

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS A BASE DE *Bacillus* sp. PARA
CONTROLAR *Alternaria* spp. EN EL CULTIVO DE *Brassica oleracea* var.
*italica***

AUTORAS:

LEIDY ANDRINA COLLAGUAZO YÉPEZ

ESTEFANY MICHELLE TENORIO MOYA

TUTOR:

RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito, febrero del 2018

Cesión de derechos de Autor

Nosotros, Leidy Andrina Collaguazo Yépez con documento de identificación N° 1002987731 y Estefany Michelle Tenorio Moya con documento de identificación N°1720494804, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "Elaboración de biopreparados a base de *Bacillus* sp. para controlar *Alternaria* spp. en el cultivo de *Brassica oleracea* var. *italica*", el mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana



.....

Leidy Andrina Collaguazo Yépez

1002987731



.....

Estefany Michelle Tenorio Moya

1720494804

Quito, enero de 2018

Declaratorio de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS A BASE DE *Bacillus* sp. PARA CONTROLAR *Alternaria spp.* EN EL CULTIVO DE *Brassica oleracea* var. *italica*” realizado por Leidy Andrina Collaguazo Yépez y Estefany Michelle Tenorio Moya obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, enero de 2018

(f).....

Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásconez MSc.

C.I: 1714819495

Dedicatoria

A Dios, por cada bendición prestada.

A mis padres Miguel y Lucía, mi apoyo y fortaleza.

A mis hermanos por su confianza y apoyo absoluto.

A mis sobrinos, por brindarme sonrisas y un cariño sincero.

A Cristian por ser mi compañero incondicional.

Leidy Collaguazo

A Dios por bendecirme cada día.

A mis padres Margarita y Fernando por siempre apoyarme y alentarme a salir
adelante.

A mi hermano Edison por ser mi ejemplo y apoyo en todo momento.

Al amor de mi vida por ser mi mejor amigo y compañero, por siempre apoyarme y
confiar en mí.

Michelle Tenorio

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos una educación de excelencia que nos lleva a ser profesionales responsables y comprometidas con nuestras actividades.

A nuestros amigos Andre, Lili, Diego, Byron, por brindarnos su apoyo y colaboración incondicional en todo momento.

A nuestro estimado Tutor MSc. Daniel Acurio, por permitirnos formar parte de su proyecto, por impartir sus conocimientos, brindarnos su paciencia, energía, asesoría y dedicación para llegar a término la investigación.

A la familia Acurio Vásconez, por regalarnos su acogida y tiempo.

Al Centro de Investigación y Valoración de Biodiversidad y sus ayudantes que nos supieron brindar su apoyo dentro del laboratorio.

Índice de Contenido

Capítulo 1	3
1. Marco Teórico	3
1.1 Generalidades del brócoli (<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>italica</i>)	3
1.2 Cultivo del brócoli en Ecuador.....	4
1.3 Problemas fitosanitarios causados por hongos en el cultivo de brócoli	4
1.3.1 Mildiu (<i>Peronospora brassicae</i>).....	4
1.3.2 Lancha o tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>)	5
1.3.3 Hernia o potra de la col (<i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor).....	5
1.3.4 <i>Fusarium</i> spp.	6
1.3.5 <i>Alternaria</i> spp.	6
1.3.5.1 Sintomatología de <i>Alternaria</i> spp. en brócoli	6
1.3.5.2 Ciclo de la Enfermedad.....	6
1.4 Control fitosanitario	7
1.5 Control biológico de <i>Alternaria</i> spp.....	8
1.6 <i>Bacillus</i> sp.	9
1.6.1 Taxonomía	9
1.6.2 Características y generalidades macro y microscópicas	9
1.6.3 Factores físico-químicos que influyen en el crecimiento bacteriano.....	9
1.6.4 Antibiosis y metabolitos	11
1.7 Producción de <i>Bacillus</i>	14
1.7.1 Biopreparados	14
1.7.2 Fermentación en estado sólido.....	14

1.7.3 Fermentación en estado líquido	15
1.7.4 Producción de bajo costo	15
1.8 Eficiencia cuántica del fotosistema II.....	15
1.9 DCA.....	16
1.10 ANOVA.....	16
1.11 Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)	17
1.12 Prueba de Post Hoc Tukey	17
1.13 Escala Horsfall and Barratt.....	17
Capítulo 2.....	18
2. Metodología	18
2.1. Microorganismo antagonista y patógeno.	18
2.2. Caracterización del crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.....	18
2.2.1. Preparación de inóculo.....	18
2.2.2. Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.	19
2.3. Optimización de medios de cultivo de bajo costo para la producción de <i>Bacillus</i> sp. cepa IB6.	19
2.3.1 Fermentación en estado líquido (LF).....	19
2.3.2. Fermentación en estado sólido (SSF).	20
2.3.3. Producción de células totales.....	21
2.3.4. Tinción de células y endosporas bacterianas	21
2.3.5. Evaluación de los medios resultantes de la fermentación en estado líquido y sólido.....	22

2.4. Ensayo de efectividad de los biopreparados líquidos y sólidos en cultivo de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	22
2.4.1. Localización del ensayo.....	22
2.4.2. Preparación del terreno, parcelas y siembra de brócoli	23
2.4.3. Diseño o esquema en campo.....	23
2.4.4. Aplicación de tratamientos	24
2.4.5. Evaluación de la enfermedad.....	25
2.4.6. Análisis estadístico	27
Capítulo 3.....	28
3. Resultados y discusión	28
3.1. Caracterización del crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. IB6.....	28
3.2. Optimización de medios de cultivo	28
3.2.1. Biopreparados obtenidos mediante LF	28
3.2.2. Biopreparados obtenidos mediante SSF	30
3.3. Control de pureza de los cultivos.	34
3.4. Evaluación en campo.....	35
3.4.1 Análisis del área bajo la curva para el progreso de la enfermedad ABCPE para la variable número de lesiones en hojas.....	35
3.4.1.1 Número de lesiones en el área bajo la curva para el progreso de la enfermedad ABCPE, prueba de Tukey al 5 %	35
3.4.1.2 Curva de progreso de la enfermedad (CPE) para el variable número de lesiones.....	37
3.4.2. Análisis de la variación de la eficiencia cuántica del fotosistema II	38
3.4.2.1 Gráfica de la variación de la Eficiencia cuántica del fotosistema II ...	39

3.4.3 Porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha	40
3.4.3.1 Porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha para tratamientos, Prueba de Tukey al 5 %	40
3.4.4 Porcentaje índice de la enfermedad en hojas	42
3.4.4.1 Porcentaje índice de la enfermedad en hojas para tratamientos, Prueba de Tukey al 5 %	43
Conclusiones	46
Recomendaciones	47
Referencias Bibliográficas	48
Anexos	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía del Género <i>Bacillus</i> sp.	9
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo líquidos para la producción de biomasa bacteriana.	20
Tabla 3. Composición de los Sustratos sólidos para la producción de biomasa bacteriana.	21
Tabla 4. Características geográficas y ambientales del lugar de ensayo.....	22
Tabla 5. Actividades dentro del cultivo antes y durante el ensayo.	23
Tabla 6. Esquema de ANOVA.....	24
Tabla 7. Descripción de los tratamientos aplicados en campo.....	25
Tabla 8. Concentración de biomasa de <i>Bacillus</i> sp. en los diferentes tratamientos de fermentación líquida.....	29
Tabla 9. ANOVA para los tratamientos en fermentación en estado líquido.....	30
Tabla 10. Concentración de biomasa de <i>Bacillus</i> sp. en los diferentes tratamientos de fermentación sólida.	31
Tabla 11. ANOVA para los tratamientos en fermentación en estado sólido.	32
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable número de lesiones en hojas en el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE (SC tipo III)	35
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable eficiencia cuántica del fotosistema II (SC tipo III).....	38
Tabla 14. ANOVA para la variable porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha.....	40
Tabla 15. ANOVA para la variable porcentaje índice de la enfermedad de las hojas*	42

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución de los tratamientos en campo.....	24
Figura 2. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. de 0 a 72 horas.....	28
Figura 3. Prueba de Tukey al 5 % para tratamientos en fermentación líquida.	30
Figura 4. Prueba de Tukey al 5 % para tratamientos en fermentación sólida.....	32
Figura 5. Observación microscópica de <i>Bacillus</i> sp.	34
Figura 6. Representación del número de lesiones, mediante prueba de Tukey 5 % ..	36
Figura 7. Curva de progreso de la enfermedad para la variable número de lesiones.	37
Figura 8. Gráfica de la variación de la eficiencia cuántica del fotosistema II	39
Figura 9. Porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha para tratamientos, prueba de Tukey al 5 %	41
Figura 10. Porcentaje índice de la enfermedad en hojas para tratamientos, Prueba de Tukey al 5 %	43
Figura 11. Hoja de brócoli, en la postcosecha afectada por <i>Alternaria</i> spp.....	45
Figura 12. Fermentación en incubadora a 35 °C y 100 rpm	64
Figura 13. Fermentación en incubadora a 35 °C.....	64
Figura 14. Metodología para dilución y platingo	65
Figura 15. Dilución y siembra de muestras.....	65
Figura 16. Distribución de tratamientos en campo.	66
Figura 17. Aplicación de tratamientos mediante bomba de mochila.	66
Figura 18. Conteo de lesiones en hojas	67
Figura 19. Determinación de la eficiencia cuántica del fotosistema II.....	67
Figura 20. Cosecha de pellas.....	68
Figura 21. Cámara húmeda de pellas cosechadas	68
Figura 22. Florete de brócoli, en la postcosecha afectada por <i>Alternaria</i> spp.	69

Figura 23. Placas Petri de siembras aleatorias de muestras de floretes con <i>Alternaria</i> spp.	69
Figura 24. Conidios de <i>Alternaria</i> spp. a 40X de muestras de floretes de brócoli, utilizando tinción simple con azul de lactofenol.	69

Índice de Anexos

Anexo 1. Escala Horsfall y Barratt	63
Anexo 2. Fase de Laboratorio	64
Anexo 3. Fase de Laboratorio - Conteo de células totales.....	65
Anexo 4. Fase de campo – Establecimiento del cultivo	66
Anexo 5. Fase de campo - Evaluación de Hojas.....	67
Anexo 6. Fase de campo - Evaluación en pellas.....	68
Anexo 7. Fase de campo - Verificación en el laboratorio de observación en campo de <i>Alternaria</i> spp.	69

Resumen

El control biológico utilizando microorganismos en la actualidad es una herramienta importante en la obtención de alimentos inocuos ya que el consumidor se preocupa de la residualidad de químicos presentes en los productos que ingiere. Se ha aplicado el control biológico a un cultivo de importancia económica como lo es el de brócoli, una hortaliza que es atacada principalmente por *Alternaria* spp. micopatógeno que causa pérdidas significativas al productor.

Dentro de la investigación se realizaron dos fases, en la fase de laboratorio se procedió a masificar a *Bacillus* sp. utilizando medios de cultivo alternativos para elaborar biopreparados líquidos a base de harina de soya, harina de haba y panela, y para los biopreparados sólidos se utilizó sustratos como el salvado de trigo, arroz de cebada, arroz y turba. Al finalizar esta fase el biopreparado líquido a base de harina de haba y panela, y el biopreparado sólido que tuvo como sustrato al salvado de trigo, fueron los tratamientos con mayor concentración bacteriana. En la fase de campo se probaron los dos biopreparados utilizando un DCA para el diseño experimental, se evaluó la variación de la eficiencia cuántica del fotosistema II, sin presentar diferencia significativa para los tratamientos, la severidad en el cultivo utilizando una escala de acuerdo al número de lesiones causadas por el micopatógeno, el porcentaje de afectación del área en hojas, porcentaje de infección en floretes presentándose una diferencia significativa en al menos un tratamiento, determinando así el efecto biocontrolador de *Bacillus* sp. hacia *Alternaria* spp.

Palabras clave: biopreparados, control biológico, micopatógenos

Abstract

Biological control using microorganisms is currently an important tool in obtaining safe food because the consumer worries about the residuals of chemicals present in the products he ingests; Biological control has been applied to an economically important crop such as that of broccoli, a vegetable that is mainly attacked by *Alternaria* spp. this mycopathogen causes significant losses to the producer.

Within the research two phases were carried out, in the laboratory phase it proceeded to mass to *Bacillus* sp. using alternative culture media to develop liquid biopreparations based on soy flour, bean flour and panela, and for solid biopreparations, substrates such as wheat bran, barley rice, rice and peat were used. At the end of this phase, the liquid biopreparation based on bean flour and panela, and the solid biopreparation that had as a substrate to the wheat bran, were the treatments with the highest bacterial concentration. In the field phase the two biopreparados were tested using a DCA for the experimental design, the variation of the quantum efficiency of photosystem II was evaluated, without presenting significant difference for the treatments, the severity in the cultivation using a scale according to the number of lesions caused by the mycopathogen, the percentage of affectation of the area in leaves, percentage of infection in foils presenting a significant difference in at least one treatment, thus determining the effect biocontroller of *Bacillus* sp. to *Alternaria* spp.

Key words: bioprepared, biological control, mycopathogens.

Introducción

La presencia de plagas y enfermedades son una limitante dentro de la producción del brócoli. El monocultivo, el uso intensivo y mal dosificado de fertilizantes sintéticos, el abuso de agroquímicos y las condiciones climáticas han favorecido la persistencia de ciertas enfermedades, entre las principales está la “mancha negra” producida por el hongo *Alternaria* spp. El efecto de esta enfermedad se lo encuentra en la pella, donde causa pudriciones tan severas que han llegado en algunos casos a afectar hasta el 100 % de la misma (Cadena, 2011).

Una opción para combatir el ataque de esta enfermedad es mediante el aprovechamiento del potencial biocontrolador que tienen *Bacillus* sp., estos microorganismos producen una gama de sustancias bioactivas que muestran propiedades antifúngicas, junto a una baja toxicidad y alta biodegradabilidad de las mismas (Villa, Alfonso, Rivero, & González, 2007).

Por esta razón la producción y un manejo de cultivos mediante estrategias alternativas para reducir o sustituir la aplicación de productos químicos sintéticos han adquirido gran importancia en especial en cultivos que son de exportación cuyos mercados son mucho más exigentes y buscan alimentos seguros e inocuos, al mismo tiempo se contribuye a la conservación de recursos naturales evitando-la contaminación del suelo y agua, con residuos químicos provenientes de pesticidas.

El género *Bacillus* contiene una diversidad de especies distribuidas en la naturaleza. Durante muchos años se ha estudiado este género en diferentes campos de aplicación, siendo uno de ellos la producción de antibióticos y antifúngicos, que al ser producidos *in vitro* son causantes de control biológico ya que existen cepas idóneas para eliminar fitopatologías causadas por hongos (Castillo, Sosa, & Scorza, 2004).

En este campo Yáñez Mendizábal (2012), evaluó los aspectos clave para el desarrollo de una cepa de *Bacillus*, realizando un análisis detallado de aspectos relacionados con la caracterización morfológica, bioquímica; su producción de endosporas y sustancias antifúngicas para lo cual utilizó herramientas de análisis químico, molecular y biológico, desarrollando además un medio de cultivo de bajo costo que proporcionó elevados crecimientos y mantuvo la eficacia biocontroladora.

En la misma área Castellanos y otros (2005), realizaron un estudio de *Bacillus* obteniendo una formulación de un medio de cultivo económico y demostrando su capacidad de inhibición del crecimiento micelial en más de 20 especies de hongos de importancia económica, dejando claro su capacidad biocontroladora.

Ñacato & Valencia (2016) en su investigación utilizaron diferentes cepas autóctonas de *Bacillus* para el control de *Alternaria* spp., caracterizando las cepas y midiendo su capacidad antagónica y con ello determinando el potencial como controladores biológicos.

Caicedo & Chacón (2017) evaluaron la capacidad antagónica hacia *Alternaria* spp. de cepas de *Bacillus* en la postcosecha de brócoli en pruebas de invernadero tomando como parámetro el porcentaje de severidad en las pellas cosechadas.

Por todo lo expuesto, mediante la presente investigación se pretende elaborar biopreparados a base de *Bacillus* sp. para controlar *Alternaria* spp. en el cultivo de *Brassica oleracea* var. *italica*, y validar bajo pruebas en campo la capacidad biocontroladora de los biopreparados líquido y sólido que resulten con mayor concentración celular bacteriana.

Capítulo 1

1. Marco Teórico

1.1 Generalidades del brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*)

Los cultivos de coles tienen un origen común en las formas silvestres del grupo *Brassica oleracea*, muchas variedades presentan una diversidad en la forma, con diferentes partes de la planta que se consumen como vegetales. Las variedades con inflorescencias han estado en cultivo durante un tiempo incontable y quedan pocos detalles de cómo se originaron. Una variedad con inflorescencia comestible y precozmente grande es el brócoli (Gray, 1982).

Hortaliza originaria del Mediterráneo y Asia menor. En Italia, Libia y Siria se recolectaron los primeros ejemplares de esta planta proveniente de las coles y las coliflores. Pertenece a la familia de las Crucíferas y al género de *Brassica oleracea* variedad *italica* (Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios, 2011). La planta tiene una forma de hongo, con cabeza redondeada de color verde oscuro, de tallo corto y grueso de color verde claro, con hojas laterales delgadas verdes oscuras en la parte inferior del tallo, en donde posee una cavidad por donde absorbe los nutrientes de la tierra (Linares, 2008).

Presenta raíces ramificadas, profundas, extendiéndose alrededor del tallo de 45 a 60 cm; su tallo es herbáceo, cilíndrico, siendo el principal relativamente grueso, de 20 a 50 cm de alto, sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal, con entrenudos cortos; su inflorescencia primaria está conformada por flores dispuestas en un corimbo principal el mismo que es de color verde a púrpura, según el cultivar. Las flores son de color amarillo sobre inflorescencias racimosas de polinización alógama (Medina, 2015).

1.2 Cultivo del brócoli en Ecuador

Las dos principales hortalizas que se siembran en el Ecuador son el brócoli y el tomate, en términos de área cultivada. En el primer caso se trata de un cultivo principalmente para la exportación (Álvarez, Bravo, & Armendaris, 2014).

La producción anual durante el 2014 de brócoli fue de 113069 toneladas con un incremento de 59.59 % con respecto al 2013, las ventajas climáticas de las provincias que cultivan esta hortaliza promovieron este acrecentamiento conllevando al aumento en las exportaciones, mismas que fueron resultado del aumento de la demanda en países como Rusia y Chile (MAGAP, 2014).

La región andina es ideal para el cultivo de brócoli. Cotopaxi es la primera provincia productora del país con el 68 % de la producción total, a continuación están Pichincha e Imbabura que cultivan entre el 10 al 16 % de la producción nacional. Estas provincias muestran escenarios propicios para el cultivo de brócoli durante todo el año, existiendo variedades consideradas importantes como: Legacy, Marathon, Shogum, Coronado y Domador (Revelo, Ruiz , & Oña, 2009).

1.3 Problemas fitosanitarios causados por hongos en el cultivo de brócoli

Los hongos se propagan de diferentes maneras, pudiendo sobrevivir por años en el suelo, creciendo en restos de cultivos. Las esporas se desarrollan dentro del huésped y fuera del mismo, la humedad y el pH no se relacionan directamente con su crecimiento (Grahame, 2016)

1.3.1 Mildiu (*Peronospora brassicae*)

Se presentan manchas necróticas que abarcan el haz como en el envés de las hojas. Inicialmente se presentan manchas cloróticas, necrosándose con el avance de la

enfermedad. La mancha presenta relieves que son típicos de este patógeno (González, 2012).

Los conidios de *Peronospora* han demostrado una viabilidad perdurable en ambientes variables, su duración se ve afectada en climas fríos y secos a diferencia de los climas cálidos y húmedos que son favorecedores de su viabilidad (Amin, Ali, Muzaffar, Majeed, & Sayeed, 2013).

1.3.2 Mancha o tizón tardío (*Phytophthora infestans*)

Manchas esféricas de color marrón oscuro se producen en el haz y en el envés de las hojas y en el tallo se observa heridas de color negro brillante, de aspecto tenuemente húmedo (Medina, 2015).

Phytophthora comprende especies que pueden sobrevivir por varios años en los suelos y diseminarse cuando la temperatura incrementa, dando lugar a infecciones en diferentes temporadas del año dependiendo de cada especie (Wiesman, 2009).

1.3.3 Hernia o potra de la col (*Plasmodiophora brassicae* Wor)

La infección en plantas se observa con marchitamiento y clorosis de la parte superior, siendo más notoria en horas de mayor energía solar, existiendo la posibilidad de su recuperación durante las horas nocturnas. La enfermedad se manifiesta notoriamente entre la semana cuarta y quinta una vez transcurrido el trasplante, consiguiendo inclusive producir la muerte a la planta (Almachi, 2013).

Especies de este género que infecten cultivos pueden causar pérdidas del 100 % del rendimiento, su ciclo de vida implica dos de sus tres etapas dentro del huésped. Las esporas en reposo en el suelo tienen longevidad estimando un promedio de vida de 3.6 años en el suelo (Björling, 2013).

1.3.4 *Fusarium* spp.

Patógeno que se presenta en el brócoli en almacenamiento a largo plazo a baja temperatura y atmósfera controlada, produce el crecimiento de un micelio esponjoso blanco cubriendo principalmente la inflorescencia (Mercier, Makhoul, & Martin, 1991).

1.3.5 *Alternaria* spp.

Es un hongo fitopatógeno capaz de infectar a la mayoría de brassicas incluyendo muchas especies importantes en agricultura como brócoli, causando marchitamiento de las plantas si las ataca cuando son jóvenes. Los ataques en plantas adultas son menos severos causando manchas en las hojas (Medina, 2015).

1.3.5.1 Sintomatología de *Alternaria* spp. en brócoli

Inicialmente la sintomatología se muestra en hojas viejas y tallos observándose manchas redondas de color amarillo, anillos concéntricos que se alternan en colores de color claro y oscuro. Mientras la enfermedad progresa las hojas cambian a un color café oscuro, es notable alrededor de la lesión un halo amarillo, la lesión se desmorona dejando un orificio. En plántulas la infección puede causar la muerte a causa de la estrangulación que se producen en los tallos, también se manifiesta con un crecimiento lento (Serrato & French, 2011).

1.3.5.2 Ciclo de la Enfermedad

Durante el período de vegetación se extiende por conidios a causa del viento y del agua salpicada (Medina, 2015). La infección se puede manifestar a los 45 días después de la siembra de campo y las esporas del hongo pueden producirse en 7 días y nuevamente comenzar el ciclo de la enfermedad en otras plantas (Caicedo & Chacón, 2017).

Los conidios pueden persistir viables por un período de hasta dos años, una vez que éstos se encuentran en el área vegetal y existen los requerimientos físicos necesarios

de humedad y temperatura, se produce la germinación, (Herrera, 2016). Las plántulas que crecen a partir de semillas enfermas tienen alta probabilidad de ser atacadas en la región del hipocótilo mostrando lesiones oscuras que detiene de a poco el crecimiento (Cadena, 2011).

Los hongos necrotróficos como *Alternaria* spp. absorben nutrientes de los tejidos superiores de sus huéspedes, matan a las células del huésped o lo inducen a una muerte celular programada con toxinas, posterior a ello descomponen los tejidos muertos con diferentes enzimas activas que degradan la pared celular, las pectinas y los xilanos son componentes clave de la pared celular, son reservorios de azúcares, que pueden ser desbloqueados por enzimas hidrolíticas producidas por microorganismos patógenos (Cho, 2015).

1.4 Control fitosanitario

El uso de semillas certificadas, la eliminación de residuos de cosecha, la rotación de cultivos, el incremento de monitoreo en temporadas lluviosas, la exclusión de riego durante las horas de mayor radiación solar, el uso de productos químicos, representan un conjunto de prácticas de manejo integrado para esta enfermedad (ICA, 2012).

En el cultivo de brócoli se reporta diferentes plaguicidas utilizados, los organofosforados, carbamatos, piretroides, ditiocarbamatos, triazoles, en muchos casos son calificados como altamente tóxicos (Pazmiño, y otros, 2015).

Alternaria spp. es un micopatógeno que provoca pérdidas económicas significativas en los cultivos agrícolas, dentro de los controles químicos más utilizados y con mayor efectividad en el control y eliminación de estos microorganismos se encuentran: Cimoxanilo, Folpet, Fosetil aluminio, Oxiclورو de cobre, Mancozeb, estos productos pueden ser aplicados durante el cultivo o previo a la siembra en las semillas (Herrera, 2016).

La biotecnología ha planteado opciones con el propósito de sustituir los productos químicos. Estas opciones presentan productos que tienen diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas que son apropiadas para el incremento en la productividad, y mejoramiento en la resistencia a enfermedades (Corrales, Sánchez, Arévalo, & Moreno, 2014).

1.5 Control biológico de *Alternaria* spp.

El control de hongos fitopatógenos requiere de aplicar técnicas alternativas, el manejo tradicional con agroquímicos sintéticos ha ocasionado diversos problemas como la toxicidad a los usuarios, interrupción de exportaciones por residuos en producto de consumo y daños al medio ambiente, así como afectación de organismos benéficos (Guerrero, y otros, 2007). Adicional a los efectos que ocasionan en las plantas, los hongos de este género logran desenvolverse como alérgenos, oportunistas en pacientes con el sistema inmunológico comprometido, con las circunstancias propicias generan metabolitos secundarios tóxicos con potencial mutagénico y teratogénico, relacionados directamente con varios tipos de cáncer (Siciliano, Ortu, Gilardi, Gullino, & Garibaldi, 2015).

Actualmente se prefiere en la agricultura el uso de prácticas más ecológicas como el control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas, los cuales pueden limitar la iniciación y propagación de las enfermedades causadas por patógenos vegetales mediante mecanismos de competencia, antibiosis, inducción de resistencia, entre otros. Los microorganismos concernientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus*, se hallan dentro de los microorganismos más estudiados como controladores biológicos. *Bacillus* es un género calificado como referente para el desarrollo de productos biológicos que aplicados en

campo denotan actividad de control de enfermedades de origen fúngico (Reinoso, Vaillant, Casadesús, García, & Pazos, 2007).

1.6 *Bacillus* sp.

1.6.1 Taxonomía

La Tabla 1 presenta la clasificación taxonómica para el género *Bacillus*

Tabla 1. Taxonomía del Género *Bacillus* sp.

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>

Fuente: Uniprot (2016)

1.6.2 Características y generalidades macro y microscópicas

Las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces; se han evaluado estas bacterias para el control de enfermedades fungosas (Fernández, 2001).

Bacillus poseen bordes ligeramente irregulares, aplanados de color blanco, ya sea este opaco o brillante, su consistencia es diversa puede presentarse seca, harinosa o mucosa (Larrea, Falconi, & Arcos, 2015).

1.6.3 Factores físico-químicos que influyen en el crecimiento bacteriano

- **Temperatura:** El género *Bacillus* sp. se adapta a diferentes cambios de temperatura, para ello cuentan con genes de shock térmico inducibles dentro de los cuales se incluyen a proteínas chaperonas y proteasas, este tipo de

metabolismo les ha permitido proliferarse con éxito en la rizósfera (Calvo & Zúñiga, 2010). *Bacillus* sp. presenta diferentes grupos de acuerdo a la temperatura de crecimiento, así se tienen microorganismos termófilos, termótrofos, mesófilos, psicótrofos y psicófilos. Son formadores de endosporas resistentes a cambios adversos de temperatura; en temperaturas bajas el crecimiento de las bacterias es tardado, sin embargo esto promueve modificaciones estructurales que les ha permitido proliferarse en condiciones distintas, la temperatura óptima de crecimiento de varias especies de *Bacillus* está entre 25 y 37 °C (Calvo & Zúñiga, 2010; Yáñez Mendizábal, 2012).

Existen otros factores que ejercen influencia sobre la termorresistencia de las esporas bacterianas que esta especie presenta, como la concentración de varios cationes, la edad del cultivo y la presencia de etanol en los medios que se cultivan (Cerutti, 2001).

- **pH:** Puede desarrollarse en diversas unidades logarítmicas de pH ambiental entretanto el pH citoplasmático se mantenga dentro de un rango limitadamente pequeño que favorezca la preservación de la estabilidad de las proteínas y los ácidos nucleicos. La homeostasis citoplasmática ha sido objeto de estudio, el rango de pH citoplasmático está entre 7.4 a 7.6 mientras se da el crecimiento vegetativo, un pH bajo promueve la germinación de esporas y que empiece el desarrollo vegetativo (Wilks, y otros, 2008).

Estudios realizados por Van Beilen & Brul (2013) demostraron que el pH decrece al inicio de la fase exponencial, haciendo referencia a la presencia de preesporas que requieren de un pH que cae en un rango de 6.0-6.4, las esporas que permanecen metabólicamente latentes se reportan en un pH de 6.0 ± 0.3 y para la germinación de estas esporas se requiere de un pH de 6.4.

- **Humedad:** La humedad relativa del entorno de los microorganismos está directamente relacionada con su actividad de agua, todos los microorganismos requieren de agua, si las condiciones no son favorables para su desarrollo pueden permanecer en estado de latencia. La humedad relativa es un factor que en los microorganismos determina su desarrollo, muerte o deshidratación (Yáñez Mendizábal, 2012).
- **Potencial redox:** Se refiere a la capacidad de una molécula de donar o aceptar electrones, cada organelo posee su propio equilibrio redox, se utiliza para el control en cultivos anaerobios para diferenciar los diversos eventos metabólicos en los microorganismos (Zúñiga & Palomares, 2016). Para la mayoría de los medios de cultivo en contacto con el aire, el potencial de oxidación reducción es de +0.2 a +0.4V, a pH 7 (Varela & Grotiuz, 2008).

1.6.4 Antibiosis y metabolitos

Se ha reportado a *Bacillus* sp. como controlador biológico, antagonista de otros microorganismos. El género se presenta como productor de péptidos de interés en el control biológico, dentro de los cuales se encuentran a las micobacillinas, iturinas, surfactinas, fungistatinas, subporinas y fengicinas. Su inhibición se reporta con halos de 26 ± 0.3 mm (Ragazzo, Robles, Lomelí, Luna, & Calderón, 2011).

Los lipopéptidos, fosfolípidos y péptidos que producen estos microorganismos pueden o no ser sintetizados en el ribosoma. Entre las moléculas que no se producen en el ribosoma se encuentran la Surfactina, Iturina y Fengicina, éstas se producen después del crecimiento bacteriano en contraste con la síntesis de moléculas en el ribosoma que lo hacen en el crecimiento activo de las bacterias. Se suman otras características que puede hacer posible la eficacia de su acción con amplio espectro, resistencia a altas temperaturas y diferentes variaciones de pH, resistencia a la hidrólisis por peptidasas

y proteasas. Se estima que su genoma presenta alrededor del 4-5 % con genes encargados de la producción de antibióticos (Cobo, 2017).

- **Surfactina:** Fue identificada por primera vez como un inhibidor del coágulo de fibrina, de igual forma presenta funciones antimicrobianas, antitumorales y antivirales, obstruye la unión de las células a las superficies evitando el desarrollo de biopelículas de otras bacterias (Ariza & Sánchez, 2012).

La surfactina es clasificada como un lipopéptido macrólido, cíclico con un peso molecular de 1050 kDa, en su estructura se encuentra un β -amino ácido graso ligado a una lactona a través de un puente de amida en el residuo de glutamato y de un ligando éster en el residuo de *D*-Leu. La parte hidrofóbica se compone de una cadena de carbonos y la parte hidrofílica se compone de una cadena de aminoácidos de Glu-Le-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, que se disponen en forma de un anillo similar a la lactona (Portella, 2006).

Se ha reportado que la surfactina muestra actividad inhibitoria contra el crecimiento y desarrollo de hongos, bacterias, virus y micoplasmas patógenos, y se informa que puede presentarse como un compuesto antibacteriano primario además juega papel importante en la formación de biopelículas, motilidad, colonización en tejidos de plantas hospedadoras (Fan, y otros, 2017).

- **Iturina:** Las iturinas incluyen varios compuestos antifúngicos, como la bacillomicina y micosubtilina; las moléculas de este grupo inhiben la germinación de esporas de una variedad de hongos, sin inhibir notoriamente el crecimiento de bacterias (Klinch, Lax, & Bland, 1991).

Las iturinas constan de dos partes, una parte del péptido compuesta por 7 residuos de aminoácidos y la otra por 11-12 carbonos de cola hidrófoba, este

tipo de estructura es de carácter anfifílico lo que refiere como su sitio más probable de acción a las membranas celulares. Son lipopéptidos cíclicos de 7 aminoácidos que se unen a una cadena ácido graso que pueden presentarse entre los carbonos 14 a 17 (Khem & Shamsheer, 2015).

La Iturina A es el lipopéptido más estudiado del género *Bacillus*. Es un lipopéptido cíclico antifúngico, que ha demostrado actividad antifúngica significativa contra fitopatógenos, induciendo respuesta de defensa y disminuyendo la severidad de la enfermedad (Zohora, Ano, & Rahman, 2016). Muchas de las propiedades bioactivas que presenta la molécula para alterar estructuras y funciones de las membranas biológicas se encuentra relacionado con su concentración, de ahí que se considera que la Iturina A es un biosurfactante menos potente que la surfactina (Bernat, y otros, 2016).

- **Fengicina:** Polipéptidos cíclicos biológicamente activos. La porción peptídica de la molécula consiste en una cadena deca péptida, de los cuales 8 aminoácidos forman el anillo peptídico a través del enlace lactona entre el grupo –OH fenólico de la cadena lateral del grupo Tyr3 y –COOH de Ile 10 y la porción lipídica consiste en un ácido graso β -hidroxi, con su amida del grupo –COOH unida a α -NH₂ de Glu1. Las fengicinas exhiben heterogeneidad en la sexta posición del péptido, así como en la longitud de la cadena de β -OH que tiene entre 14-18 carbonos. Las variaciones en la sexta posición de un solo aminoácido dividen a las fengicinas en A y B (Pathak, 2011).

La fengicina presenta actividad antifúngica contra hongos filamentosos, estas moléculas exhiben actividad de control biológico. El potencial mecanismo para el control biológico de micopatógenos es que la fengicina interactúa con las

moléculas de esterol y fosfolípidos en las membranas cambiando la estructura permeable de la membrana fúngica (Fan, Ru, Zhang, Wang, & Li, 2017).

1.7 Producción de *Bacillus*

La mayor parte de las fermentaciones bacterianas se realizan en fase líquida, sin embargo, el uso de fermentaciones en estado sólido presenta la ventaja del costo medio. Ciertos microorganismos bacterianos solo esporulan cuando se cultivan en sustratos sólidos (Adams, Eiteman, & Hanel, 2002).

1.7.1 Biopreparados

Los biopreparados son sustancias o una composición de varias de ellas, que se obtienen a base de materia prima simple, de origen vegetal, animal o mineral junto a organismos benéficos o enemigos naturales de las plagas presentes en la naturaleza, al emplearse en plantas y cultivos optimizan la prevención y control de plagas y enfermedades (FAO, 2010).

1.7.2 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido ha sido considerablemente utilizada en la industria durante las últimas tres décadas. Existen algunos inconvenientes en este sistema como: problema de aumento de escala, requisitos más altos para el proceso de control, indisponibilidad de protocolos analíticos directos para establecer la biomasa directamente en el sustrato y circunstancias de fermentación heterogéneas. Si se consigue alcanzar las condiciones de crecimiento en los sustratos y se resuelven los problemas relacionados con la fermentación en estado sólido podría recurrirse a este procedimiento de manera efectiva para producir crecimiento bacteriano (Kapilan, 2015).

La fermentación en estado sólido proporciona un entorno natural para la producción de microorganismos con valor agregado, el proceso se ha visto limitado a la producción de hongos, sin embargo se ha demostrado que la producción de bacterias en este tipo de sustratos es posible (Pavithra, y otros, 2014).

1.7.3 Fermentación en estado líquido

Un medio de cultivo líquido es empleado para cultivar, transportar y almacenar microorganismos; en este tipo de cultivos se puede relacionar que la reserva de metabolitos de tipo antibiótico previene la descomposición del medio, operando como conservante de origen natural (Castillo K. , 2013).

1.7.4 Producción de bajo costo

Existen sustratos que ofrecen los parámetros necesarios de energía, carbono, nitrógeno y azufre que los microorganismos requieren para alcanzar valores de alta producción, además pueden proporcionar aminoácidos, oligoelementos, vitaminas y factores de crecimiento orgánicos, para que cumplan todos esos requisitos los sustratos tiene costos elevados. Para que puedan ser usados en escala industrial, es necesario que se manejen alternativas con productos de desecho de diferentes industrias que pueden ser usadas como sustratos que cubren los nutrientes necesarios y con costos inferiores. Se han llevado a cabo producciones utilizando melaza y soya, por sus altos contenidos de fuente de carbono y nitrógeno en medios de forma artesanal (Yáñez Mendizábal, 2012; Gallardo, 2015).

1.8 Eficiencia cuántica del fotosistema II

Relaciona al número de moles de dióxido de carbono adheridos por un mol de cuanto de luz absorbida por la hoja, resultando en hojas con mayor eficiencia cuántica a mayor absorbancia a diferencia de una con menor absorbancia. En condiciones libres de

estrés, esta eficiencia es constante en las plantas con las mismas condiciones de crecimiento (Vilella, 1987).

La eficiencia cuántica resulta de F_v/F_m . El primero es el valor resultante de la fluorescencia máxima cuando los centros de reacción de la fotosíntesis se hallan cerrados; el segundo es la fluorescencia variable que es un valor resultado de la diferencia entre la fluorescencia mínima (centros de reacción abiertos) y la fluorescencia máxima (Delgadillo, Montenegro, Pinilla, & Melgarejo, 2017).

1.9 DCA

Un diseño completamente al azar (DCA) es usado para establecer tratamientos ubicados espacialmente al azar. En cualquier ensayo de investigación es probable la presencia de una fuente de variación que puede alterar los resultados, al conocer esta fuente se la puede controlar y así minimizar el error experimental (Martínez & Meza, 2013).

1.10 ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) es un método estadístico afín con la comparación de medias de varias muestras. Tiene como fin examinar las diferencias significativas existentes en las medias de las clases (Ostertagova & Ostertag, 2013).

Un análisis de varianza se caracteriza por su dirección hacia un conjunto específico de pruebas estadísticas a través de diferentes condiciones, que se encuentran enfocadas en probar los efectos principales de cada factor y las interacciones entre los mismos (Henson, 2015).

1.11 Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

El cálculo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad se emplea como una medida de la resistencia cuantitativa a la enfermedad, para ello se requiere de valoraciones periódicas de la enfermedad (Jeger & Viljanen-Rollinson, 2001).

1.12 Prueba de Post Hoc Tukey

Involucra manejar otra distribución de probabilidad llamada distribución de rango estudentizado creando intervalos de confianza, para disminuir la tasa de error, el método ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que se especifique en el ensayo (Minitab Inc, 2017).

1.13 Escala Horsfall and Barratt

El uso de claves descriptivas para la evaluación de la gravedad en fitopatologías, están dadas de acuerdo con mediciones de la enfermedad en una escala de puntuación de 1-12, en donde uno es el valor inferior que refiere a la ausencia de síntomas de la enfermedad y doce a un máximo de 100 % de área enferma. El uso de estas claves permite dar a conocer un progreso temporal de la enfermedad y un índice de la enfermedad (Ver Anexo 1) (Saharan, Mehta, & Meena, 2015).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1. Microorganismo antagonista y patógeno.

Para este estudio se utilizó la cepa aislada de *Bacillus* sp. IB6, este microorganismo proviene de zonas productoras de brócoli en la provincia de Imbabura. Ñacato & Valencia, (2016) demostraron la capacidad antagónica de la cepa IB6 frente a *Alternaria* spp. mediante pruebas *in vitro*. Además Caicedo & Chacón (2017) verificaron el antagonismo de *Bacillus* sp. en pruebas bajo invernadero para controlar *Alternaria* spp. en el cultivo de brócoli.

El microorganismo antagonista se mantiene conservado en criocongelación a -80 °C en el banco de cepas del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana.

Los aislados del patógeno *Alternaria* spp. fueron obtenidos a partir de muestras vegetales originarias del cultivo de brócoli en la provincia de Tungurahua, se mantuvieron cultivados en PDA (39 g.L⁻¹; almidón de papa, agar y dextrosa) y en refrigeración a 4 °C.

2.2. Caracterización del crecimiento de *Bacillus* sp.

2.2.1. Preparación de inóculo

Se utilizó cajas Petri con Agar nutriente (24 g.L⁻¹; peptona, extracto de carne, cloruro de sodio, agar) donde se realizó siembra por estrías de la cepa crioconservada, se incubó por 24 horas a 35 °C. A continuación se preparó la suspensión bacteriana, transfiriendo biomasa fresca a una solución tampón fosfato salina estéril (PBS; 70 mL de KH₂PO₄ 0.2 M, 30 mL de K₂HPO₄ 0.2 M y 300 mL de agua desionizada, V/V/V, pH 6.5).

2.2.2. Crecimiento de *Bacillus* sp.

El crecimiento del microorganismo fue caracterizado mediante el estudio de la cinética de la bacteria en función del tiempo, para esto se determinó la variación de las concentraciones de la bacteria en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC.mL⁻¹) durante su crecimiento en el medio líquido comercial TSB (17 g.L⁻¹, peptona de caseína, peptona de harina de soya, cloruro de sodio, hidrógeno fosfato dipotásico, glucosa).

El estudio constó de cuatro repeticiones en donde cada unidad experimental estuvo conformado de un Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL TSB, los cuales fueron inocuados con la suspensión bacteriana antes mencionada, a una concentración de 10⁵ UFC mL⁻¹, se incubaron por 72 horas a 30 °C y 100 rpm. Para la cuantificación de la concentración bacteriana se tomaron muestras y se realizaron diluciones seriadas en PBS y plateo en medio agar nutriente, desde las 0 a 72 horas. Las cajas Petri con agar nutriente fueron incubadas por 24 horas a 35 °C.

2.3. Optimización de medios de cultivo de bajo costo para la producción de *Bacillus* sp. cepa IB6.

2.3.1 Fermentación en estado líquido (LF)

Se diseñaron medios de cultivo cuyos componentes son de bajo costo, esto en base a resultados y evaluaciones realizadas por Gallardo (2015). Para la fermentación en estado líquido, el crecimiento de *Bacillus* sp. en el medio comercial TSB fue comparado con el crecimiento en los medios de bajo costo descritos a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo líquidos para la producción de biomasa bacteriana.

Tratamientos	Fuente de Nitrógeno	g.L ⁻¹	Fuente de Carbono	g.L ⁻¹
T1	Harina de soya + S.S*	45	Panela molida	6
T2	Harina de soya+ S.S*	45	Panela molida	5
T3	Harina de Haba + S.S*	45	Panela molida	6
T4	Harina de Haba + S.S*	45	Panela molida	5
T5	TSB			

* S.S= Stock de sales: 0.45 g.L⁻¹ MgSO₄, 3.6 mg.L⁻¹ MnSO₄, 10 mg.L⁻¹ C₆H₈O₇, 5 g.L⁻¹ NaCl, 1.9 g.L⁻¹ K₂HPO₄

Elaborado por: las autoras, 2018.

Una vez determinados los componentes del medio de cultivo, se realizaron los ensayos en donde cada unidad experimental constó de un matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 mL de capacidad con 100 mL de cada uno de los medios mencionados en la Tabla 2, los cuales fueron inoculados a 10⁵ UFC.mL⁻¹, se incubaron a 35 °C y 100 rpm por 72 horas. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones y se utilizó un diseño completamente al azar. (Ver anexo 2)

2.3.2. Fermentación en estado sólido (SSF).

Para la fermentación en estado sólido se diseñaron sustratos enriquecidos, esto en base a estudios realizado por Zhao, Hu, Huang, Liang, & Zhao (2008) y se propuso alternativas adicionales. Los sustratos elegidos para ser evaluados se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de los Sustratos sólidos para la producción de biomasa bacteriana.

Tratamientos	Sustrato	Fuente de Carbono	g.kg ⁻¹	Fuente de Nitrógeno	g.kg ⁻¹
T1	Salvado de trigo	Panela molida	40	Harina de soya + S.S *	40
T2	Arroz de cebada	Panela molida	40	Harina de soya+ S.S *	40
T3	Turba	Panela molida	40	Harina de soya+ S.S *	40
T4	Arroz	Panela molida	40	Harina de soya+ S.S *	40

* S.S= Stock de sales: 5 g.kg⁻¹CaO, 10 g.kg⁻¹ K₂HPO₄
Elaborado por: las autoras, 2018.

Cada unidad experimental constó de 50 g de cada sustrato enriquecido contenidos en fundas de polipropileno, los sustratos fueron humedecidos y esterilizados a 120 °C y 1 atmósfera de presión por 60 minutos. Una vez realizado este proceso cada sustrato fue inoculado a 10⁵ UFC.mL⁻¹, finalmente se incubaron a 35 °C por 72 horas.

Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones y se utilizó un diseño completamente al azar. (Ver anexo 2).

2.3.3. Producción de células totales

Para determinar las concentraciones en UFC.mL⁻¹ en los medios líquidos y UFC.g⁻¹ en los medios sólidos, se tomó muestras a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Se realizó diluciones seriadas en solución PBS y plateo en cajas Petri con Agar nutriente (Ver anexo 3), las cuales se incubaron por 24 horas a 35 °C para el posterior conteo de colonias.

2.3.4. Tinción de células y endosporas bacterianas

Para verificar la pureza de los cultivos se realizó tinción diferencial Gram y para verificación de endosporas se realizó tinción con verde malaquita, se siguió la

metodología de Schaeffer y Fulton de acuerdo a las indicaciones de Rodríguez, Gamboa, Hernández, & García (n.d.).

2.3.5. Evaluación de los medios resultantes de la fermentación en estado líquido y sólido.

Los datos obtenidos en UFC.mL⁻¹ y UFC.g⁻¹ se transformaron a Log₁₀ para tener uniformidad en la varianza. Los resultados fueron analizados mediante el software libre Infostat versión 2013, se realizó un análisis ANOVA con una prueba Post Hoc de Tukey al 5 %.

2.4. Ensayo de efectividad de los biopreparados líquidos y sólidos en cultivo de *Brassica oleracea* var. *italica*.

2.4.1. Localización del ensayo

El presente ensayo se llevó a cabo en la provincia de Tungurahua. A continuación se describen detalles del lugar.

Tabla 4. Características geográficas y ambientales del lugar de ensayo

Provincia:	Tungurahua
Cantón:	Ambato
Parroquia:	Izamba
Altitud:	2590 m.s.n.m
Coordenadas:	X77034.76815062 Y9864922.60691711
Temperatura Media:	14.6 °C
Humedad Media:	68.57 %

Nota: m.s.n.m=metros sobre el nivel del mar; Coordenadas obtenidas por GPS
Fuente: GoogleEarth (2017).

2.4.2. Preparación del terreno, parcelas y siembra de brócoli

El ensayo fue instalado a campo abierto en un área de 280 m², donde se establecieron 25 camas, cada una con una dimensión de 14 m x 10.5 m. Las plantas fueron sembradas a una distancia de 0.4 m entre plantas y 0.30 m entre líneas, con dos líneas de riego al goteo por cada cama (Ver anexo 4). Las plantas sembradas fueron de la variedad Domador.

Las principales labores culturales en el cultivo se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividades dentro del cultivo antes y durante el ensayo.

Fecha	Actividad	Materiales
15 de julio de 2017	Abonado inicial	250 kg de Abonaza Pronaca
		15 kg de fertilizante 18-46-00
1 de agosto de 2017	Transplante	Plántulas de 40 días de la Variedad Domador.
	Control fitosanitario contra gusano cogollero (<i>Agrotis spp.</i>)	Insecticida Cipermetrina 2 cc/L
1 de septiembre de 2017	Deshierba	Azadón
	Fertilización intermedia a los 30 días del transplante	15 kg de fertilizante: 15-15-15
21 de septiembre de 2017	Amontonamiento de la tierra alrededor de la base de la planta	Azadón
	Control de pulgón (<i>Aphis spp.</i>)	Insecticida Lambda cialotrina 1.5 cc/L
	Fertilización final a los 66 días del transplante	15 kg de fertilizante: 15-15-15

Elaborado por: las autoras, 2018.

2.4.3. Diseño o esquema en campo

En toda el área experimental se tuvo distribuido un total de 1750 plantas (70 plantas/cama), de cada cama se escogieron 10 plantas. Cada tratamiento contó con

tres repeticiones, es decir se conto con 12 unidades experimentales. La distribución de los mismos se muestra en la Figura 1.



2.3. Diseño experimental

Para el análisis estadístico en campo se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA) en función del siguiente esquema de ANOVA.

Tabla 6. Esquema de ANOVA

Fuente de variación	GL
Tratamiento	3
Error experimental	8
Total	11

Nota: GL: Grados de libertad
Elaborado por: las autoras, 2018.

2.4.4. Aplicación de tratamientos

En campo se evaluaron cuatro tratamientos, los cuales se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos aplicados en campo.

TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	C1	Tratamiento con biopreparado líquido a una concentración de 10^7 UFC.mL ⁻¹
2	C2	Tratamiento con biopreparado sólido a una concentración de 10^7 UFC.mL ⁻¹
3	TQ	Tratamiento químico con Dietilditiocarbamato a una dosis de 2 g.L ⁻¹
4	TA	Tratamiento absoluto, el cual no recibió ningún tipo de tratamiento

Elaborado por: las autoras, 2018.

La aplicación de todos los tratamientos se la realizó semanalmente a las hojas, tallo y pella de brócoli, mediante aspersión directa con ayuda de bombas manuales inyectoras (Ver Anexo 4).

Para la aplicación de cada uno de los tratamientos se agregó agua potable reposada y el fijador óxido Nonilfenoletileno a una dosis de $0.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$, para mejorar la adherencia del biopreparado. Se filtró y por último se mezcló.

2.4.5. Evaluación de la enfermedad

La aplicación de los tratamientos se empezó a la semana 5 después de instalado el cultivo en campo, los datos de las diferentes evaluaciones se recolectarán semanalmente, hasta la semana 11 en la que finalizó el ciclo del cultivo en campo.

La presencia de la enfermedad se aseguró realizando toma de muestras de hojas y porciones de floretes, se sembraron en PDA y se observó al microscopio (Ver anexo 7).

- **Valoración de hojas**

De las 10 plantas que constituían cada unidad experimental, se eligió dos hojas por planta al azar para ser evaluadas durante todo el ensayo.

En las hojas se evaluó las lesiones aparecidas en cada unidad experimental (parcela neta) de cada tratamiento, esto para determinar el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en cuanto a número de lesiones observadas a partir de la semana 6 después de establecido el cultivo en campo.

Se midió también la eficiencia cuántica del fotosistema II mediante el equipo OS-30p+Chlorophyll Fluorometer, esto a partir de la semana 7 después de establecido el cultivo en campo (Ver anexo 5)

En la semana final del cultivo en campo, se desprendieron las hojas elegidas en un principio y mediante el software libre ImageJ, se midió el área sana y el área afectada para determinar la severidad (%), posterior a eso se empleó la Escala de Horsfall and Barratt (1945) y se calculó el Índice de la Enfermedad (%) como se describe en Saharan, Mehta, & Meena (2015).

- **Valoración de pellas**

Al finalizar el período de cultivo se cosechó cada una de las pellas de los distintos tratamientos y fueron colocados en cámara húmeda, se etiquetaron y almacenaron por 7 días para la posterior evaluación (Ver anexo 6). Al pasar este período se cuantificó por cada pella el número de floretes enfermos y el número de floretes sanos para

determinar la severidad (%), posterior a esto se empleó la Escala de Horsfall and Barratt (1945) y se calculó el Índice de la Enfermedad (%).

2.4.6. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), para procesar el número de lesiones de las hojas en el tiempo, para verificar la existencia o no de diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados en el cultivo se realizó un análisis de varianza.

El ABCPE se cálculo mediante la fórmula propuesta por Cambell y Madden en 1990 (Jiménez, E., & Gómez, J. 2012).

$$ABCPE = \left(\frac{x_{i+1} + x_i (t_{i+1} - t_i)}{2} \right)$$

Donde:

x_i = número de lesiones en la hoja

$i=1$

t = Tiempo(días)

n = número de evaluaciones

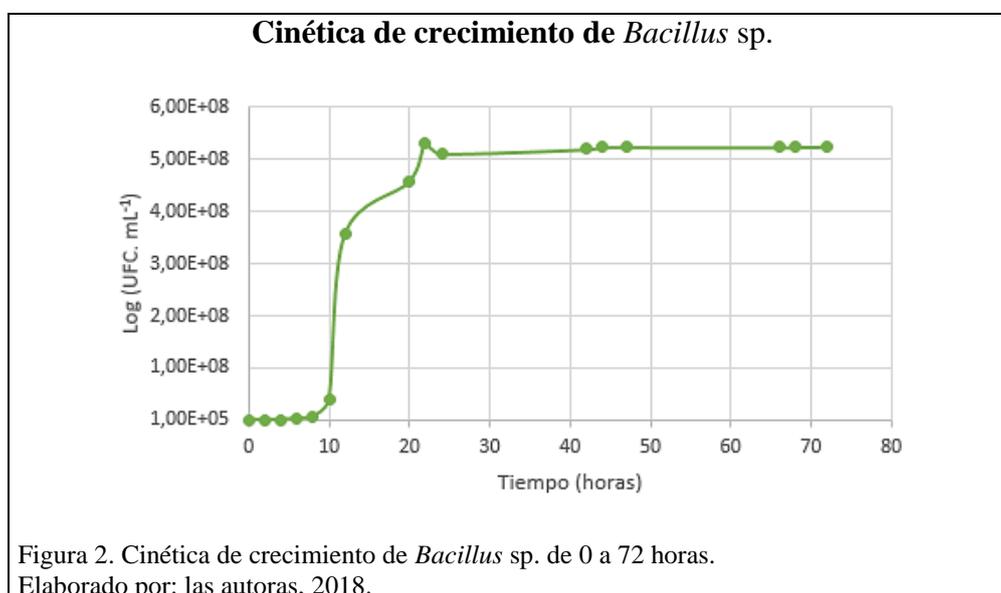
Para los análisis estadísticos de ANOVA se aplicó un diseño experimental completamente al azar y los datos fueron procesados en el programa Infostat "versión 2013". Se desarrolló la prueba Post Hoc de Tukey 5 %.

Capítulo 3

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización del crecimiento de *Bacillus* sp. IB6

Como se indica en la Figura 2 *Bacillus* sp. presenta un crecimiento sigmoideo característico de los organismos bacterianos como menciona Gallardo (2015). Se puede diferenciar la fase de latencia, que es el período de adaptación de la bacteria, la cual dura aproximadamente 4 horas, seguido por la fase exponencial que dura hasta la hora 20 y a partir de esta se observa la fase estacionaria.



3.2. Optimización de medios de cultivo

3.2.1. Biopreparados obtenidos mediante LF

La Tabla 8 indica los resultados de la producción de biomasa mediante fermentación en estado líquido, aplicando el análisis de varianza que se describe en la Tabla 9, se determinó que al menos un tratamiento es diferente ya que el p-valor es menor a 0.05, por lo que con ayuda de la prueba de Tukey al 5 % se estableció que el tratamiento 3 compuesto por 40 g.L⁻¹ de harina de haba y 6 g.L⁻¹ de panela obtuvo una concentración

de 4.5×10^8 UFC.mL⁻¹ u $8.6 \log$ (UFC.mL⁻¹) y el tratamiento 5 que fue el medio de cultivo comercial TSB obtuvo 5.01×10^8 UFC.mL⁻¹ o $9.8 \log$ (UFC.mL⁻¹), son similares estadísticamente, obteniéndose en ellos la mayor biomasa al cabo de las 72 horas.

Gallardo (2015) en su investigación realizó fermentación en estado líquido utilizando medios de bajo costo para masificar una especie de *Bacillus*, reporta una concentración de 1.7×10^9 UFC. mL⁻¹ a las 72 horas como la mayor obtenida, esto utilizando 40 g.L⁻¹ de harina de soya y 2 g.L⁻¹ de melaza .

El uso de harinas como sustituto de medios de cultivo microbiológico ha mostrado efecto favorable en el crecimiento y esporulación de cepas de *Bacillus*, hay estudios donde se alcanzaron concentraciones de 1.5×10^8 UFC. mL⁻¹ y 2×10^8 UFC. mL⁻¹ (De la Cruz, Méndez, & Valera, 2016).

Las harinas de fuentes no convencionales, como lo son las leguminosas, no han sido explotadas y contienen proteínas en cantidad y calidad regular (Torres, Jiménez, & Bárcenas, 2014). Es por ello que el uso de harinas es una opción acertada para complementar la nutrición bacteriana debido a su aporte de nitrógeno.

Tabla 8. Concentración de biomasa de *Bacillus* sp. en los diferentes tratamientos de fermentación líquida.

TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	Concentración Log10 (UFC.mL ⁻¹) – Tiempo		
		24 horas	48 horas	72 horas
HS(40 g)+P(5 g)	T1	8.0±0	8.2±0	8.3±0
HS(40 g)+P(6 g)	T2	8.3±0	8.4±0	8.2±0
HH(40 g)+P(5 g)	T3	8.1±1	8.5±0	8.6±1
HS(40 g)+P(6 g)	T4	8.4±0	8.5±0	8.5±1
TSB	T5	8.4±1	8.1±0	8.9±0

Nota: Los datos corresponden a la media de cuatro repeticiones. Se muestra la desviación estándar para cada tratamiento. HS= Harina de soya, HH= Harina de haba, P= Panela.

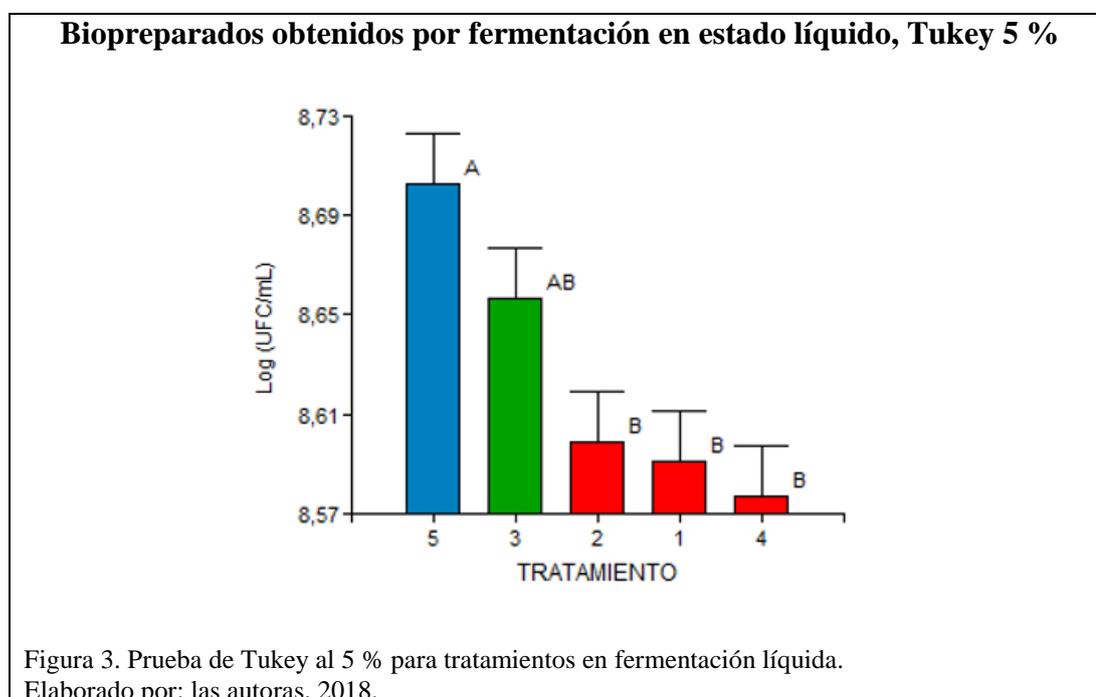
Elaborado por: las autoras, 2018.

Tabla 9. ANOVA para los tratamientos en fermentación en estado líquido.

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamiento	0.04	4	0.01	6.81	0.0025
Error	0.02	15	0.001		
Toral	0.07	19			

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2018.



Al final de la evaluación de los biopreparados obtenidos por fermentación líquida, el Tratamiento 3 fue elegido para ser aplicado en la posterior prueba en campo.

3.2.2. Biopreparados obtenidos mediante SSF

En la fermentación en estado sólido (SSF) como muestra la Tabla 10, el sustrato en donde hubo la mayor concentración de biomasa a las 72 horas fue en el tratamiento 2

con 5×10^9 UFC.g⁻¹ o $9.6 \log$ (UFC.g⁻¹), que es salvado de trigo. Al realizar el análisis de varianza se determinó que hay diferencia entre tratamientos ya que el p-valor es menor a 0.05. La prueba de Tukey al 5 % muestra que todos los tratamientos son diferentes estadísticamente entre si, Figura 4.

El salvado de trigo al ser un sustrato de fácil acceso y económico se ha utilizado en diversas investigaciones. Abbasi, Zaki, & Anis. (2013) reportan el uso de este sustrato donde mediante SSF masifico dos especies de *Bacillus* gram positivos formadoras de endoespora; *Bacillus subtilis* y *Bacillus firmus*, obtuvo concentraciones de 6.3×10^{10} UFC.g⁻¹ y 1.5×10^{10} UFC. g⁻¹ respectivamente. En la investigación realizada por Bettiol, Kupper, de Goes, Moretto, & Correa. (2005), también se utilizó en uno de sus tratamientos como sustrato al salvado de trigo, y en este se obtuvo un rendimiento de 1.5×10^7 UFC. g⁻¹. Estas diferencias se deben al tiempo de incubación de los diferentes experimentos y al manejo de los mismos.

Tabla 10. Concentración de biomasa de *Bacillus* sp. en los diferentes tratamientos de fermentación sólida.

		Concentración Log10 (UFC.mg⁻¹) – Tiempo		
TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	24 horas	48 horas	72 horas
Arroz de cebada	T1	8.5±0	9.5±0	9.4±1
Salvado de trigo	T2	8.7±0	9.7±0	9.6±1
Turba	T3	8.4±0	9.2±0	9.1±1
Arroz	T4	8.1±0	8.7±0	8.8±1

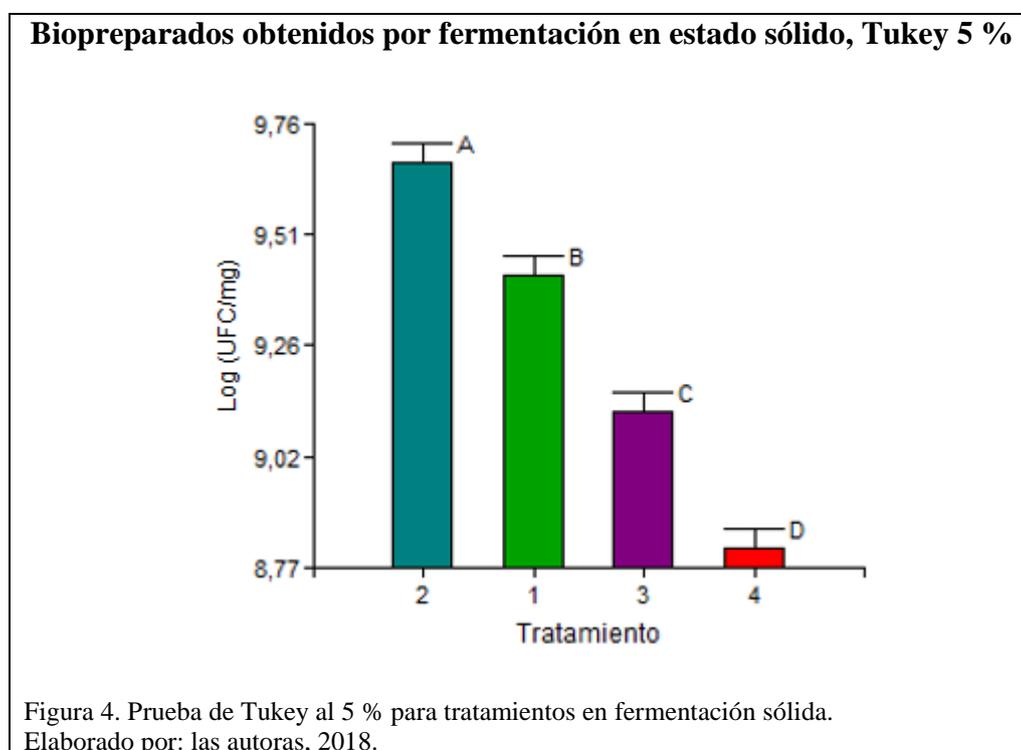
Nota: Los datos corresponden a la media de cuatro repeticiones. Se muestra la desviación estándar para cada tratamiento. HS= Harina de soya, HH= Harina de haba, P= Panela.
Elaborado por: las autoras, 2018.

Tabla 11. ANOVA para los tratamientos en fermentación en estado sólido.

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	1.68	3	0.56	75.58	<0.0001
Error	0.09	12	0.01		
Toral	1.77	15			

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2018.



Al finalizar la evaluación de los biopreparados obtenidos por fermentación en estado sólido, fue elegido el Tratamiento 2 para a ser aplicado en la posterior prueba en campo.

Los biopreparados obtenidos por fermentación en estado sólido presentaron mayor concentración bacteriana en comparación con los biopreparados obtenidos por

fermentación en estado líquido. Pastrana (1996) menciona que en los cultivos en estado sólido el sustrato puede ser transformado por los microorganismos y este a la vez puede actuar como fuente de nutrientes. Además de la fuente de carbono utilizada (panela), el sustrato de salvado de trigo aportó con una cantidad de nutrientes extra para que las bacterias puedan proliferarse en mayor concentración.

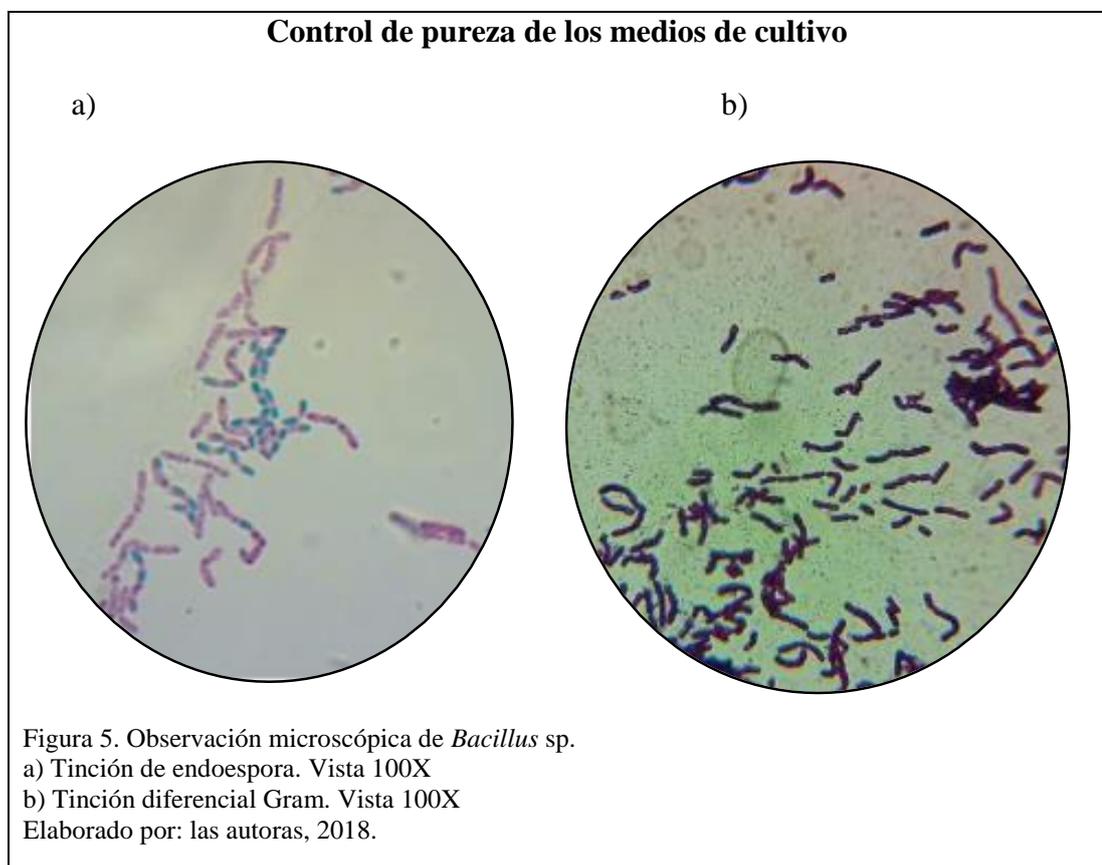
La producción de lipopéptidos se puede lograr por fermentación líquida (LF) o fermentación en estado sólido (SSF) (Faustino, 2017). Ahora ambos métodos han sido propuestos para aumentar su producción y comprobar su efectividad en campo. Dentro de los compuestos generados por *Bacillus* sp., se incluyen la surfactina, fengicina, iturina A, B, y C, estos lipopéptidos, metabolitos secundarios constituyen una herramienta importante en el desarrollo de nuevos productos efectivos contra patógenos de plantas de interés mundial (Ariza & Sánchez, 2012).

Además se ha demostrado que la producción de iturina A y fengicina es la más alta después de fase de crecimiento exponencial, mientras que la producción de surfactina es más alta durante el crecimiento exponencial en fermentación líquida (Pryor, Gibson, Hay, Gossett, & Walker, 2007). Por lo tanto, el tiempo de fermentación de 72 h fue elegido basado en estudios preliminares que evalúan los perfiles de crecimiento, en donde la cinética bacteriana se encontraba en fase estacionaria. Habitualmente esta fase es causada por la producción de sustancias metabólicas que inhiben el crecimiento celular, o por el agotamiento de los compuestos nutritivos del medio de cultivo. En este período las bacterias esporuladas comienzan a formar la endoespora, este mecanismo se puede suponer como un proceso de resistencia que poseen ciertas bacterias del género *Bacillus* (Morejón & Pardo, 2008).

Solo después de que se han consumido los sustratos más fácilmente utilizables, puede comenzar una eficiente producción de metabolitos secundarios (Marinelli & Molinari, 2012).

3.3. Control de pureza de los cultivos.

Para todos los medios de cultivo tanto de fermentación líquida como fermentación sólida, se prepararon placas para observar en el microscopio, se logró identificar estructuras características de *Bacillus* spp. Como se observa en la Figura 5 son bacilos Gram positivos y presentan endoespora de color verde.



3.4. Evaluación en campo

3.4.1 Análisis del área bajo la curva para el progreso de la enfermedad ABCPE para la variable número de lesiones en hojas

En la tabla 12 se presenta el análisis de varianza para la variable número de lesiones en hojas en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Se presenta la aceptación de la hipótesis alternativa por la presencia de un p-valor inferior a 0.05, la hipótesis revela el efecto de *Bacillus* sp. como agente de control biológico en la enfermedad causante de manchas necróticas color marrón de origen micótico por el género *Alternaria*, existiendo al menos un tratamiento que presenta diferencia significativa.

Tabla 12. Análisis de varianza para la variable número de lesiones en hojas en el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE (SC tipo III)

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F. V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	45286.71	15095.57	74.36	<0.0001
Error	8	1624.15	203.02		
Total	11	46910.85			

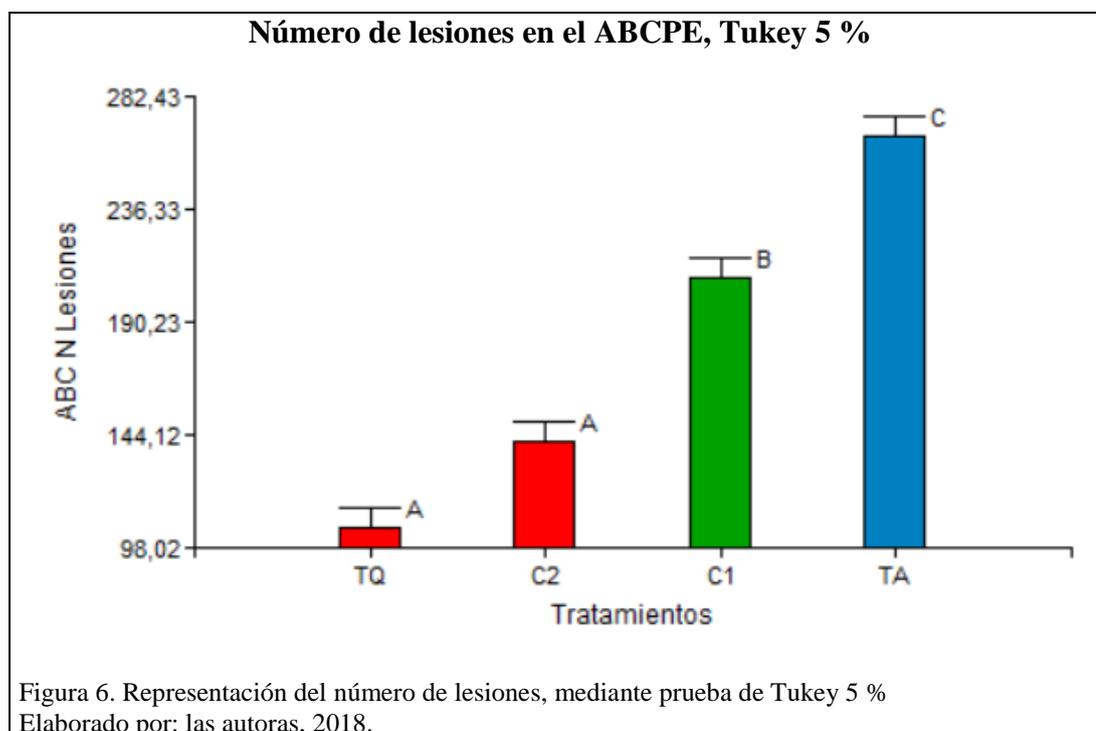
Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad

Elaborado por: las autoras, 2018.

3.4.1.1 Número de lesiones en el área bajo la curva para el progreso de la enfermedad ABCPE, prueba de Tukey al 5 %

En la Figura 6 se presentan tres rangos de significación (A), (B) y (C) en la prueba de Tukey al 5 %. En el primer rango A, se encuentra el testigo químico y el tratamiento de biopreparados sólidos, con un ABCPE de 106.40 y 140.99 promedio de la enfermedad respectivamente, estos dos tratamientos no presentan diferencia estadística entre sí, manifestando la acción de control por parte de los biopreparados

de *Bacillus* sp. en *Alternaria* spp. En el segundo rango B, se encuentran los biopreparados líquidos con un ABCPE promedio de 208.13. El tratamiento absoluto se encuentran en el rango de significación C, con un ABCPE promedio de la enfermedad de 265.83.

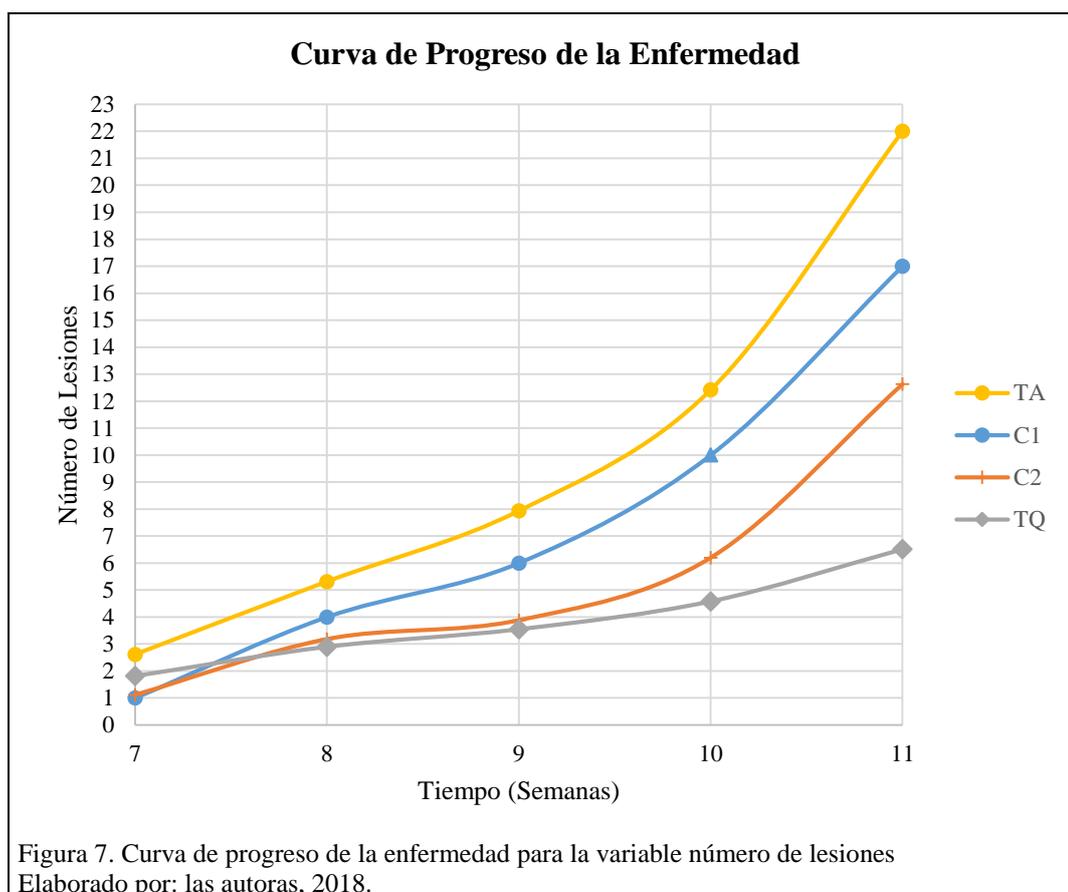


El tratamiento absoluto presentó el mayor número de lesiones, es decir es el más susceptible a presentar manchas necróticas circulares en las hojas del brócoli. El tratamiento de biopreparados sólidos tiene similitud estadística con el testigo químico y con ello como un tratamiento potencial en el control biológico de este tipo de hongos por presentar una menor severidad a la enfermedad.

Los hongos del género *Alternaria* son patógenos causantes de manchas negras en varios cultivos, el control biológico se presenta como una alternativa para el control o eliminación de estos hongos, al emplear aislados de *Bacillus* en pruebas *in vitro*, los metabolitos producidos por estas bacterias son idóneos para impedir la germinación

de esporas y el desarrollo del micelio del micopatógeno (Veiga, Rösler, Wei, Azevedo, & Camilo, 2013).

3.4.1.2 Curva de progreso de la enfermedad (CPE) para el variable número de lesiones



La Figura 7 se presenta un modelo descriptivo de la variable número de lesiones en hojas de brócoli en el tiempo, se observa un incremento del número de lesiones a medida que transcurre los días, el modelo de epidemia del patógeno puede describirse como un patógeno monocíclico.

En enfermedades monocíclicas, la cantidad de inóculo no incrementa a medida que crece el cultivo, la fuente de inóculo suele ser externa, endémica y constante. La

enfermedad se ve afectada por la aptitud del micopatógeno de producir infección (Achicanoy, 2000).

El incremento de número de lesiones presenta al testigo absoluto como el máximo punto en la gráfica con un promedio de 22 lesiones por hoja al final del cultivo, difiriendo notablemente del testigo químico que presenta un promedio máximo de 7 lesiones por hoja al final de cultivo. Biopreparados líquidos presentan un promedio de 17 lesiones y los biopreparados sólidos un promedio de 13 lesiones por número de hoja al final del cultivo.

3.4.2. Análisis de la variación de la eficiencia cuántica del fotosistema II

En la tabla 13 se presenta el análisis de varianza para la variable eficiencia cuántica del fotosistema II, la probabilidad tiene un valor superior a 0.05, es decir los tratamientos no presentan diferencia significativa entre ellos.

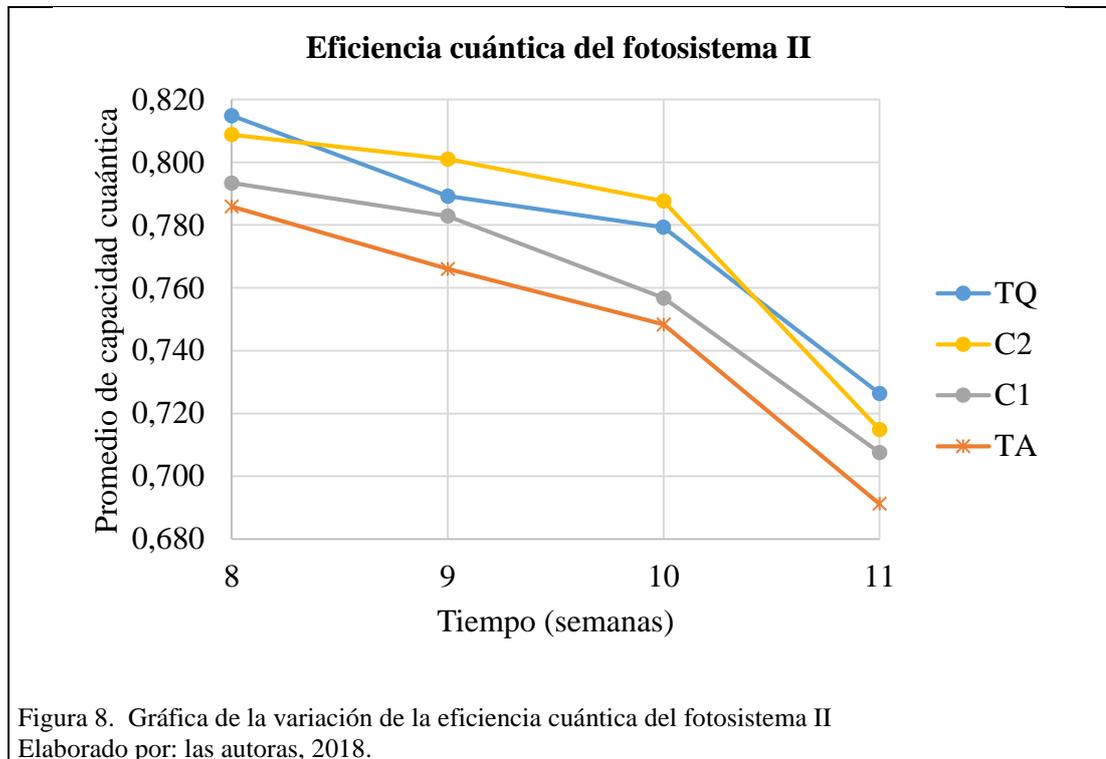
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable eficiencia cuántica del fotosistema II (SC tipo III)

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F. V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	0.89	0.30	3.34	0.0766
Error	8	0.71	0.09		
Total	11	1.61			

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad

Elaborado por: las autoras, 2018.

3.4.2.1 Gráfica de la variación de la Eficiencia cuántica del fotosistema II



El descenso de los valores de F_v/F_m en la CPE se dan por diferentes factores que pueden estar influyendo en el cultivo, el incremento de temperatura, los niveles de radiación, el riego y la senescencia (Sanclemente & Peña, 2008).

Durante el proceso de senescencia ocurren fenómenos que buscan mantener la fijación de CO_2 , los mecanismos que ocurren producen alteraciones en los componentes cloroplásticos y a medida que transcurre el tiempo se da una degradación de los componentes de estos organelos y la pérdida progresiva de la clorofila, molécula fundamental en el complejo fotosintético (Martín Gómez, 2012).

La disminución gradual de la curva de progreso de la enfermedad puede ser asociada a alguno de los factores antes mencionados, sumado al estrés a causa de la formación de manchas necróticas a causa de los hongos del género *Alternaria* que reducen la

eficiencia cuántica del fotosistema II por la reducción del área foliar (Martínez, y otros, 2016). Ratificando lo expuesto con los valores presentados de Fv/Fm que se encuentran entre 0.78-0.82, al inicio de las mediciones y al finalizar un rango de 0.69-0.70; en especies como el brócoli los valores promedio se encuentran en ~0.83 (Björkman & Demming, 1987), lo que denota un estrés a nivel del todo el cultivo, al no existir diferencia significativa el grado de la enfermedad en esta variable es similar en los tratamientos. El TQ y el C2 tienen las curvas más altas, posiblemente porque el número de lesiones fue menor.

3.4.3 Porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha

En la Tabla 14 se observa el ANOVA para la variable porcentaje índice de la enfermedad en floretes, se reporta diferencias significativas entre los tratamientos, con un valor de $p=0.0002$, existiendo diferencia en al menos un tratamiento en la postcosecha.

Tabla 14. ANOVA para la variable porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V.	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	516.74	172.25	23.99	0.0002
Error	8	57.43	7.18		
Total	11	574.17			

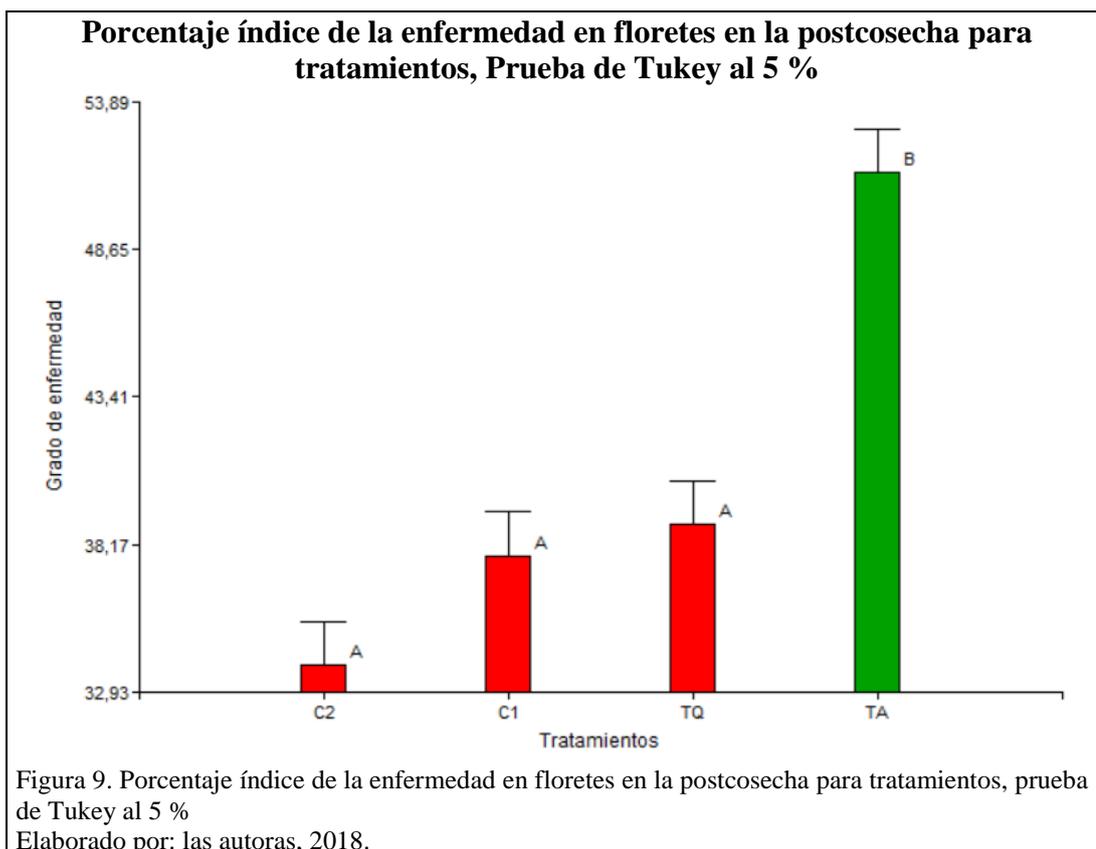
Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad

Elaborado por: las autoras, 2018.

3.4.3.1 Porcentaje índice de la enfermedad en floretes en la postcosecha para tratamientos, Prueba de Tukey al 5 %

En la figura 9 se observa la prueba de Post Hoc de Tukey al 5 % que reveló dos rangos de significación A y B, en el rango A se encuentra los tres tratamientos de

biopreparados sólidos, líquidos y el testigo químico, cada uno con porcentajes de índice de la enfermedad en floretes de 33 %, 37 % y 38 % respectivamente, señalando el control biológico por parte de la bacteria hacia el micopatógeno. El rango B presenta al tratamiento absoluto, que denota con un 51 % el mayor porcentaje índice de la enfermedad.



El tratamiento absoluto presenta el mayor porcentaje de índice de infección en floretes, refiriendo la capacidad de la enfermedad para atacar a los cultivos de brócoli (Ver Anexo 7). El tratamiento de biopreparados sólidos presentó la menor afectación por parte de la enfermedad teniendo similitud estadística con los resultados del tratamiento de bioperados líquidos y el tratamiento químico.

Los floretes que fueron aplicados con el biocontrolador a base de *Bacillus* sp. presentaron menor presencia de la enfermedad, esto podría explicarse ya que *Bacillus*

sp. se reporta como un bacteria que ofrece diferentes ventajas en la defensa de agentes infecciosos por su extensa gama de antibióticos, presentado antagonismo en pruebas *in vitro*. La antibiosis ocasiona la destrucción y cambios estructurales de conidios e hifas de micopatógenos, reportando porcentajes de inhibición del crecimiento micelial y la germinación de conidios (Bae, Kim, & Kim, 2013; Shanker, Pindi, & Shankar, 2014; Abdalla, Algam, Ibrahim, & El Naim, 2014).

El género *Bacillus* se encuentra dentro de las bacterias con mayor uso en el control de enfermedades en plantas, por los beneficios que presentan. La actividad biocontroladora *in vivo* es reportada en diferentes cultivos durante su crecimiento y en postcosecha de frutas y raíces (Pertot, Alabouvette, Hinarejos, & Franca, 2015; Basurto, y otros, 2012).

3.4.4 Porcentaje índice de la enfermedad en hojas

En la Tabla 15 se presenta el ANOVA de los tratamientos en estudio, este análisis resulta en un p-valor inferior a 0.05 aceptando que *Bacillus* sp. es un microorganismo que actúa como biocontrolador de *Alternaria* spp. en brócoli, en al menos un tratamiento de los evaluados.

Tabla 15. ANOVA para la variable porcentaje índice de la enfermedad de las hojas*

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V.	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	516.74	172.25	23.99	0.0002
Error	8	57.43	7.18		
Total	11	574.17			

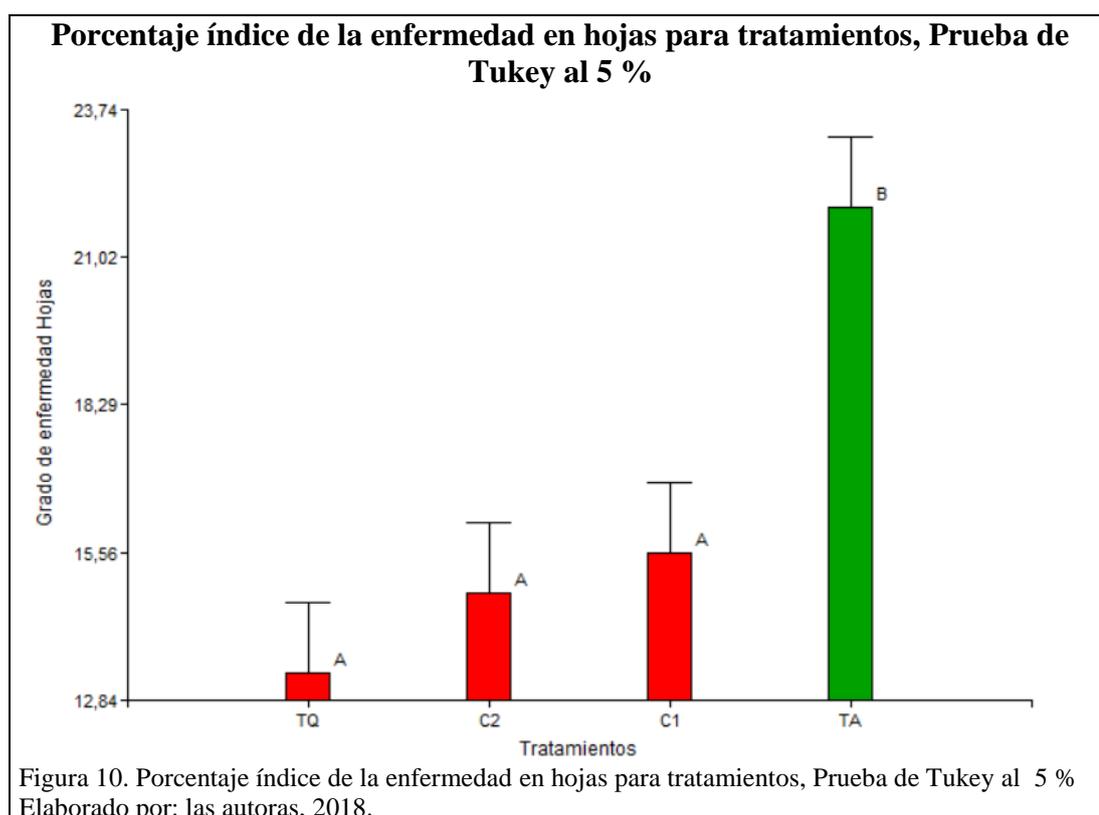
Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad

*La evaluación fue realizada en la semana final, con el propósito de obtener un cálculo muy cercano al real, al emplear la totalidad de la hoja y una superficie plana para las mediciones, disminuyendo el error causado por su forma ondulada y lobulada.

Elaborado por: las autoras, 2018.

3.4.4.1 Porcentaje índice de la enfermedad en hojas para tratamientos, Prueba de Tukey al 5 %

En la Figura 10 se tiene dos rangos de significancia A y B resultado de la prueba Post Hoc de Tukey al 5 %, en el primero se encuentran tres tratamientos, el testigo químico, los biopreparados sólidos, seguido del tratamiento de biopreparados líquidos, cada uno con porcentajes de severidad en hojas por planta de 13 % en el testigo químico, 14 % en los biopreparados sólidos, 15 % en el caso del biopreparado líquido, reportando la condición de control de biológico por parte de los biopreparados a base de *Bacillus* sp. hacia hongos de *Alternaria* spp. causantes de las manchas necróticas en hojas. En el segundo rango B, se encuentra el tratamiento absoluto que presenta más del 21 % de índice de la enfermedad en hojas.



El control negativo o tratamiento absoluto se presenta como el tratamiento con mayor severidad en hojas por planta de brócoli, el uso del controlador biológico en los dos

tratamientos aplicados presentó diferencia significativa con el control negativo y estadísticamente no presentaron diferencia con el testigo químico.

El empleo de biocontroladores para disminuir en hojas los síntomas causados por el género *Alternaria* se corrobora por reportes previos utilizando cepas de *Bacillus* que se presentan como inhibidoras del 100 % de crecimiento de estos hongos. La inhibición del crecimiento es probable ya que producen metabolitos de naturaleza antifúngica, dando lugar a la selección de cepas que prometen el control biológico de micopatógenos (Reinoso, Vaillant, Casadesús, García, & Pazos, 2007).

El control del crecimiento micelial en frutos con enfermedades causadas por *Alternaria* spp. en pruebas *in vivo* ha evidenciado una disminución de la severidad e incidencia con una ausencia de diferencia significativa con el control positivo de los ensayos encontrándose entre el control negativo y el tratamiento químico, prometiendo la inclusión de un agente biológico no tóxico en enfermedades causadas por estos hongos (Siddig, Osman, & Hammad, 2014).

Sharma & Sharma (2008) revelaron la moderación en la aparición de manchas foliares causadas por hongos, utilizando cepas de *Bacillus* inhibiendo el crecimiento de hongos *in vitro* e *in vivo*, desarrollándose el biocontrolador sobre las hifas del patógeno realizando una competencia directa además de la producción de metabolitos antifúngicos que alteran de la pared celular por efecto de la lisis de la misma.

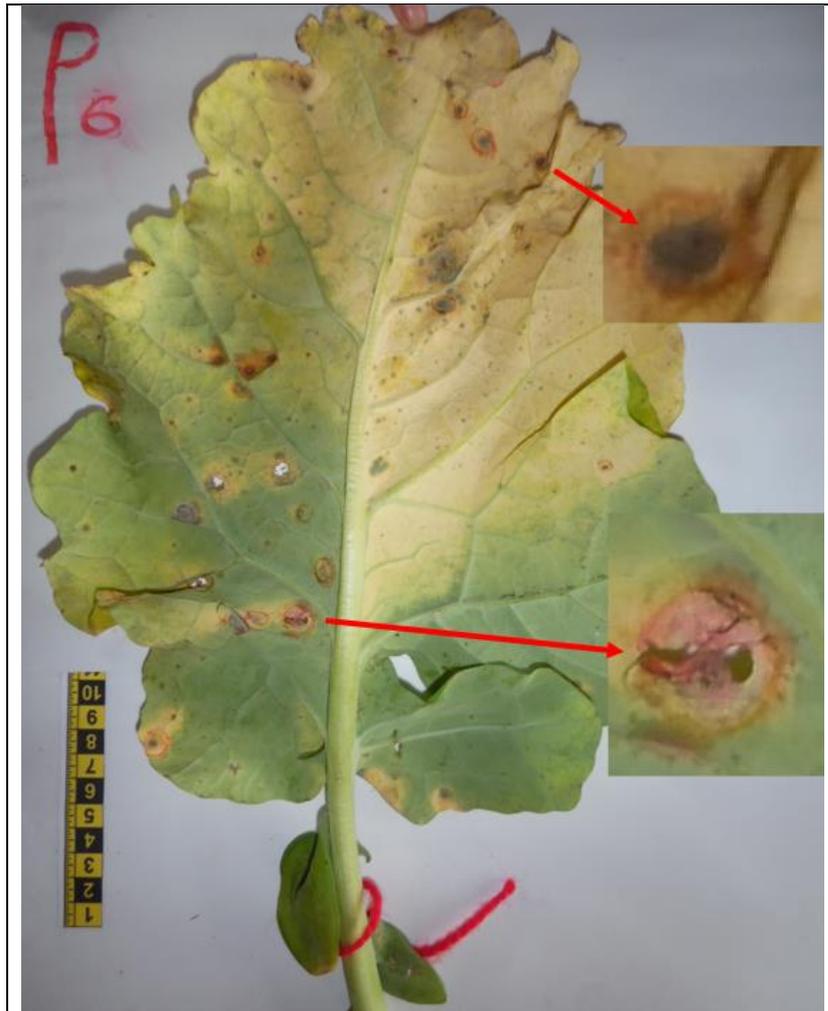


Figura 11. Hoja de brócoli, en la postcosecha afectada por *Alternaria* spp. Las flechas indican las lesiones propias de la enfermedad de acuerdo Serrato & French (2011).
Elaborado por: las autoras, 2018.

Conclusiones

- El biopreparado líquido a base de harina de haba y panela obtuvo concentraciones de 4.5×10^8 UFC.mL⁻¹ y el biopreparado sólido que tuvo como sustrato al salvado de trigo obtuvo una concentración de 5×10^9 UFC.g⁻¹, siendo las mayores concentraciones bacterianas obtenidas.
- El tratamiento con el biopreparado sólido no presentó diferencia estadística con el tratamiento químico para el número de lesiones por hoja, el porcentaje índice de la enfermedad en floretes y hojas por efecto biocontrolador que ejerció *Bacillus* sp. en el cultivo.
- Los síntomas de la enfermedad causados por *Alternaria* spp. fueron controlados en pruebas en campo, resultando en la disminución del grado de la enfermedad en hojas y pellas de brócoli, con los tratamientos de biopreparados, siendo el de sólidos el mejor biocontrolador.

Recomendaciones

- Aplicar el biopreparado sólido a base de salvado de trigo en campo para combatir *Alternaria* spp. en cultivos de brócoli a una concentración de 10^7 UFC.mL⁻¹ de *Bacillus* sp.
- Realizar investigaciones para determinar la residualidad de las bacterias sobre las plantas de brócoli y con ello sería posible determinar la periodicidad de la aplicación de los biopreparados.
- Probar formulaciones para los biopreparados sólidos y líquidos, que permitan a las bacterias permanecer estables por más tiempo sin alterar su funcionamiento y actividad de control biológico, integrando su uso con en la Manejo Integrado de Enfermedades.
- Identificar y caracterizar los metabolitos que producen las bacterias, los cuales proporcionan el efecto biocontrolador en hongos patógenos de interés agrícola, como fuente potencial de compuestos aptos para ser usados a nivel industrial.

Referencias Bibliográficas

- Abbasi, M. W., Zaki, M. J., & Anis, M. (2013). Application of *Bacillus* species cultured on different low cost organic substrates for the control of root-knot nematode infection on okra (*Abelmoschus Esculentus moench*). *Pakistan Journal of Botany*, 45(3), 1079–1084. Recuperado de [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/45\(3\)/50.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/45(3)/50.pdf)
- Abdalla, S., Algam, S., Ibrahim, E., & El Naim, A. (2014). In Vitro Screening of *Bacillus* Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. *World Journal of Agricultural Research*, (2), 47-50. doi:10.12691/wjar-2-2-3
- Achicanoy, H. (2000). Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 53(1), 941-968. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/26473/1/24069-84222-1-PB.pdf>
- Adams, T., Eiteman, M., & Hanel, B. (2002). Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresource Technology*, 82(1) 33-41. doi:10.1016/S0960-8524(01)00153-5
- Almachi Paneluisa, V. (2013). *Evaluación de dos híbridos de Brócoli (Brassica oleracea var. italica) a tres Métodos Alternativos, aplicados a dos dosis, para el control de Hernia de la col (Plasmodiophora brassicae Wor.)*, en la Hacienda Limache – Mulaló – Cotopaxi. (Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi). Recuperado de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2575/1/T-UTC-00112.pdf>
- Álvarez, T., Bravo, E., & Armendaris, E. (2014). Soberanía alimentaria y acceso a semillas hortícolas en el Ecuador. *La Granja*, 20(2) 45-57. Recuperado de http://lgr.ups.edu.ec/documents/1317427/6642419/Lgr_n20_Alvarez_Bravo_Armendariz.pdf

- Amin, N., Ali, B., Muzaffar, S., Majeed, I., & Sayeed, N. (2013). Symptoms, pathogen biology and control of downy mildew of *Brassica*- A minireview. *Journal of Biosphere*, 2(1), 6-9. Recuperado de http://www.gdckathua.com/pdf/ folder/ currentjournal/ pathogenbiology_ Amin.pdf
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 149-155. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a01.pdf>
- Bae, S., Kim, S. G., & Kim, Y. H. (2013). Biocontrol Characteristics of *Bacillus* Species in Suppressing Stem Rot of Grafted Cactus Caused by *Bipolaris cactivora*. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 42-51. doi:10.5423/PPJ.OA.07.2012.0116
- Basurto, M., Vázquez, M., García, J., Salcedo, R., Bideshi, D., & Barboza, J. (2012). Isolation of a New Mexican Strain of *Bacillus subtilis* with Antifungal and Antibacterial Activities. *The Scientific World Journal*, 1-7. doi:dx.doi.org/10.1100/2012/384978
- Bernat, P., Paaraszkiewicz, K., Siewiera, P., Moryl, M., Plaza, G., & Chojniak, J. (2016). Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(10), 144-157. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993802/pdf/11274_2016_Article_2126.pdf
- Bettioli, W., Kupper, K., De Goes, A., & Moretto, C. (2005). Mass production of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Phyllosticta citricarpa* (teleomorph : *Guignardia citricarpa*). *Summa Phytopathologica*, 31, 276–278. Retrieved from <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124833/1/2005AP-033.pdf>

- Björkman, O., & Demming, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170(4), 489-504. doi:10.1007/BF00402983
- Björling, O. (2013). *Plasmodiophora brassicae* - host and environment interactions. (Tesis de maestría, Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia). Recuperado de https://stud.epsilon.slu.se/6272/7/bjorling_o_131115.pdf
- Cadena Yanchapaxi, D. (2011). *Efecto de tres dosis en tres épocas de aplicación de pyraclostrobin (comet®) en el control de la mancha foliar (Alternaria brassicae berk) y validación del efecto agcelence en el rendimiento de un híbrido de brocoli (Brassica oleracea var. italica)*. (Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi). Recuperado de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/775/1/T-UTC-0598.pdf>
- Caicedo Morales, S., & Chacón Muela, M. (2017). *Pruebas bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. en Brassica oleracea var italica y técnicas de conservación de cepas*. (Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana). Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT11349.pdf>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39. Recuperado de http://www.lamolina.edu.pe/ECOLAPL/Articulo_4_No_1_Vol_9.pdf
- Castellanos, J., Ortiz, L., Oliva, P., Dueñas, M., Fresneda, J., Fraga, S., & Meléndez, O. (2005). Estudios relacionados con el uso de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. *Revista Agrotecnia de Cuba*, 29(1), 658-669. Recuperado de http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2005-1/EPRO65.pdf

- Castillo Carranza, K. (2013). *Manual electrónico de control de calidad en medios de cultivo y cepas de referencia*. (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México). Recuperado de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_castillo_carranza.pdf
- Castillo, C., Sosa, M., & Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1), 65-67. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100011
- Cerutti Pereyra, N. (2001). *Determinación de la temperatura óptima de esporulación de cuatro cepas de Clostridium perfringens tipo A*. (Tesis posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León). Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/6743/1/1080124378.PDF>
- Cho, Y. (2015). How the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* Kills Plant Cells Remains an Enigma. *Eukaryotic Cell*, 1(4), 335-344. Recuperado de <http://ec.asm.org/content/14/4/335.long#sec-7>
- Cobo Salcedo, C. (2017). *Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria Bacillus subtilis*. (Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>
- Corrales, L., Sánchez, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*, 12(21), 165-178. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n22/v12n22a06.pdf>
- De la Cruz, E., Méndez, D., & Valera, L. (2016). Cultivo de *Bacillus subtilis* CEPA QST 713 en reactor tipo irlift y su actividad antagónica contra *Phytophthora capsici*. *Revista de*

Ingeniería Y Tecnologías Para El Desarrollo Sustentable, 1, 38–42. Recuperado de http://reingtec.itsoeh.edu.mx/docs/ARTICULO_7.pdf

Delgadillo, I., Montenegro, L., Pinilla, G., & Melgarejo, L. (2017). Medición de la fluorescencia de la clorofila a en algas encapsuladas en alginato de Calcio. *Acta Biológica Colombiana*, 22(2), 199-208. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319051099009.pdf>

Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2017). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89-97. doi:10.1016/j.micres.2017.03.004

Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., & Wang, Q. (2017). Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via Surfactin-Mediated Antibacterial Activity and Colonization. *Frontiers in Microbiology*, 8. Recuperado de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01973/full#B26>

FAO. (2010). Guía Biopreparados para el Manejo Sostenible de Plagas y Enfermedades en la Agricultura Urbana y Periurbana. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-as435s.pdf>

Faustino, A. (Ed.). (2017). Fermentation Processes. In *Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection*. [Versión INTECH]. doi: 10.5772/61924

Fernández, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, (62), 96-100. Recuperado de <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6578/A2120e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Fraire, M., Nieto, D., Cárdenas, E., Gutiérrez, G., Bujanos, R., & Vaquera, H. (2010). *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum* Fungi Causes of the Rotting of the Floret of Broccoli. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1), 25-33. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003
- Gallardo Sierra, E. (2015). *Estandarización de la producción de biopesticidas a base de Bacillus subtilis para el control de la Moniliasis*. (Tesis de pregrado, Universidad de las Américas). Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4650/1/UDLA-EC-TIAG-2015-18.pdf>
- González, P. (29 de Mayo de 2012). Facultad de Agronomía de la Universidad de la República de Uruguay. Enfermedades de las crucíferas. Recuperado de <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/enfermedadesdecrucifera.pdf>
- Grahame, J. (18 de Enero de 2016). Pacific Pests and Pathogens. Cabbage *Fusarium* wilt (132). Recuperado de http://www.pestnet.org/fact_sheets/cabbage_fusarium_wilt_132.pdf
- Gray, A. (1982). Taxonomy and evolution of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Economic Botany*, 36(4), 397-410. doi:10.1007/BF02862698
- Guerrero, E., Solís, S., Hernández, F., Flores, A., Sandoval, V., & Jasso, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 48-53. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100007&lng=es&tlng=es.

- Henson, R. (2015). Analysis of Variance (ANOVA). *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*, 1, 477-481. Recuperado de http://www.mrc-cbu.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2015/03/Henson_EN_15_ANOVA.pdf
- Herrera León, F. (2016). *Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de Alternaria spp. botones de Rosa (Rosa sp.) y plantas de brócoli (Brassica oleracea var. italica)*. (Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6158/1/128912.pdf>
- ICA. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de hortalizas. Medidas para la temporada invernal. Bogotá. Recuperado de <https://www.ica.gov.co/getattachment/e16a4b6e-d0fa-49da-a400-dc31e40fe643/->
- Jeger, M., & Viljanen-Rollinson, S. (2001). The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 32-40. doi:10.1007/s001220051615
- Jiménez, E., & Gómez, J. (2012). Identificación y descripción de síntomas de los principales patógenos asociados al cultivo de marañón (*Anacardium occidentale l.*) orgánico y convencional, en León, Nicaragua. *La calera*, 12(18), 3-4. Recuperado de: <http://repositorio.una.edu.ni/2378/1/pph20j61ide.pdf>
- Kapilan, R. (2015). Solid state fermentation for microbial products: A review. *Archives of Applied Science Research*, 7(8), 21-25. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/281643597_Solid_state_fermentation_for_microbial_products_A_review
- Khem, M., & Shamsheer, K. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, 2-9. doi:10.1155/2015/473050

- Klinch, M., Lax, A., & Bland, J. (1991). Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia*, 116(2), 77-80. Recuperado de <https://page-one.live.cf.public.springer.com/pdf/preview/10.1007/BF00436368>
- Larrea, I., Falconi, C., & Arcos, A. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 140-148. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291
- Linares, H. (2008). Brócoli. Ministerio de Economía Gobierno de El Salvador. Recuperado de <http://web.minec.gob.sv/cajadeherramientasue/images/stories/fichas/guatemala/gt-brocoli.pdf>
- MAGAP. (2014). Boletín Situacional Brócoli 2014. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Recuperado de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2014/cboletin-situacional-brocoli-2014-actualizado.pdf>
- Marinelli, F., & Molinari, F. (2012). Biocatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido (pp. 61–104). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia. Recuperado de <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1314/1372>
- Martín Gómez, F. (2012). *Regulación de los pasos iniciales de la degradación de clorofila durante la senescencia foliar*. (Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata). Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Facundo_Gomez2/publication/277405010_PhD_Thesis_-

REGULACION_DE_LOS_PASOS_INICIALES_DE_LA_DEGRADACION_DE_CLOROFILA_DURANTE_LA_SENESCENCIA_FOLIAR/links/556a5df908aeccd77739ffb8/PhD-Thesis-REGULACION-DE-LOS-PASOS-INICIAL

Martínez, A., & Meza, M. (2013). ANOVA o ANAVA para diseños totalmente aleatorizados y ANOVA para diseños de bloques aleatorizados. WordPress. Recuperado de <https://mariaestelaseveriche.files.wordpress.com/2013/03/anova-o-anava-para-disenos-de-bloques-aleatorizados.pdf>

Martínez, F., Cervantes, L., Aíl, C., Hernández, L., Del Toro, C., & Rueda, E. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la zona árida del noreste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18), 232-256. doi:10.19044/esj.2016.v12n18p232

Medina, B. (2015). *Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de brócoli (Barassica oleracea var. italica), sector brigada Patria-Cotopaxi. 2014.* (Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi). Recuperado de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2520/1/T-UTC-00054.pdf>

Mercier, J., Makhlouf, J., & Martin, R. (1991). *Fusarium avenaceum*, a pathogen of stored broccoli. *Canadian Plant Disease Survey*, 71(2), 161-162. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19912314127>

Minitab Inc. (2017). ¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples? Soporte de Minitab. Recuperado de: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-tukey-s-method/>

Morejón, L., & Pardo, E. (2008). Texto de Microbiología I (pp. 34–36). Managua. Recuperado de <http://repositorio.una.edu.ni/2454/1/n579m838.pdf>

Ñacato Suintaxi, C. A., & Valencia Gordón, M. F. (2016). *Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de Biocontrol de Alternaria spp. en Brassica oleracea var. italica*. (Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana). Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12144/1/UPS-QT09671.pdf>

Ostertagova, E., & Ostertag, O. (2013). Methodology and Application of One-way ANOVA. *American Journal of Mechanical Engineering*, 1(7), 256-261. doi:10.12691/ajme-1-7-21

Pastrana, L. (1996). Fundamentos De La Fermentación En Estado Sólido y Aplicación a La Industria Alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(3), 4–12. <https://doi.org/10.1080/11358129609487556>

Pathak, K. (2011). *Purification and characterization of antifungal compounds produced by banyan endophytic Bacilli*. (Tesis doctoral, Sardar Patel University). Recuperado de http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/7223/10/10_chapter%206.pdf

Pavithra, S., Ramesh, R., Aarthy, M., Ayyadurai, N., Kuppaswami, M., & Ramudu, N. (2014). Starchy substrates for production and characterization of *Bacillus subtilis* amylase and its efficacy in detergent and breadmaking formulations. *Starch-Stärke*, 66(11), 976-984. doi:10.1002/star.201400066

Pazmiño, O., Flores, M., Vallejo, M. J., Iturra, F., Ramón, P., & Medina, L. (2015). Estudio sobre residuos de plaguicidas en brócoli de exportación y consumo nacional. Ecuador es Calidad. Agrocalidad Recuperado de

<http://www.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadoreaescalidad/index.php/revista/article/view/21/43>

Pertot, I., Alabouvette, C., Hinarejos, E., & Franca, S. (2015). The use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases. European Commission. Recuperado de https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agriculture/files/8_eip_sbd_mp_biocontrol_final.pdf

Portella Correa, F. (2006). *Fisiologia de Bacillus subtilis R14: Crescimento e producao de lipopéptidos em cultivos descontínuos*. (Tesis de posgrado ,Universidad Federal de Pernambuco). Recuperado de http://repositorio.ufpe.br:8080/bitstream/handle/123456789/1720/arquivo4528_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Pryor, S. W., Gibson, D. M., Hay, A. G., Gossett, J. M., & Walker, L. P. (2007). Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 143(1), 63–79. doi: 10.1007/s12010-007-0036-1

Ragazzo, J., Robles, A., Lomelí, L., Luna, G., & Calderón, M. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 27(1), 5-11. Recuperado de <https://chapingo.mx/revistas/revistas/articulos/doc/b0092f1d5a40dbcb990608f88e8fd70b.pdf>

Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesús, L., García, E., & Pazos, V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11(1), 35-40. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116144007>

- Revelo, R., Ruiz, M., & Oña, X. (2009). Perfil de Brócoli. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/brocoli.pdf>
- Rivas, L., & Münlhauser, M. (2014). *Alternaria* spp. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 605-606. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v31n5/art13.pdf>
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (n.d.). Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA75&dq=tinción+verde+malaquita&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjYjfWjy7fXAhVCQiYKHZA2APUQ6AEILjAC#v=onepage&q=tinción+verde+malaquita&f=false>
- Saharan, G. S., Mehta, N., & Meena, P. D. (2015). *Alternaria* diseases of crucifers: Biology, ecology and disease management. [Versión Springer]. doi: 10.1007/978-981-10-0021-8
- Sanclemente, M., & Peña, E. (2008). Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (Onagraceae) bajo diferentes concentraciones de Nitrógeno. *Acta Biológica Colombiana*, 13(1), 175-186. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n1/v13n1a12.pdf>
- Serrato, L., & French, R. (2011). Mancha foliar del Repollo por *Alternaria*. AgriLIFE- Recuperado de <http://agrilife.org/amarillo/files/2010/11/Alternaria-en-RepolloRF.pdf>
- Shanker, S., Pindi, P., & Shankar, G. (2014). Characterization of effective bio-control agent *Bacillus* sp. SRB 27 with salt tolerance and thermostability isolated from forest soil sample. *African Journal of Biotechnology*, 13(25), 2547-2555. doi:10.5897/AJB2013.12852

- Sharma, N., & Sharma, S. (2008). Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. *Microbiological Reserach*, 163(4), 408-413. doi:10.1016/j.micres.2006.06.011
- Siciliano, I., Ortu, G., Gilardi, G., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2015). Mycotoxin Production in Liquid Culture and on Plants Infected with *Alternaria* spp. Isolated from Rocket and Cabbage. *Toxins*, 7(3), 743-754. doi:10.3390/toxins7030743
- Siddig, A., Osman, M., & Hammad, A. (2014). The Antifungal Effects of Four Tomato Rhizosphere *Bacillus* spp. against *Alternaria alternata*. *International Journal os Science and Research*, 3(7), 1324-1328. Recuperado de <https://www.ijsr.net/archive/v3i7/MDIwMTQxMTQ1.pdf>
- Subsecretaria de Fomento a los Agronegocios. (2011). Brócoli. SAGARPA. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Documents/monografias/brocoli.pdf>
- Torres, M. P., Jiménez, M. T., & Bárcenas, M. E. (2014). Harinas de frutas y/o leguminosas y su combinación con harina de trigo. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 8, 94–102. Recuperado de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Torres-Gonzalez-et-al-2014.pdf>
- UniProt. (2016). Taxonomy-Terrabacteria. UniProt Consortium. Recuperado de group: <http://www.uniprot.org/taxonomy/1783272>
- Van Beilen, J., & Brul, S. (2013). Compartment-specific pH monitoring in *Bacillus subtilis* using fluorescent sensor proteins: a tool to analyze the antibacterial effect of weak organic acids. *Frontiers in Microbiology*, 4(1), 1-11. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3685010/pdf/fmicb-04-00157.pdf>

- Varela, G., & Grotiuz, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. Temas de bacteriología y virología médica (págs. 43-57). Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
- Veiga, F., Rösler, J., Wei, L., Azevedo, G., & Camilo, S. (2013). Actividade de *Bacillus* spp. no controle de *Alternaria alternata*. Faculdade Cantareira. Recuperado de http://www.cantareira.br/sicfic2013/10_30.pdf
- Vilella, D. (1987). *Estudio de las características del intercambio gaseoso de variedades de geranio en cultivo protegido en zonas de clima mediterráneo*. (Tesis doctoral, Universidad de Barcelona). Recuperado de www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/956/01.MDSV_1de4.pdf?sequence=1
- Villa, P., Alfonso, I., Rivero, M., & González, G. (2007). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(1), 52-56. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223114967009>
- Wiesman, Z. (2009). Biotechnologies for intensive production of olives in desert conditions. Oxford: Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374257-5.00006-3
- Wilks, J., Kitko, R., Cleeton, S., Lee, G., Ugwu, C., Jones, B., Slonczewski, J. (2008). Acid and Base Stress and Transcriptomic Responses in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 981-990. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/75/4/981.full>
- Yáñez Mendizábal, V. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta*. (Tesis doctoral, Universidad

de Lleida). Recuperado de
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf>

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y., & Zhao, B. (2008). High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, 30(2), 295–297. doi: 10.1007/s10529-007-9540-1

Zohora, U., Ano, T., & Rahman, M. (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. *Advances in Microbiology*, 6(6), 424-431. Recuperado de
https://file.scirp.org/pdf/AiM_2016051315533660.pdf

Zúñiga, F., & Palomares, L. (2016). El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología. *BioTecnología*, 20(2), 11-25. Recuperado de
http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2016_2/redox.pdf

Anexos

Anexo 1. Escala Horsfall y Barratt

Índice	Porcentaje Afectado (%)
1	Sin síntomas
2	0 to 3 del área enferma
3	3 to 6 del área enferma
4	6 to 12 del área enferma
5	12 to 25 del área enferma
6	25 to 50 del área enferma
7	50 to 75 del área enferma
8	75 to 87 del área enferma
9	87 to 94 del área enferma
10	94 to 97 del área enferma
11	97 to 100 del área enferma
12	100 del área enferma

Fuente: Saharan, Mehta, & Meena (2015).

Anexo 2. Fase de Laboratorio



Figura 12. Fermentación en incubadora a 35 °C y 100 rpm
Elaborado por: las autoras, 2018.



Figura 13. Fermentación en incubadora a 35 °C
Elaborado por: las autoras, 2018.

Anexo 3. Fase de Laboratorio - Conteo de células totales

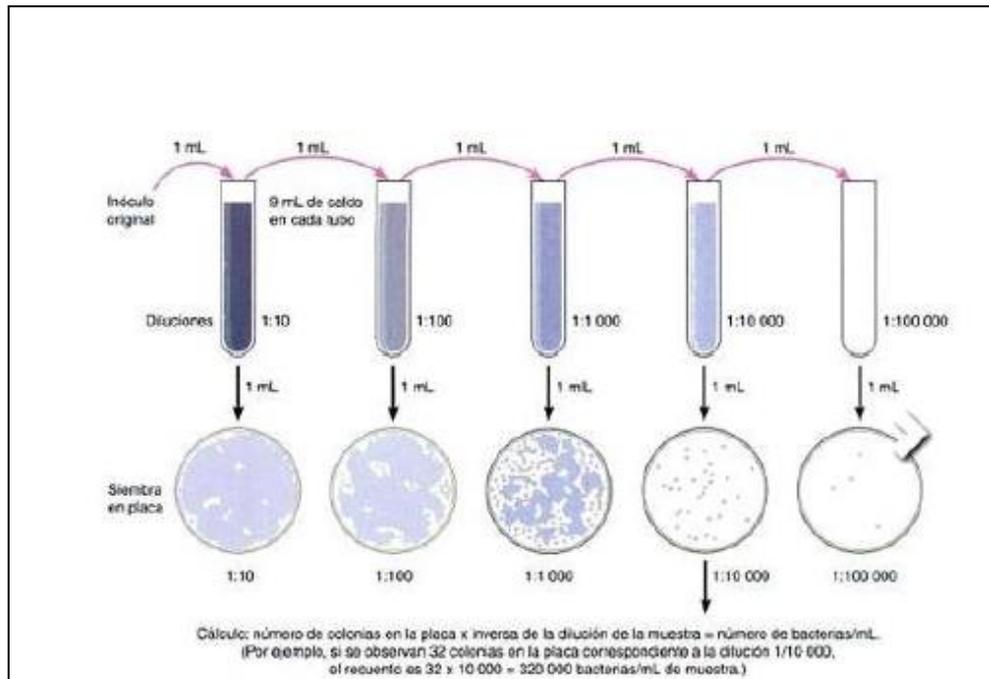


Figura 14. Metodología para dilución y plating
Elaborado por: las autoras, 2018.



Figura 15. Dilución y siembra de muestras
Elaborado por: las autoras, 2018.

Anexo 4. Fase de campo – Establecimiento del cultivo



Figura 16. Distribución de tratamientos en campo.
Elaborado por: las autoras, 2018.



Figura 17. Aplicación de tratamientos mediante bomba de mochila.
Elaborado por: las autoras, 2018.

Anexo 5. Fase de campo - Evaluación de Hojas



Figura 18. Conteo de lesiones en hojas
Elaborado por: las autoras, 2018.



Figura 19. Determinación de la eficiencia cuántica del fotosistema II
Elaborado por: las autoras, 2018.

Anexo 6. Fase de campo - Evaluación en pellas.



Figura 20. Cosecha de pellas.
Elaborado por: las autoras, 2018.



Figura 21. Cámara húmeda de pellas cosechadas
Elaborado por: las autoras, 2018.

Anexo 7. Fase de campo - Verificación en el laboratorio de observación en campo de *Alternaria* spp.



Figura 22. Florete de brócoli, en la postcosecha afectada por *Alternaria* spp. La flecha indica la lesión propia de la enfermedad de acuerdo a Fraire, y otros (2010).
Elaborado por: las autoras, 2018.

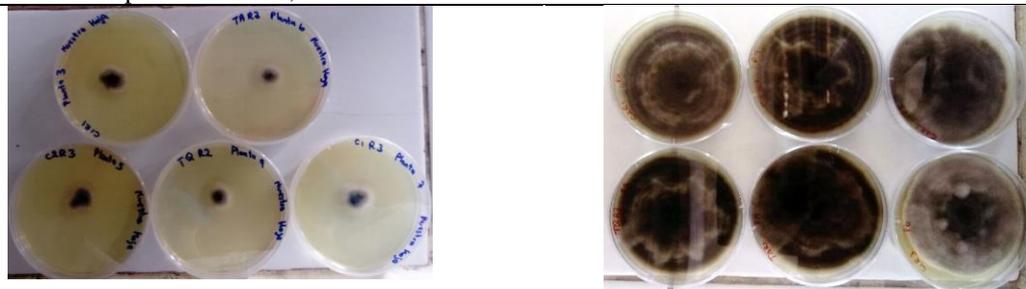


Figura 23. Placas Petri de siembras aleatorias de muestras de floretes con *Alternaria* spp.
Elaborado por: las autoras, 2018.

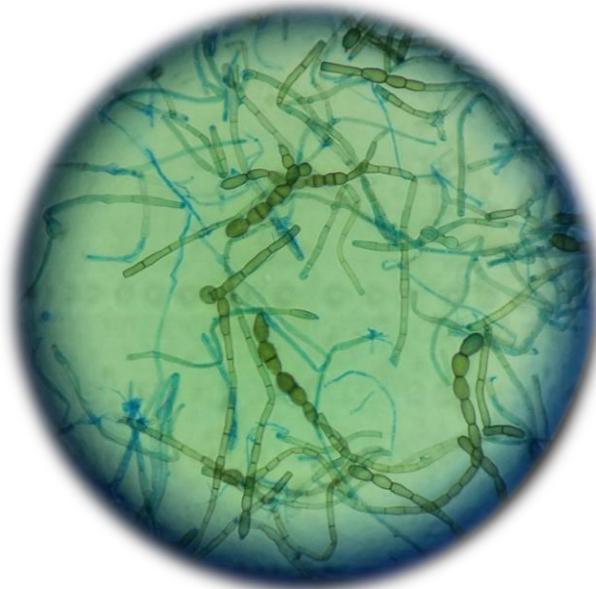


Figura 24. Conidios de *Alternaria* spp. a 40X de muestras de floretes de brócoli, utilizando tinción simple con azul de lactofenol.
Las estructuras propias del micopatógeno según Rivas & Münlhauser (2014).
Elaborado por: las autoras, 2018.