollo, como la cuantificación y aislamiento de bacterias fitopatógenas desde matriz sólida.

Las actividades llevadas a cabo en la empresa le permitieron a la estudiante fortalecer las técnicas de laboratorio aprendidas en la carrera y adquirir habilidades para los procesos industriales en la producción de insumos de origen microbiano. En este trabajo se presenta un informe de resultados de las actividades de producción realizadas por la estudiante y de algunos servicios de apoyo a los clientes y al área de investigación y desarrollo. Cabe resaltar que los datos exactos de los resultados de los ensayos no pueden ser informados debido a que hacen parte de la información confidencial de los clientes y la empresa.

2. Objetivos de la práctica

Objetivo general:

Realizar actividades especializadas del área de microbiología en la empresa INBACTER S.A.S., Spin-off de la Universidad de Antioquia, dedicada al desarrollo y producción de insumos microbianos para agricultura.

Objetivos específicos:

PARA LA EMPRESA (PRODUCTIVOS)

- Mantener las colecciones de microorganismos de hongos, bacterias y bacteriófagos líticos de la Compañía y producir los inóculos requeridos para el escalamiento de la producción y realización de pruebas de formulación o eficacia, bajo estándares de calidad definidos.

PARA LA ESTUDIANTE (FORMATIVOS)

- Desarrollar competencias básicas para la selección y conservación de hongos, bacterias y bacteriófagos líticos para la protección vegetal.

- Identificar y adoptar habilidades para la producción de inóculo escalable a nivel industrial de microorganismos benéficos diversos: hongos, bacterias y bacteriófagos líticos.

- Desarrollar habilidades para la articulación de las actividades microbiológicas con otros frentes de trabajo en procesos multidisciplinarios propios del ejercicio empresarial.

3. Métodos

3.1 Producción de inóculos de hongos

Los hongos producidos en la empresa son hongos filamentosos pertenecientes al filo Ascomycota, la mayoría pertenece al órden Hypocreales a excepción de *T. pinophilus* que pertenece a Eurotiales (Nguyen et al., 2023). Son saprófitos facultativos y se reproducen mediante conidios de distintos colores que permiten la diferenciación macroscópica de las especies. La mayoría de estos hongos son biocontroladores de insectos y ácaros plaga.

La producción de inóculos de hongos benéficos en INBACTER inicia con la demanda de los clientes, quienes en base a sus necesidades en finca, realizan los pedidos de especie de hongo, cantidades en litros y fechas para las cuales son requeridos. Los pedidos son realizados a través de atención al cliente y transferidos al área de microbiología, donde la estudiante realizó los siguientes procesos:

Activación de cepas de hongos

Las cepas de hongos de la empresa se encuentran conservadas en discos de papel filtro, almacenadas en sobres de papel aluminio y refrigeradas. Para activar las cepas se esterilizó con alcohol y mechero un par de pinzas de metal, con mucho cuidado se levantó una pestaña del sobre, con ayuda de las pinzas se tomó un disco y se posicionó en el centro de una placa de agar de papa y dextrosa (PDA) y se incubó a 28°C.

Preparación de bolsas semillas

En bolsas autoclavables, siguiendo el protocolo estandarizado por la empresa, se usó arroz como sustrato (Chavéz-García et al., 2009) y se adicionó una solución de agua y ácido láctico. Se masajeó la bolsa para que la solución cubriera todo el arroz y se cerró la bolsa con un nudo suave, para permitir la salida de aire. Las bolsas se esterilizaron en autoclave y se dejaron enfriar. De una caja de activación se tomaron plugs del hongo que se deseaba inocular, con ayuda de un asa recta se introdujo mínimo dos plugs dentro de cada bolsa, finalmente, se masajeó para que las esporas del hongo se esparcieran sobre el arroz y se cerró la bolsa sin apretar el nudo.

Preparación de botellas para inóculo

Previo a la preparación de los inóculos, botellas de plástico autoclavable de 1L fueron llenadas con la cantidad de agua necesaria para producir los litros de inóculo solicitados y se esterilizaron.

Producción de inóculos de hongos

Para producir inóculos de hongos, se adicionó agua esteril a la bolsa semilla del hongo, según el protocolo de la compañía, se masajeó y el lavado fue vertido en un vaso beaker de 2 L, se completó el volumen con agua esteril. El líquido resultante fue dividido en dos botellas de 1L. Este procedimiento fue repetido con la misma bolsa semilla hasta que el lavado de la bolsa empezó a verse lechoso ya que esto es una señal de que se está degradando el arroz. Se tomó una muestra en tubo eppendorf al completar el volumen en el beaker, en los primeros dos litros, los dos en la mitad y los dos últimos litros del lote y se entregaron las muestras rotuladas a control de calidad. Las botellas fueron rotuladas con el código de lote y serie. Finalmente, fueron refrigeradas.

3.2 Producción de Inóculos Bacterianos

Las bacterias dentro del portafolio de INBACTER en su mayoría pertenecen a los géneros *Bacillus, Pseudomonas* y *Serratia*. Destaca la morfología bacilar (cortos y largos) en su mayoría móviles**.** Estas bacterias son frecuentemente encontradas en suelos y tienen alto potencial para su uso en el biocontrol de diferentes organismos.

Desde el área de microbiología de INBACTER, se producen inóculos bacterianos para escalamiento de la producción en biorreactores. Estos productos aún se encuentran en desarrollo, por lo tanto, los inóculos producidos por el área de microbiología son utilizados para los prototipos en desarrollo. Esta producción se espera que inicie con el pedido de los clientes a través de atención al cliente con la información de especie de bacteria, litros y fechas en que son requeridos. La información es transferida a la planta piloto de la empresa (en donde se realiza la producción a escala) y desde allí se realiza el encargo del inóculo de la bacteria al área de microbiología. A partir de allí el área de microbiología realiza los siguientes procesos:

Activación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de INBACTER se encuentran crioconservadas. Para su activación, se descongelaron los crioviales y se agitaron. Se esterilizó un asa redonda con ayuda de un mechero, y se tomó una muestra del criovial, se agotó la muestra mediante estría compuesta en placas de agar tripticasa de soya (TSA) y se incubaron a 28°C.

Preparación de inóculos bacterianos

En un tubo tipo eppendorf con perlas de vidrio, previamente esterilizado se adicionaron 1000 µL de agua destilada esteril. Con ayuda de un asa redonda se tomó una colonia pura de la caja petri de activación de la cepa, esta fue depositada en el tubo y se agitó. A partir de esta suspensión se tomó la alícuota indicada por la empresa y se inocularon erlenmeyers con caldo de tripticasa de soya, TSB (Chesneau et al.,2025). Este procedimiento fue realizado por duplicado y se destinó un erlenmeyer con TSB sin inocular como control. Los erlenmeyers inoculados fueron rotulados como A y B para que el área de control de calidad pudiera diferenciarlos, verificar su pureza a las 24h y hacer entrega a la planta piloto.

3.3 Producción de Bacteriofagos

Los bacteriófagos producidos por la empresa son específicos de bacterias fitopatógenas, la empresa trabaja con fagos aislados de *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum,* sin embargo, la producción está centrada principalmente en los fagos aislados de *R. solanacearum,* debido a que se encuentran en una etapa de investigación más avanzada. Actualmente, el proceso de producción de bacteriofagos inicia con la demanda por parte del área de investigación y desarrollo de la compañía, quienes informan a microbiología del bacteriofago, volumen, concentración y fechas en que es requerido. A partir de esta petición el área de microbiología realizó los siguientes procedimientos:

Incrementos de bacteriofagos

Inicialmente se preparó el medio para el crecimiento de los bacteriófagos, el cuál es la bacteria hospedera, para esto, se inoculó medio líquido (TSB o caldo nutritivo según la bacteria) con una colonia de la bacteria. Cuando hubo crecimiento visible, se montó

tinción de gram para evaluar su pureza y poder usarla en el método doble capa. Para realizar el incremento por el método de doble capa (Wang et al., 2023), se calentaron tubos de vidrio con medio semisólido (medio de soya tripticasa o nutritivo según la bacteria), a este se le adicionaron las alícuotas del fago y de la bacteria indicadas por la empresa, se hizo vortex y se vertió sobre una placa de agar el contenido del tubo (Ramirez et al., 2020). Este procedimiento fue repetido según el volumen de inóculo requerido. Las cajas fueron puestas en incubación durante 24 h y se verificó la aparición de placas sin crecimiento en el manto bacteriano causadas por el fago.

Cosecha

Con ayuda de una lámina portaobjeto limpia se raspó la superficie de las placas del incremento para desprender el medio semisólido, este se depositó en tubos falcon de 50mL y se adicionó la cantidad de buffer SM determinada por la compañía. Se hizo vortex a cada falcon durante 5 min, se centrifugó durante 20 min a 3500 rpm y se recolectó el sobrenadante.

Filtrado

Para el filtrado se usaron dos filtros de polisulfona estériles y membranas de nitrocelulosa con poros de 0.45 μm y 0.2 μm, para garantizar la esterilidad del filtrado. Se colocó una membrana de 0.45 μm en uno de los filtros con ayuda de pinzas, asegurándose de que el filtro esté bien sellado se vertió un poco del sobrenadante dentro del filtro, se observó la velocidad con la que filtraba el contenido y se agregó más volumen o se cambió la membrana si esta se taponaba. Luego de haber filtrado todo el volumen por membrana de 0.45 μm , se alistó el segundo filtro con una membrana de 0.2 μm y se repitió el proceso. El filtrado final se vertió en un envase estéril, se agitó muy bien el líquido y se tomó una muestra para que el área de control de calidad determinara la pureza y concentración del producto.

3.4 Servicios de Apoyo a los clientes

Pruebas de compatibilidad

Las pruebas de compatibilidad se realizaron con el objetivo de identificar si insumos agrícolas de interés para los clientes afectan el crecimiento de los hongos

benéficos proveídos por INBACTER. Para esto, se preparó medio PDA suplementado con el producto en la concentración que se desea aplicar en los cultivos y antibióticos como ampicilina y rifampicina para inhibir el crecimiento de bacterias que estuvieran en los productos a evaluar. Como control se usó PDA únicamente suplementado con los antibióticos. Se realizó un pozo en el centro de cada placa de agar y se posicionó en él un plug con crecimiento del hongo (Kos & Celar, 2012). De cada tratamiento se sembró un total de 5 cajas y estas se mantuvieron en incubación hasta que se evidenció buen crecimiento y esporulación del hongo en las cajas control. Finalmente se tomaron las fotos del ensayo comparando las cajas de cada tratamiento con las cajas del control. Estas fotos son entregadas al líder de área encargado de hacer los análisis usando el software de ImageJ.

Aislamiento de organismos fitopatógenos

El aislamiento de organismos fitopatógenos se realizó con el objetivo de identificar si los síntomas presentados por los cultivos de los clientes eran causados por microorganismos fitopatógenos. Para esto, se cortaron fracciones de tejido en forma de cuadrado de aproximadamente 0.5cm de lado, en los cuales el 50% del fragmento fuera tejido aparentemente enfermo y el otro 50% tejido sano. Este tejido fue lavado en 4 etapas. El primer lavado fue realizado con hipoclorito de sodio al 1%, el segundo con etanol al 70%, seguido por dos lavados finales con agua destilada esteril. Cada lavado tuvo una duración de 1 min (Katoch et al., 2017). Luego, el tejido fue secado sobre toallas de papel estériles para finalmente ser posicionados con pinzas sobre placas de agar PDA (Para el aislamiento de hongos) y TSA (para el aislamiento de bacterias). Después de evidenciar crecimiento, se aislaron las diferentes morfologías de hongos y bacterias para su estudio por separado. Luego de purificados, a los hongos se les realizó tinción con azul de lactofenol para la observación microscópica de estructuras reproductivas, con esto y los datos de morfología macroscópica y síntomas evidenciados en el cultivo, se realizó la identificación presuntiva del hongo fitopatógeno. Para las bacterias se realizó una tinción de gram y se le informó al cliente cuantas morfologías diferentes de bacterias se aislaron y se almacenaron en caso de que el cliente decidiera realizar identificación molecular.

Selección de cepas de hongos entomopatógenos.

Para renovar la virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos que se les ofrece a cada finca, se realiza el aislamiento desde un insecto micosado. Este puede ser enviado desde la finca o infectado en el laboratorio por el área de control de calidad. En cualquiera de los dos casos, el área de microbiología recibe el insecto micosado. Para realizar el aislamiento, con un asa recta estéril se tocó el área del microorganismo donde se veía evidencia de micosis del hongo de interés y se realizó una punción sobre placas de PDA. Estas fueron llevadas a incubación durante 7 días y se realizó tinción con azul de lactofenol con el objetivo de confirmar la identidad del hongo mediante microscopía. Luego de confirmada la pureza del aislado se procedió a realizar su conservación.

Conservación de hongos

Para la conservación de los hongos se cortaron discos de papel de 0.5cm de diámetro y se esterilizaron. Con ayuda de pinzas estériles se depositaron sobre placas de medio PDA. Con un asa recta se tomó biomasa del hongo que se quería almacenar y se realizaron punciones sobre el agar PDA, asegurándose de que las punciones quedaran cerca a los discos de papel, con el objetivo de que el hongo creciera sobre los mismos. Cuando se observó crecimiento del hongo sobre los discos estos fueron retirados con pinzas estériles y depositados en cajas petri para dejar secar cerca al mechero. Cuando estuvieron secos, fueron almacenados con pinzas en sobres de aluminio y refrigerados en un rango de temperatura de 4 a 8 °C.

3.5 Ensayos de Investigación y Desarrollo

Aislamiento y cuantificación de *R. solanacearum* desde matriz sólida

Desde el área de investigación y desarrollo se adelantan experimentos en campo para la evaluación de los bacteriófagos producidos por la empresa. En estos experimentos, se le solicitó al área de microbiología no solo la producción de los bacteriófagos sino también el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la bacteria fitopatógena en suelo de plantaciones de banano, antes y después del tratamiento con bacteriófagos. De este experimento se procesaron 14 muestras de las cuales 7 correspodieron al tratamiento con fagos y 7 al control. El suelo de cada muestra fue homogeneizado, luego se pesó un gramo de cada muestra en tubos falcon de 50 mL y se

le adicionaron 9mL de agua destilada estéril, se agitó cada falcon durante 3 min antes de realizar 3 diluciones seriadas más.

Para los recuentos, se preparó en agar SMSA desarrollado por Engelbrecht (1994), con algunas modificaciones realizadas por la empresa, éste al contener TZC (cloruro de trifenil tetrazolio) permite la identificación de colonias de *R. solanacearum* mediante la observación de una morfología fluida con centro rojo a rosa y borde blanco (Perea et al., 2011). Se sembraron las diluciones 10^{-2}, 10^{-3} y 10^{-4}por duplicado usando una alícuota de 100 µL y extendiendo la muestra con asa de digralsky. Estos medios se dejaron en incubación durante 5 días para poder observar correctamente las diferentes morfologías que crecieran en él. Se identificaron las morfologías compatibles con *R. solanacearum* y se contaron las UFC. Finalmente se sembraron en TSA al 10% las morfologías compatibles, como una prueba confirmatoria, ya que en la empresa se tiene caracterizada la morfología de *R. solanacearum* en este medio.

La identificación desde matriz sólida también se realizó desde tejidos vegetales como cormo y pseudotallo de plantas de banano con síntomas parecidos a los causados por la bacteria fitopatógena, con el objetivo de conocer si las plantas estaban realmente infectadas por la misma. Para esto, los cultivadores asociados proporcionaron alrededor de 5 muestras por envío, cada una con cormo y pseudotallo de una planta diferente. Para el procesamiento se pesó 10 g de cormo y 10 g de pseudotallo de la misma muestra y se licuaron en 100 mL de agua destilada estéril, a partir de este licuado se realizaron otras 4 diluciones y se sembraron en medio SMSA por duplicado las diluciones 10^{-3},10^{-4},10^{-5} y extendiendo la muestra con asa de digralsky. Estos medios se dejaron en incubación durante 5 días para poder observar correctamente las diferentes morfologías que crecieran. Finalmente se sembraron en TSA al 10% las morfologías compatibles, como una prueba confirmatoria debido a que se tiene caracterizada la morfología en este medio.

Pruebas de rango de hospedero

Las pruebas de rango de hospedero se realizaron con el objetivo de conocer si los aislados con morfologías compatibles con *R. solanacearum* son sensibles a los bacteriófagos líticos de la empresa. Para esto se realizó el método de spot sobre placas de agar doble capa (Azam et al., 2024), en el cual sobre una placa de agar TSA al 10% se vertió una capa de TSB semisólido el cual fue inoculado con una alícuota de 100 µL de

la bacteria en la densidad óptica estandarizada por la empresa. Finalmente, cuando el medio estuvo solidificado, se depositó una gota de 5 μL de suspensión de cada bacteriófago a evaluar y se dejó en incubación durante 24 h. La sensibilidad de los aislados bacterianos se evidencia ya que en el punto de aplicación de la gota no hay crecimiento del manto bacteriano.

Crioconservación de cepas sensibles a los bacteriófagos

Luego de confirmada la sensibilidad de los aislados bacterianos a los bacteriófagos específicos de *R. solanacearum*, estos fueron almacenados en crioviales de TSB con glicerol al 20%.

4. Resultados y Discusión

4.1 Producción de inóculos de hongos

En todo el proceso la estudiante produjo inóculos de 6 de las 8 especies de hongos ofrecidas por la empresa. Los inóculos más solicitados por los agricultores fueron los de *T. asperellum*, el 85% de los clientes de INBACTER, entre estos productores de aguacate, piña, banano y cultivos de flores utilizan este hongo fungicida para el control de diferentes especies hongos y oomycetes fitopatógenos como algunos de los géneros *Colletotrichum* (patógenos de aguacate, banano y flores), *fusarium* (patógenos de aguacate, banano, piña, uchuva y cultivos de flores), *Pythium y Botrytis* (patógenos de plantas ornamentales), y *Phytophthora* (patógeno de aguacate y piña).

Trichoderma spp. ha mostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento de estos fitopatógenos por diferentes vías cómo la competencia por espacio y nutrientes, la producción de enzimas líticas, la producción de sustancias antifúngicas y el micoparasitismo (Tyśkiewicz et al., 2022; Kubicek et al., 2011). Además de esto, el género *Trichoderma* spp. También ha mostrado ser efectivo en la bioestimulación del crecimiento y la inducción de resistencia vegetal. Esto debido a la producción de fitohormonas como la auxina, la giberelina y de enzimas como la ACC deaminasa, que interactúan con los metabolitos producidos por la planta y generan un equilibrio hormonal. Este equilibrio se ve reflejado en aumento del peso de la planta, mayor número de raíces y el aumento de enzimas depuradoras de especies reactivas de oxígeno (Jaroszuk et al., 2019; Zhang et al., 2017).

En segundo lugar encontramos a *B. bassiana*, utilizada por el 40% de los clientes para el tratamiento de insectos plaga entre estos picudo (*Heilipus lauri*), trips (*Selenothrips rubrocinctus*), *Compsus* spp y *Monalonion* spp. en aguacate, picudo rayado (*Metamasius hemipterus)* y picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en banano, Trips (*Frankiella* spp.) y pulgon del crisantemo (*Macrosiphoniella sanborni*), entre otros. Este hongo entomopatógeno es el más usado a nivel mundial para el biocontrol de cita. *B. bassiana* infecta insectos cuando sus conidios se adhieren a la cutícula del hospedero, germinan y penetran mediante presión mecánica y enzimas degradadoras. Una vez en la hemolinfa, el hongo se multiplica como hifas o blastosporas y libera toxinas que causan septicemia y la muerte del insecto (Mascarin & Jaronski, 2016).

Luego tenemos a *P. lilacinum syn. Paecilomyces lilacinus*, el cual es utilizado por el 20% de los clientes, en su mayoría cultivos de flores para el control de nemátodos. Diferentes estudios confirman la eficacia de *P. lilacinum* para el control de nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne* spp. Actúa penetrando huevos y juveniles, produce compuestos secundarios (toxinas, ácidos grasos, enzimas) que inhiben la movilidad, eclosión y supervivencia del nematodo, reduciendo eficazmente la población de nematodos y el número de agallas en las raíces de las plantas (Kiewnick & Sikora, 2006; Khan & Tanaka, 2023).

I. fumosorosea y *M. anisopliae* son hongos entomopatógenos al igual que *B. bassiana*, sin embargo estos son solicitados únicamente por el 15% de los clientes. *Isaria* spp. es ampliamente utilizada por su eficacia en el control de ácaros plaga (Zhang et al., 2016). *T. pinophilus*, antes llamado *Penicillium pinophilum* es encargado únicamente por el 5% de los clientes, en su totalidad de cultivos de aguacate. Este hongo es ampliamente utilizado por su capacidad de solubilizar el fósforo, es decir, transforma el fósforo que se encuentra en formas no asimilables para las plantas cómo los fosfatos de calcio de la roca fosfórica en formas asimilables para las plantas, aumentando así su rendimiento (Abdul & Mehana, 2000). Otros hongos ofrecidos por INBACTER son *P. chlamydospora*, hongo nematicida y el hongo entomopatógeno *L. lecanii*, estos son solicitados únicamente por el 5% de los clientes y no fueron producidos durante el periodo de prácticas.

Estos inóculos fúngicos son utilizados por los clientes para hacer ellos mismo la producción a escala. Esto le permite al agricultor un ahorro económico a largo plazo, en comparación de si utilizara productos terminados. Los inóculos son despachados por la empresa solo si cumplen con una concentración entre $1x10^8$ y $1x10^9$ esporas/mL y un grado de pureza de 100%, esto para garantizar la seguridad y la eficacia en la producción de los clientes. INBACTER ofrece al cliente una promesa de $1x10^9$ esporas/g en los hongos producidos en las fincas, a diferencia de lo que obtienen en productos comerciales listos para usar, con concentraciones entre $1x10^6$ y $1x10^8$. Esto significa que usar una formulación 10 veces más concentrada (10^9 UFC/mL) le permite al agricultor ahorrar aproximadamente 90% del volumen del insumo, y proporcionalmente el costo también puede reducirse cerca de un 90%, suponiendo que el precio por unidad de producto sea el mismo.

En los 6 meses de práctica la estudiante produjo el 37% de los lotes de inóculos de hongos encargados a la empresa (Figura 1). De estos lotes el 97% cumplió con los estándares de pureza y concentración y el 3% no cumplió debido a contaminación.

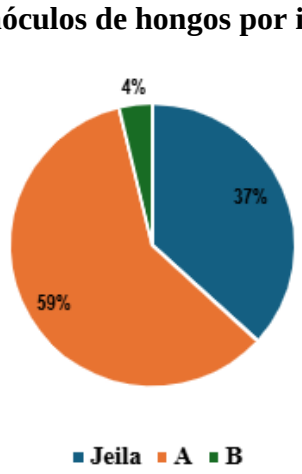

Figura 1. Porcentaje de producción de inóculos fúngicos por cada integrante del área.

Las contaminaciones existentes en los inóculos que no cumplieron con los estándares de calidad pudieron deberse a una esterilización mal realizada del sustrato o a errores en la manipulación de los elementos a la hora de inocular el hongo en la bolsa semilla. Este tipo de eventualidades pueden causar retrasos en la entrega de los lotes afectados, sin embargo no fueron frecuentes y por lo tanto no representaron un problema para las dinámicas de venta de la empresa.

Estas situaciones demuestran la importancia de la planeación estratégica de la producción, en la cual se debe tener en cuenta puntos importantes como tener varias bolsas semilla del mismo hongo en stock, preparar los inóculos inmediatamente son ordenados para el aprovechamiento del tiempo por si es necesaria una nueva producción, entre otros.

4.2 Producción de Inóculos Bacterianos

Los productos bacterianos realizados en los biorreactores de la empresa deben salir en una concentración de $1x10^9$ UFC/mL, para esto es importante que el inóculo preparado por el área de microbiología cumpla con tres condiciones condiciones, i. tener

un volumen de al menos el 10% del volumen del biorreactor que se va a inocular, y ii. estar libre de contaminaciones y iii. tener una densidad óptica de mínimo 1 abs a 600 nm. En el semestre de práctica la estudiante produjo el 20% de los inóculos bacterianos para escalamiento en biorreactor (Figura 2). De estos inóculos el 100% cumplió con los estándares determinados por la empresa. En este periodo, el 80% de los inóculos solicitados por la planta piloto correspondieron a inóculos de *Bacillus tequilensis*, *B. tequilensis* hace parte del complejo de especies de *Bacillus subtilis*, son bacterias Gram-positivas, formadoras de endosporas. Este grupo es de gran interés tanto en biotecnología como en agricultura debido a sus propiedades probióticas y su capacidad de actuar como bioinoculante y productor de enzimas y antibióticos naturales. *B. tequilensis* es de las especies menos conocidas de este complejo, su actividad antifúngica se debe a la producción de lipopéptidos como surfactina y fengicina (Kwon et al., 2022) que inhiben hongos fitopatógenos además de enzimas líticas como las quitinasas que degradan las paredes de los hongos. estudios han demostrado la eficacia de esta especie bacteriana como antifúngico, utilizada en el biocontrol de hongos como *Fusarium solani* (Wang et al., 2023) , *Botrytis cinerea* (Du et al., 2024) que afecta frutales y flores ornamentales como las producidas por los clientes, entre otros fitopatógenos.

El otro 20% de los pedidos de inóculos fueron de *B. thuringiensis*. Es una bacteria utilizada en agricultura como insecticida natural altamente selectivo: durante su esporulación produce toxinas Cristal (Cry) que, al ser ingeridas por larvas de insectos (principalmente lepidópteros, dípteros y coleópteros), causan la muerte mediante perforación del intestino (Kumar et al., 2021; Ma et al., 2023).

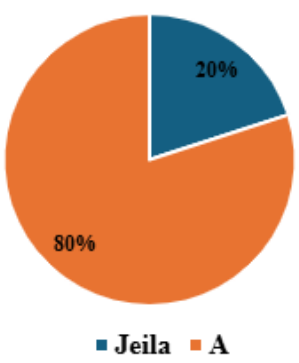

Figura 2. Porcentaje de producción de inóculos bacterianos por cada integrante del área

Aunque la producción de inóculos bacterianos no fue una actividad frecuente realizada por la estudiante, las ocasiones en que se realizó, se obtuvo el resultado esperado, cumpliendo con los tiempos establecidos para entrega a la planta piloto, evitando retrasos en el calendario de escalamiento de la misma. Este proceso en específico permitió comprender la importancia de los pasos previos para que se pueda dar una producción a escala. La producción del inóculo bacteriano es el paso más crítico ya que si no se realiza una correcta preparación del material, una buena operación del proceso o no se cumplen con los tiempos de inoculado, se puede ver perjudicada la logística de preparación de medios, esterilización, inoculación y cosecha de biorreactores, lo que no solo se ve representado en retrasos temporales, sino también en pérdidas económicas para la empresa.

La pérdida de una producción de un biorreactor de 10 L por contaminación, y la pérdida de cinco días de trabajo en este sistema de producción, puede generar pérdidas económicas directas estimadas entre 280.000 y 560.000 COP, considerando el costo del medio de cultivo, energía eléctrica, mano de obra y limpieza del equipo. A esto se suman las pérdidas logísticas por retrasos en la producción y posibles afectaciones en la cadena de distribución, que podrían equivaler a un 20–50 % adicional de los costos directos, elevando la pérdida total aproximada a entre 330.000 y 840.000 COP por lote.

4.3 Producción de Bacteriófagos

Los bacteriófagos se han convertido en una alternativa muy importante al uso de antibióticos, ya que debido a su especificidad no representan un riesgo para otros seres vivos y su origen natural los hace seguros ya que no son tóxicos al acumularse en el suelo o al hacer contacto con el agua o las plantas (Sieiro et al., 2020). Ramírez et al. (2020) seleccionaron fagos aislados de suelos cultivados con banano y plátano y evaluaron su capacidad para controlar *R. solanacearum*, tanto *in vitro* como en plantas de banano en condiciones de invernadero, con esto encontraron dos fagos denominados M5 y M8 que mostraron ser eficientes restringiendo temporalmente la enfermedad, y con la combinación de dos fagos obtuvieron una protección total contra el moko, lo que los convierte en una alternativa con gran potencial para el control de la enfermedad del moko

en campo. Estos bacteriófagos, M5 y M8 son los que hoy en día se producen en la empresa (Figuras 3 y 4).

Durante su estancia en la empresa, la estudiante produjo el 46% de los productos de bacteriófagos. De estos el 80% cumplió con los estándares de concentración en el rango de $1x10^{10}$y $1x10^{11}$ UFP/mL, y el 50% con los estándares de pureza, es decir, libres de células bacterianas viables.

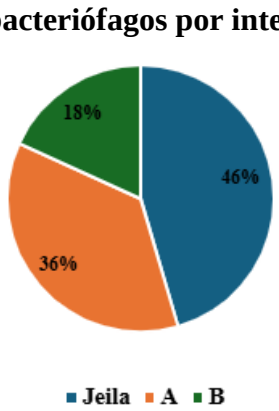

Figura 3. Porcentaje de producción de bacteriófagos por cada integrante del área.

La producción de bacteriófagos es uno de los procesos que aún se encuentran en desarrollo para mejorar los resultados de concentración y pureza, ya que este, a diferencia de los procesos de producción de hongos y bacterias, tiene muchas más etapas y un nivel de dificultad mayor. Esto representa más puntos de posible contaminación o puntos donde puede haber cabida a leves cambios que modifiquen totalmente el resultado.

Dentro de los puntos clave en la producción de bacteriófagos que se tienen que tener en cuenta para cumplir el estándar de concentración de la empresa es el ajuste exacto de la concentración de la bacteria y el fago que genere una mayor Multiplicidad de Infección (MOI), por lo tanto, una concentración más alta del bacteriófago al final del proceso. Por otro lado también se encuentra la posibilidad de que los fagos puedan formar aglomeraciones muy fuertes que pueden causar una subestimación de la concentración del producto final, ya que al estar tan unidos, varios fagos podrían formar una sola placa lo que afectaría el recuento de Unidades Formadoras de Placa (UFP).

Dentro de los puntos clave en la producción que podrían afectar el estándar de pureza tenemos la manipulación de las membranas de nitrocelulosa, ya que al ser tan frágiles hay riesgo de romperlas o quemarlas al momento de manipularlas con las pinzas

calientes. Un daño a la membrana que no sea fácilmente visible podría permitir el paso de las células bacterianas al momento de filtrar el producto, haciendo que no quede libre de las mismas. Por otro lado se encuentra la bomba de filtración, la cual durante una época estuvo con problemas de funcionamiento en el cual el aceite lubricante se movía hacia el sistema de filtrado causando contacto con el producto y contaminándolo. Aunque son muchos puntos de importante atención en el proceso, fue posible para la estudiante con el tiempo mejorar sus habilidades en la manipulación de los materiales y en la preparación de los pre inóculos para la producción, mejorando así los resultados en concentración y pureza. Además de esto, hubo un cambio en la bomba de filtrado y la obtención de filtros de aire que sin lugar a duda ayudaron progresivamente con el cumplimiento de los estándares ya mencionados.

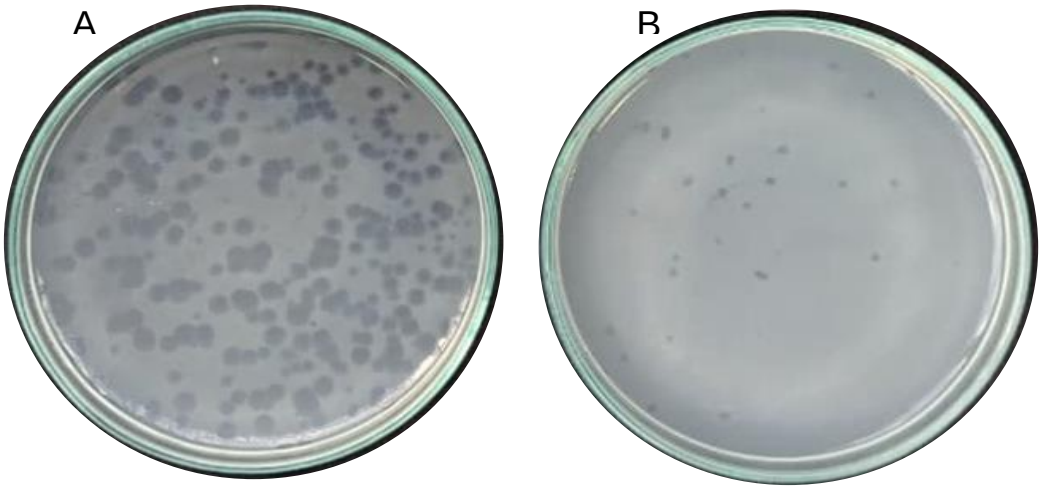

Figura 4. Placas de los bacteriófagos líticos M5(A) y M8(B) sembrados por el método de doble capa.

4.4 Servicios de Apoyo a las fincas clientes

Pruebas de compatibilidad

La estudiante realizó el 60% de las pruebas de compatibilidad llevadas a cabo por el área de microbiología en el periodo de la práctica, evaluando alrededor de 10 productos agrícolas frente a algunos hongos ofrecidos por la empresa entre estos los más comunes fueron los hongos *T. asperellum y B. bassiana.* Entre los productos evaluados se encuentran fungicidas como Ecoswing (extracto de *Swinglea glutinosa)*, insecticidas como Capsialil (capsaicina) y Citroemulsión (aceites esenciales de cítricos), reguladores

del crecimiento vegetal como Sunny (ácido giberélico), herbicidas como lo son Flumyzin (fluometuron) y Centurión (cletodim) y finalmente fertilizantes como Calcianit (nitrato de calcio), Sn-K Potasio (nitrato de potasio), entre otros (figura 5).

De una forma cualitativa se pudo observar que los productos que más afectaron el crecimiento de los hongos evaluados, y por lo tanto, son incompatibles para el uso en los cultivos son los fungicidas y algunos fertilizantes como el calcinit y el Sn-K-Potasio. Por el contrario, los productos que menos afecciones causaron al crecimiento de los hongos y por lo tanto son compatibles fueron los insecticidas. Las fotos de los ensayos fueron entregadas a la líder del área quien realizó los análisis mediante el software Image J. Estas pruebas son de gran importancia tanto para el cliente como para la empresa ya que si se aplicaran estos agroquímicos sin antes conocer su efecto sobre los microorganismos que le ofrece la empresa al cliente, podría haber confusiones sobre la calidad y efectividad de los inóculos.

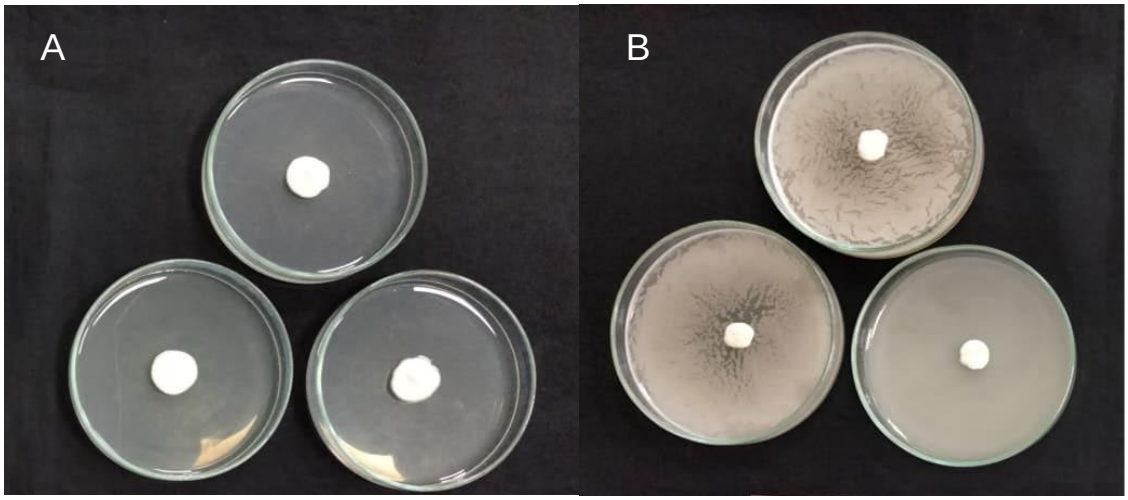

Figura 5. Prueba de compatibilidad de Citroemulsión con *B. bassiana.* (A) Control de *B. bassiana.* (B) Tratamiento con Citroemulsión.

Aislamiento de organismos fitopatógenos

La estudiante tuvo la oportunidad de realizar dos análisis de microorganismos fitopatógenos en su estancia en la empresa. El primer aislamiento se realizó a partir de inflorescencias de aguacate. A partir de este, se aisló un total de 4 bacterias gram negativas, además se aislaron 3 hongos de los cuales solo uno mostró morfología macroscópica y microscópica compatible con un hongo fitopatógeno causante de los

síntomas que estaba teniendo el cultivo. El hongo aislado presentaba colonias planas, color gris, con anillos rosados, blancos y marrones (Figura 6A) y reverso color miel con zonas oscuras. Microscópicamente mostró conidios unicelulares cilíndricos, alargados y redondeados en los bordes (Figura 6B), todas estas características permitieron identificarlo como perteneciente al género *Colletotrichum*, un género de hongos fitopatógenos causantes de la antracnosis. En frutos de aguacate los sintomas son manchas necróticas irregulares o circulares y deprimidas de color marrón oscuro o negro, las flores se vuelven marrones, se marchitan y caen antes de la fructificación. (Cobo, 2017).

El segundo aislamiento de microorganismos fitopatógenos se realizó a partir de frutos de aguacate de este se obtuvieron 4 aislados bacterianos gram negativos y 10 aislados de hongos de los cuales solo 1 fue compatible con características microscópicas y macroscópicas de hongos fitopatógenos causantes de la sintomatología de los frutos. Por todas estas características, también se pudo llegar a la identificación de *Colletotrichum* spp. como el posible agente causal de la enfermedad que estaba afectando a este cultivo. Estas pruebas son de gran importancia para proporcionar al cliente la asesoría correspondiente para tratar el problema fitosanitario, ya que *Colletotrichum* spp.

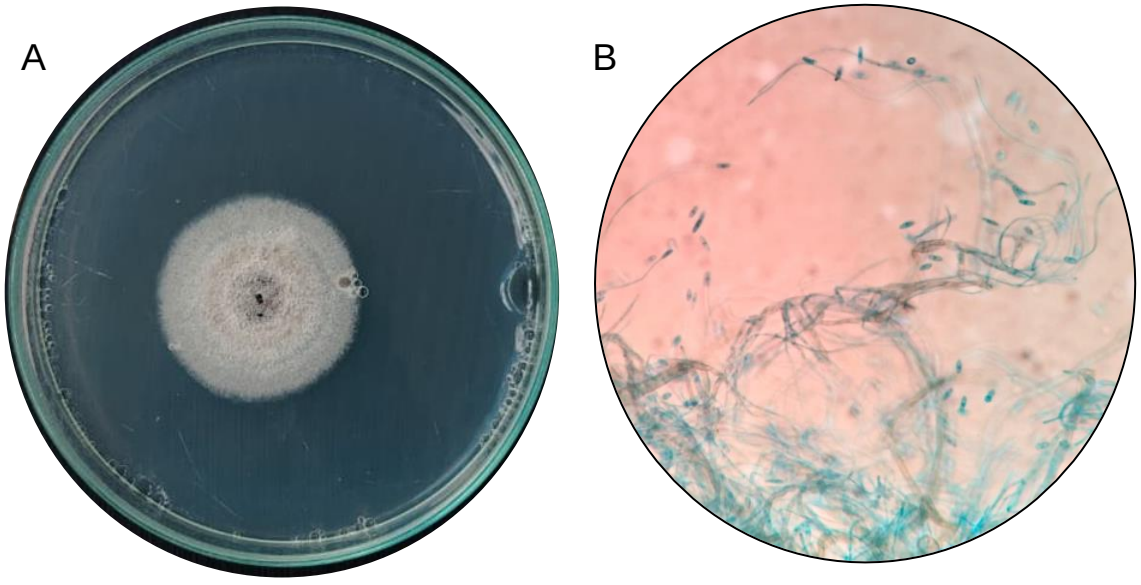

Figura 6. *Colletotrichum* sp. Aislado de inflorescencias de aguacate. (A) Colonia creciendo en PDA. (B) Conidios e hifas teñidos con azul de lactofenol.

Selección de cepas de hongos entomopatógenos.

En el tiempo de prácticas, la estudiante tuvo la oportunidad de realizar el 66% de los reaislamientos de hongos entomopatógenos realizados por el área, en su totalidad fueron aislamientos de *B. bassiana*. Estos aislamientos fueron realizados a partir de individuos de *Metamasius hemipterus,* mejor conocido como picudo rayado, un curculiónido plaga de plantaciones de banano y a partir de larvas de *Leptophobia aripa,* una plaga importante para los cultivos de crucíferas como el repollo, coliflor, brócoli y col en Colombia. En todos los casos, el aislamiento y conservación de los hongos cumplió con las condiciones de pureza establecidas por la empresa, permitiendo proporcionar a los clientes aislados de *B. bassiana,* seguros y eficientes en la infección de estos organismos plaga.

La renovación de las cepas de hongos entomopatógenos es de vital importancia para mantener la virulencia de las mismas a través del tiempo. Si esta práctica no se realizara los inóculos ofrecidos por la empresa podrían bajar su efectividad y por lo tanto no cumplirían con los requerimientos de los clientes. La pérdida de virulencia de las cepas de entomopatógenos es una problemática que puede ocurrir debido a diferentes factores entre estos pueden estar las condiciones de almacenamiento y ambientales, pero también la especificidad de la relación hongo-insecto. En un estudio llevado a cabo con 29 aislados de *B. bassiana* y una especie de mosquito (*Anopheles coluzzii*), encontraron que existe una variabilidad natural significativa en la virulencia de los diferentes aislados (Valero-Jiménez, 2014). Esto resalta la importancia de la elección del aislado adecuado para determinado insecto objetivo.

4.5 Ensayos de Investigación y Desarrollo

Aislamiento y cuantificación de Ralstonia desde matriz sólida

En total, a partir de cormo y pseudotallo se realizaron 6 procesamientos, cada uno con 4 o 5 muestras, un procesamiento de muestras de plantaciones de Urabá y cinco procesamientos de muestras de cultivos del Magdalena. De todos los procesamientos en total se obtuvieron y fueron almacenados 38 aislados bacterianos compatibles con la morfología de *R.solanacearum* y sensibles a los bacteriófagos M5 y M8 (Figura 7).



Figura 7. Prueba de rango de hospedero realizada mediante el método del *spot*. Evaluando la capacidad lítica de los bacteriófagos M5 y M8 sobre un aislado de *R. solanacearum* del magdalena.

Del experimento en campo con el tratamiento de bacteriófagos se obtuvieron 4 morfologías diferentes en el medio SMSA, de las cuales solo una mostró morfología compatible con *R. solanacearum* en SMSA y TSA al 10%. De esta última se realizaron recuentos UFC en suelo antes del tratamiento y luego de dos semanas de aplicado el tratamiento. Estos datos fueron entregados al área de investigación y desarrollo desde donde se realizaron los análisis estadísticos.

Este tipo de ensayos son muy importantes, ya que le permite a la empresa no solo identificar si la bacteria fitopatógena está en una muestra determinada de una manera menos costosa que si se usaran metodologías de PCR sino también que elimina el problema de cuantificar material genético de la bacteria sin conocer cuánto de este pertenece a bacterias vivas o lisadas, permitiendo hacer conteos en agar únicamente de las bacterias viables. En un estudio sobre variabilidad filogenética y patogénica de cepas de *R. solanacearum*, se encontró que las cepas colombianas están subdivididas en al menos tres grupos que coinciden con la región de aislamiento: (i) región central, filotipo IIB, secuencia 4 (IIB/4); (ii) noroeste, IIB/4; y (iii) costa norte, IIA/6. Además, estas cepas difirieron en su patogenicidad (Ramírez et al., 2019). Estas diferencias genotípicas se pudieron ver relacionadas en esta práctica con características morfológicas particulares, por ejemplo, los aislados del Urabá (donde domina el secuevar 4) presentaron colonias

pequeñas y un poco fluidas, a diferencia de los aislados del Magdalena (donde domina el secuevar 6), presentaron colonias grandes muy fluidas y con apariencia mucosa. Estas diferencias entre cepas de la misma especie hacen un poco más compleja la identificación debido a que el no reconocer las diferentes morfologías en SMSA (Figura 8), podría llevar a subestimar la cantidad de UFC presentes en una muestra. Por lo tanto, lo más adecuado para determinar la identidad de la bacteria por morfología, sería observar su crecimiento tanto en SMSA como en TSA 10% (Figura 9), ya que en este último presentan otras características comunes como tonalidades tornasol a contraluz, presencia de círculos translúcidos al interior de las colonias y el olor particular de la especie.

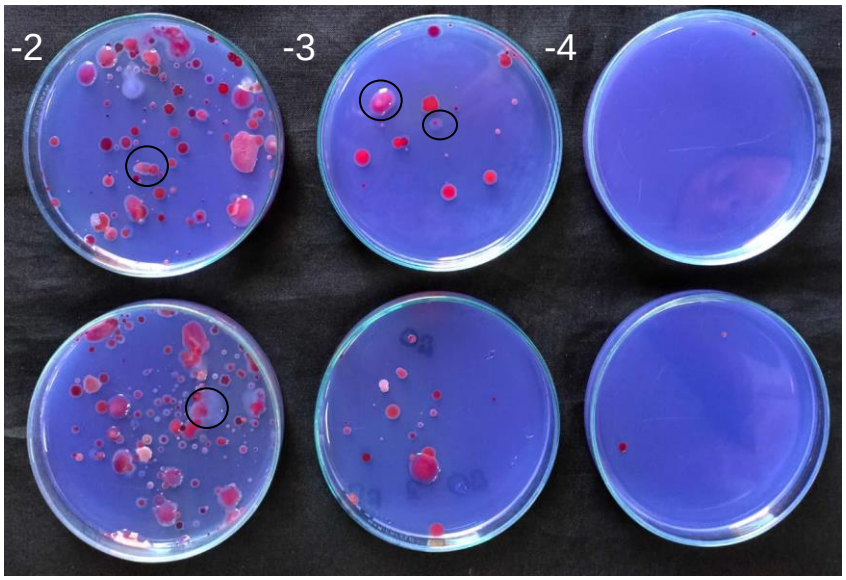

Figura 8. Recuentos de UFC de morfologías compatibles con *R. solanacearum* en medio SMSA. Dentro los círculos negros se señalan diferentes morfologías compatibles.

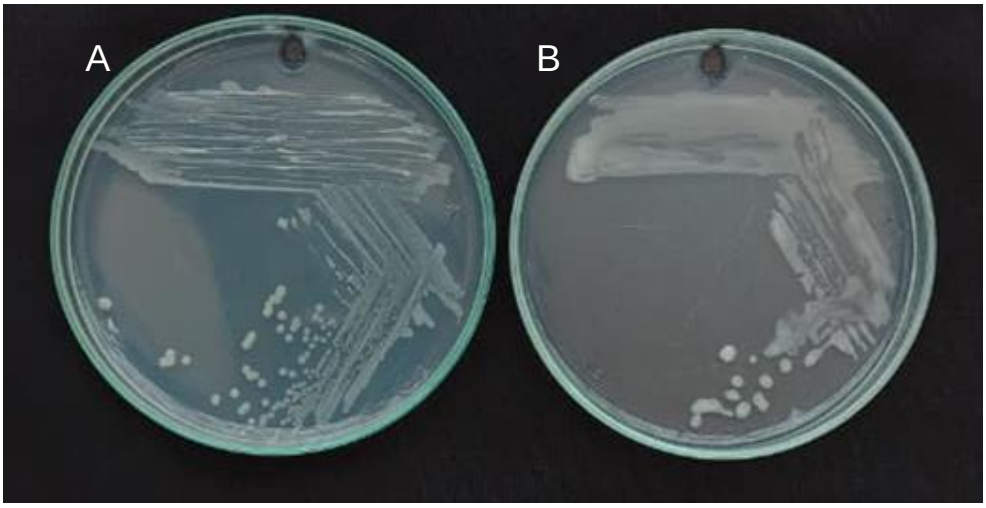

Figura 9. Morfología característica de *R. solanacearum* en TSA al 10%. (A) Aislado de la zona del Urabá. (B). Aislado de la zona del Magdalena.

5. Conclusiones

A lo largo de la práctica profesional, la estudiante desarrolló competencias básicas para la selección y conservación de hongos, bacterias y bacteriófagos líticos para la protección vegetal. Además de habilidades para la producción de inóculo escalable a nivel industrial de microorganismos benéficos, cumpliendo con los estándares de pureza y concentración estipulados por la empresa.

Esta práctica fue muy significativa, ya que no solo le permitió a la estudiante explorar y desarrollar aprendizajes técnicos y teóricos sobre tres ramas importantes de la microbiología sino también habilidades necesarias para la articulación de las actividades microbiológicas con otros frentes de trabajo, especialmente en contextos multidisciplinarios característicos del entorno empresarial. Estas experiencias fueron fundamentales para entender cómo los principios biológicos se traducen en productos viables técnica y comercialmente. Además, se evidenció la importancia de integrar estos procesos con estrategias de planeación y comercialización, asegurando que los bioinsumos no solo cumplan con estándares de eficacia y estabilidad, sino que también respondan a las necesidades del mercado. Esta integración de saberes permitió fortalecer habilidades para el trabajo en equipo, la comunicación entre disciplinas y la toma de decisiones basadas en resultados científicos, aspectos esenciales para el ejercicio profesional en empresas dedicadas a la biotecnología y la agricultura sostenible.

Referencias

Abdul Wahid, O. A., & Mehana, T. A. (2000). Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. Microbiological Research, 155(3), 221–227. doi:10.1016/s0944-5013(00)80036-1

Azam, A. H., Sato, K., Miyanaga, K., Nakamura, T., Ojima, S., Kondo, K., Tamura, A., Yamashita, W., Tanji, Y., & Kiga, K. (2024). Selective bacteriophages reduce the emergence of resistant bacteria in bacteriophage-antibiotic combination therapy. Microbiology Spectrum, 12(6). https://doi.org/10.1128/spectrum.00427-23

Bhatta, B. P., Khanal, M., & Malla, S. (2022). Whole genome and 16S rRNA dataset of *Pectobacterium carotovorum* strain 21TX0081 isolated from a symptomatic onion foliage in Texas. Data in brief, 46, 108823. https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108823

Botlagunta, N., & Babu, S. (2024). Growth enhancement and changes in bacterial microbiome of cucumber plants exhibited by biopriming with some native bacteria. Saudi Journal Of Biological Sciences, 31(6), 103997. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103997.

Buonaurio, R., Moretti, C., Caglioti, C., Innocenti, M. (2002). Occurrence of a soft rot of calla (*Zantedeschia aethiopica*) caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum in central Italy. Phytopathologia Mediterranea, 41(2), 152–156. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1667

Cellier, G., Moreau, A., Chabirand, A., Hostachy, B., Ailloud, F., & Prior, P. (2015). A duplex PCR assay for the detection of *Ralstonia solanacearum* phylotype II strains in Musa spp. PloS one, 10(3), e0122182. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122182

Chang, M. H., Chu, P. L., Wang, C., & Lin, C. Y. (2023). Association between Glyphosate Exposure and Erythrograms in a Representative Sample of US Adults: NHANES 2013-2014. Environmental science and pollution research international, 30(39), 91207–91215.https://doi.org/10.1007/s11356-023-28905-y

Chávez García, M., Montaña Lara, J., Martínez Salgado, M.M., Mercado Reyes, M., Rodríguez, M. X., Quevedo Hidalgo, B. (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. Universitas Scientiarum, 13(3), 245-251. https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1434/896

Cobo Nuñez, G. (2017). Identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de antracnosis en frutos de aguacate *Persea americana* var. Hass.

Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. (2021a).Cadena de plátano. SIOC, Minagricultura. [Archivo PDF]

https://sioc.minagricultura.gov.co/Platano/Documentos/2021-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf

Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. (2021b). Cadena de banano. SIOC, Minagricultura. [Archivo PDF] https://sioc.minagricultura.gov.co/Banano/Documentos/2021-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf

Du, Q., Li, R., Liu, L., Chen, L., Tang, J., Deng, J., & Wang, F. (2024). Application of *Bacillus tequilensis* for the control of gray mold caused by *Botrytis cinerea* in blueberry and mechanisms of action: inducing phenylpropanoid pathway metabolism. Frontiers In Microbiology, 15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1455008

Engelbrecht, M. (1994). "Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*." *Bacterial Wilt Newsletter*, 10: 3–5

Ferreira, M. F., Torres, C., Bracamonte, E., & Galetto, L. (2023). Glyphosate affects the susceptibility of non-target native plant species according to their stage of development and degree of exposure in the landscape. The Science of the total environment, 865, 161091. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161091

Franco, G. A., Molinari, F., Marino, Y., Tranchida, N., Inferrera, F., Fusco, R., Di Paola, R., Crupi, R., Cuzzocrea, S., Gugliandolo, E., & Britti, D. (2024). Environmental endocrine disruptor risks in the central nervous system: Neurotoxic effects of PFOS and glyphosate. Environmental Toxicology And Pharmacology, 109, 104496. https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104496

INBACTER.(s.f). Hongos en finca. https://inbacter.com/hongos-en-finca

Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2021). Por medio de la cual se establecen las medidas fitosanitarias para prevenir la diseminación en el territorio nacional de la enfermedad conocida como Moko del plátano y banano, ocasionada por la bacteria Ralstonia solanacearum Filotipo II secuevares 3, 4 y 6. (Resolución N0.092770). https://www.ica.gov.co/normatividad/normas-ica/resoluciones-oficinas-nacionales/2021/2021r92770

Jaroszuk-Ściseł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., & Janusz, G. (2019). Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. International journal of molecular sciences, 20(19), 4923. https://doi-org.udea.lookproxy.com/10.3390/ijms20194923

Katoch, M., Paul, A., Singh, G., & Sridhar, S. N. C. (2017). Fungal endophytes associated with Viola odorata Linn. as bioresource for pancreatic lipase inhibitors. BMC Complementary And Alternative Medicine, 17(1). https://doi.org/10.1186/s12906-017-1893-y

Khan, M., & Tanaka, K. (2023). *Purpureocillium lilacinum* for plant growth promotion and biocontrol against root-knot nematodes infecting eggplant. PloS one, 18(3), e0283550. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283550

Kiewnick, S., & Sikora, R. (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Biological Control, 38(2), 179-187. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.006

Kos, K., & Celar, F. A. (2012). Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. to selected herbicides. Pest Management Science, 69(6), 717-721. https://doi.org/10.1002/ps.3427

Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., … Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome biology, 12(4), R40. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40

Kumar, P., Kamle, M., Borah, R., Mahato, D. K., & Sharma, B. (2021). *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. Egyptian Journal Of Biological Pest Control, 31(1). https://doi.org/10.1186/s41938-021-00440-3

Kwon, H. T., Lee, Y., Kim, J., Balaraju, K., Kim, H. T., & Jeon, Y. (2022). Identification and Characterization of *Bacillus tequilensis* GYUN-300: An Antagonistic Bacterium Against Red Pepper Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum* in Korea. Frontiers in microbiology, 13, 826827. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.826827

Lee, S. M., Lee, J. J., Kim, H., & Choi, G. J. (2024). Differential Resistance of Radish Cultivars against Bacterial Soft Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum. The Plant Pathology Journal, 40(2), 151-159. https://doi.org/10.5423/ppj.oa.01.2024.0011

Liang, Z., Sun, X., Guo, R., Wang, H., Tian, Y., Wang, Y., Liu, Y., & Liu, S. (2024). Association between glyphosate exposure and osteoarthritis in US adults: Especially in people who are obese and inactive in leisure time physical activity. The Science of the total environment, 927, 172008. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172008

Ma, X., Hu, J., Ding, C., Portieles, R., Xu, H., Gao, J., Du, L., Gao, X., Yue, Q., Zhao, L., & Borrás-Hidalgo, O. (2023). New native *Bacillus thuringiensis* strains induce high insecticidal action against *Culex pipiens* pallens larvae and adults. BMC microbiology, 23(1), 100. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02842-9

Mallick, T., Mishra, R., Mohanty, S., & Joshi, R. K. (2022). Genome Wide Analysis of the Potato Soft Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum* Strain ICMP 5702 to Predict Novel Insights into Its Genetic Features. The plant pathology journal, 38(2), 102–114.https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2021.0190

Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(11). doi:10.1007/s11274-016-2131-3

Nguyen, T. T. T., & Lee, H. B. (2023). A New Species and Five New Records of *Talaromyces* (Eurotiales, Aspergillaceae) Belonging to Section Talaromyces in Korea. Mycobiology, 51(5), 320–332. https://doi.org/10.1080/12298093.2023.2265645

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO. (2020). Prevenir y anticipar enfermedades y plagas de animales y plantas con grandes repercusiones y hacerles frente. [Archivo PDF] https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/e15785c2-de93-4bcd-bf15-3bd42a63df0b/content

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico-OCDE (2021), Elaborar mejores políticas para los sistemas alimentarios, Publicaciones de la OCDE. París, https://doi.org/10.1787/ddfba4de-en

Perea Soto, J. M., García Estrada, R. S., Allende Molar, R., Carrillo Fasio, J. A., León Félix, J., Valdez Torres, B., & López Soto, F. S. (2011). Identificación de Razas y Biovares de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Plantas de Tomate. Revista Mexicana de Fitopatología, 29(2), 98-108.

Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G., & Fox, R. T. V. (2000). Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. Plant Pathology, 49(4), 403-413. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00480.x

Ramírez, M., Moncada, R. N., Villegas-Escobar, V., Jackson, R. W., & Ramírez, C. A. (2019). Phylogenetic and pathogenic variability of strains of *Ralstonia solanacearum* causing moko disease in Colombia. Plant Pathology, 69(2), 360-369. https://doi.org/10.1111/ppa.13121

Ramírez, M., Neuman, B. W., & Ramírez, C. A. (2020). Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of

banana. Biological Control, 149, 104238. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104238

Sieiro, C., Areal-Hermida, L., Pichardo-Gallardo, Á., Almuiña-González, R., de Miguel, T., Sánchez, S., Sánchez-Pérez, Á., & Villa, T. G. (2020). A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture?. Antibiotics (Basel, Switzerland), 9(8), 493. https://doi.org/10.3390/antibiotics9080493

Skidmore, M. E., Sims, K. M., & Gibbs, H. K. (2023). Agricultural intensification and childhood cancer in Brazil. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 120(45). https://doi.org/10.1073/pnas.2306003120

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. International Journal Of Molecular Sciences, 23(4), 2329. https://doi.org/10.3390/ijms23042329

Valero-Jiménez, C. A., Debets, A. J., Van Kan, J. A., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J., & Koenraadt, C. J. (2014). Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. Malaria Journal, 13(1). https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-479

Wang, R., Li, H., Qin, Z., Wang, Y., Yang, Q., Zhang, H., & Li, M. (2023). Antifungal activity and application of *Bacillus tequilensis* A13 in biocontrol of *Rehmannia glutinosa* root-rot disease. Chemical And Biological Technologies In Agriculture, 10(1). https://doi.org/10.1186/s40538-023-00390-y

Wang, X., Tang, J., Dang, W., Xie, Z., Zhang, F., Hao, X., Sun, S., Liu, X., Luo, Y., Li, M., Gu, Y., Wang, Y., Chen, Q., Shen, X., & Xu, L. (2023). Isolation and Characterization of Three *Pseudomonas aeruginosa* Viruses with Therapeutic Potential. Microbiology Spectrum, 11(3). https://doi.org/10.1128/spectrum.04636-22

Wei, Z., Huang, J., Tan, S., Mei, X., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The congeneric strain Ralstonia pickettii QL-A6 of *Ralstonia solanacearum* as an effective biocontrol agent for bacterial wilt of tomato. Biological Control, 65(2), 278-285. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.12.010

Yousefvand, M., Harighi, B., & Azizi, A. (2023). Volatile compounds produced by endophytic bacteria adversely affect the virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. Biological Control, 178, 105145. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105145

Zhang, F., Chen, C., Zhang, F., Gao, L., Liu, J., Chen, L., Fan, X., Liu, C., Zhang, K., He, Y., Chen, C., & Ji, X. (2017). *Trichoderma harzianum* containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and chitinase improved growth and

diminished adverse effect caused by Fusarium oxysporum in soybean. Journal of plant physiology, 210, 84–94.https://doi-org.udea.lookproxy.com/10.1016/j.jplph.2016.10.012