



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la actividad
fungistática in vitro de bacterias
ácido lácticas contra especies de
Fusarium causantes de pudrición
basal en pitahaya amarilla
(*Selenicereus megalanthus* Haw)**

Leidy Johana Valencia Hernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias
Palmira, Colombia

2015

Evaluación de la actividad fungistática in vitro de bacterias ácido lácticas contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw)

Leidy Johana Valencia Hernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biológicas

Directoras:

Ph.D. Liliana Serna Cock

Ph.D. Karina López López

Línea de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Grupo de Investigación:

Bacterias ácido lácticas y sus aplicaciones biotecnológicas-Industriales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias

Palmira, Colombia

2015

Esta etapa de mi vida más que enseñanzas académicas, me dejó persistencia, tolerancia, asertividad y despertó en mí el deseo ardiente por cumplir mis sueños y mejorar día a día con cada error que cometí a lo largo de estos años. No solo basto que tuviera excelentes tutores, financiadores, excelentes instalaciones para realizar mis experimentos, basto tener un objetivo claro..... y para mí es la felicidad de ver bien a mi familia y poderles retribuir en vida todo lo que me han dado. Dedico este trabajo a mis padres, el amor más puro que puede existir y al amor de mi vida Juan.

La realización de un gran sueño lleva a sacar de ti lo que antes era imposible y eso es milagroso.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue realizado gracias a Dios por todo lo que me ha dado, salud, vida, familia, amigos, compañeros.....etc Segundo Valencia Salazar, por su financiamiento, comprensión, amor y apoyo incondicional.

A mi madre María Nidia Hernández Realpe, mi hermana Patricia Valencia Hernández por sus consejos, comprensión y alientos en momentos que pensé que iba a tirar la toalla.

A toda la Familia Hernández por divertirme y comprenderme.

La Universidad Nacional de Colombia, Colciencias, Assopitaya, el Banco Interamericano de Desarrollo

Mis directoras Liliana Serna-Cock y Karina López-López, por sus aportes y conocimientos

El equipo del laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia: Luisa Fernanda Lozada Corrales, Estefanía García Gonzalez, Carlos Andrés Rengifo Guerrero, Jenifer Lisbeth Ortiz Gallego, Jhoan Steven Ortiz, Jenny Rosero, Edin Romeiro, Yeison Perenguez, Ana María Ospina, Adriana Micanquer, Omar, Angela Ruales; sin su energía y cualidades para trabajar en equipo habría sido imposible terminar

Juan Carlos Clavijo Salinas, que sin tener nada que ver con esta trabajo me ayudo de todas las formas que se puede ayudar a un ser amado.

A Don José Clavijo Rayo por su hospitalidad

Los laboratorios de Microbiología, Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira

Profesores, laboratoristas, auxiliares y asistentes que laboran en la Universidad Nacional de Colombia, contratistas, equipo administrativo de la Sede Palmira que pusieron su granito de arena.

Amigos, compañeros que hicieron un rato de cansancio un rato de risas y que me dieron ánimos en momentos de lágrimas y rabia.

También a aquellos que me hicieron pasar momentos difíciles y amargaron mi existencia, gracias porque sin su actitud no habría sido posible lograr grandes cambios en mí, a ustedes les debo mi fortaleza, humildad y capacidad de amar a pesar de todo. Eso fue valioso, por tanto ustedes son valiosos en mi vida.

Miles de Gracias a Todos.

Resumen

Fusarium sp. es uno de los principales hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en pitahaya amarilla. Estudios previos han demostrado la capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas (BAL) contra patógenos; sin embargo no se ha reportado en la literatura científica actividad fungistática de BAL contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla. En este trabajo se evaluó in vitro la actividad fungistática de una BAL aislada de cultivos de pitahaya amarilla y una BAL aislada en estudios previos de líquido ruminal bovino, *Weissella confusa*, contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla. Los mejores resultados de actividad fungistática fueron encontrados con la BAL aislada de cultivos de pitahaya amarilla. Por lo cual estos resultados indican que la utilización de BAL en el control de patógenos podría ser una alternativa potencial al uso de compuestos químicos en el campo.

Palabras clave: Bacteria ácido láctica, *Fusarium*, pitahaya amarilla

Abstract

Fusarium sp. is one of the main fungal pathogens that cause diseases in yellow pitahaya. Previous studies have demonstrated antimicrobial activity of lactic acid bacteria (LAB) against pathogens; however, fungistatic activity of BAL against *Fusarium* species causing basal rotting in yellow pitahaya has not been reported in scientific literature. In this work, the fungistatic activity of an isolated BAL yellow pitahaya crops and a BAL isolated in previous studies of bovine rumen fluid, *Weissella confusa* against species of *Fusarium* causing of basal rotting in yellow pitahaya was evaluated in vitro. The best fungistatic activity results were found with the BAL isolated from yellow pitahaya crops. Therefore, these results indicate that the use of LAB in the control of pathogens could be a potential alternative to the use of chemicals in the field.

Keywords: lactic acid bacteria, *Fusarium*, yellow pitahaya.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	3
2. Justificación	5
3. Objetivos	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos específicos	7
4. Hipótesis	9
5. Antecedentes	11
6. Marco teórico	15
6.1 Bacterias ácido lácticas	15
6.1.1 Ácidos orgánicos.....	17
6.1.2 Peróxido de hidrógeno	17
6.1.3 Reuterina	17
6.1.4 Bacteriocinas	17
6.2 Factores que afectan la actividad antifungal	18
6.2.1 Temperatura y periodo de incubación	18
6.2.2 Compuestos nutricionales	18
6.2.3 pH	19
6.3 Generalidades de la pitahaya amarilla (<i>Selenicereus megalanthus</i>)	19
6.3.1 Descripción botánica.....	19
6.3.2 Producción	19
6.3.3 Enfermedades y plagas.....	20
6.4 Fusarium.....	21
7. Materiales y métodos	25
7.1 Evaluación in vitro de la actividad fungistática de bacterias ácido-lácticas aisladas de cultivos de pitahaya amarilla contra especies de <i>Fusarium</i> causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla (<i>Selenicereus megalanthus</i>)	25

7.1.1	Aislamiento de las de bacterias ácido-lácticas de cultivos de pitahaya amarilla	25
7.1.2	Selección de bacterias ácido-lácticas con actividad fungistática contra especies de <i>Fusarium</i>	26
7.1.3	Caracterización bioquímica de la BAL seleccionada	27
7.2	Evaluar In vitro, la actividad fungistática de <i>W. confusa</i> (bacteria ácido láctica aislada de rumen bovino) contra especies de <i>Fusarium</i> , causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla	29
7.3	Determinar las cinéticas de fermentación de <i>W. confusa</i> y de la bacteria ácido-láctica seleccionada en el objetivo 1, y la cinética de actividad fungistática de éstas dos bacterias, su biomasa y su sobrenadante contra especies de <i>Fusarium</i>	30
7.3.1	Fermentación	30
7.3.2	Obtención de fermentado, biomasa y sobrenadante	32
7.3.3	Análisis de microscopía SEM	33
7.4	Caracterización molecular de la bacteria ácido-láctica aislada de cultivos de pitahaya amarilla	33
7.4.1	Extracción de ADN	33
7.4.2	Amplificación de ARN ribosomal 16S	33
7.4.3	Secuenciación de los fragmentos amplificados (análisis bioinformático)	34
7.5	Diseño Experimental y análisis estadístico	34
8.	Resultados y discusión	37
8.1	Evaluación in vitro de la actividad fungistática de bacterias ácido- lácticas aisladas a partir de cultivos de pitahaya amarilla y selección de la que presentó la mayor actividad fungistática contra especies de <i>Fusarium</i> causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla	37
8.1.1	Aislamiento de bacterias ácido lácticas de pitahaya amarilla con y sin síntomas de pudrición basal	37
8.1.2	Selección de la BAL G, como cepa indicadora contra especies de <i>Fusarium</i> causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla	39
8.2	Actividad fungistática in vitro de <i>W. confusa</i> contra especies de <i>Fusarium</i> , causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla	52
8.3	Cinéticas de fermentación de <i>W. confusa</i> y de la bacteria ácido-láctica aislada de cultivos de pitahaya amarilla	55
8.3.1	Cinéticas de ácido láctico, ácido acético, consumo de azúcares, biomasa y concentración celular	55
8.3.2	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias producidos por <i>W. confusa</i> y la BAL G contra <i>Fusarium</i> 54 y 17 en sustrato MRS y PDA	62
8.3.3	Análisis de microscopía SEM	75
8.4	Caracterización molecular a <i>W. confusa</i> y a la bacteria ácido-láctica aislada de cultivos de pitahaya amarilla	79
9.	Conclusiones y perspectivas	85
9.1	Conclusiones	85
9.2	Perspectivas	86
	Bibliografía	89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 8-1. Pitahaya amarilla sana y afectada por <i>Fusarium</i>	37
Figura 8-2: (a) Actividad fungistática de BAL G contra <i>Fusarium 1</i> en sustrato agar MRS y (b) su control.....	39
Figura 8-3: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 1</i> en sustrato agar MRS	39
Figura 8-4: (a) Actividad fungistática de las BAL F contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato agar MRS y (b) su control.....	40
Figura 8-5: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato agar MRS	40
Figura 8-6: (a) Actividad fungistática de la BAL A contra <i>Fusarium 14</i> en sustrato agar MRS y (b) su control.....	41
Figura 8-7: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 14</i> en sustrato agar MRS	41
Figura 8-8: (a) Actividad fungistática de la BAL D contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato agar MRS y (b) su control.....	42
Figura 8-9: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato agar MRS	42
Figura 8-10: (a) Actividad fungistática de la BAL H contra <i>Fusarium 22</i> en sustrato agar MRS y (b) su control.....	43
Figura 8-11: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 22</i> en sustrato agar MRS	43
Figura 8-12: (a) Actividad fungistática de la BAL A contra <i>Fusarium 1</i> en sustrato agar PDA y (b) su control	44
Figura 8-13: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 1</i> en sustrato agar PDA	44
Figura 8-14: (a) Actividad fungistática de la BAL G contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato agar PDA y (b) su control	45
Figura 8-15: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato agar PDA	45
Figura 8-16: (a) Actividad fungistática de la BAL A contra <i>Fusarium 14</i> en sustrato agar PDA y (b) su control	46
Figura 8-17: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 14</i> en sustrato agar PDA	46

Figura 8-18:	(a) Actividad fungistática de la BAL E contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato agar PDA y (b) su control.....	47
Figura 8-19:	(a) Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato agar PDA.....	47
Figura 8-20:	(a) Actividad fungistática de la BAL G contra <i>Fusarium 22</i> en sustrato agar PDA y (b) su control.....	48
Figura 8-21:	Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra <i>Fusarium 22</i> en sustrato agar PDA	48
Figura 8-22:	Prueba O/F (Oxidación-Fermentación) y tinción de Gram de la BAL G .	51
Figura 8-23:	Actividad fungistática (medida como porcentaje de reducción del crecimiento de los hongos) de <i>W. confusa</i> contra 5 especies de <i>Fusarium</i> en sustrato MRS	52
Figura 8-24:	Actividad fungistática (medida como porcentaje de reducción del crecimiento de los hongos) de <i>W. confusa</i> contra 5 especies de <i>Fusarium</i> en sustrato PDA	53
Figura 8-25:	Cinética de producción de ácido láctico, ácido acético y consumo de azúcares de <i>W. confusa</i> durante 48 horas de fermentación.....	56
Figura 8-26:	Cinética de producción de biomasa y unidades formadoras de colonias por mililitro de <i>W. confusa</i> durante 48 horas de fermentación.....	58
Figura 8-27:	Cinética de producción de ácido láctico, ácido acético y consumo de azúcares de la BAL G durante 48 horas de fermentación.....	59
Figura 8-28:	Cinética de producción de biomasa y unidades formadoras de colonias por mililitro de la BAL G durante 48 horas de fermentación.....	61
Figura 8-29:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de <i>W. confusa</i> contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato MRS.....	62
Figura 8-30:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de <i>W. confusa</i> contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato MRS.....	62
Figura 8-31:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de <i>W. confusa</i> contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato PDA.....	64
Figura 8-32:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de <i>W. confusa</i> contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato PDA.....	65
Figura 8-33:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato MRS.....	66
Figura 8-34:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato MRS.....	67
Figura 8-35:	Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra <i>Fusarium 54</i> en sustrato PDA.....	68

Figura 8-36: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (S1: bacteria o fermentado, S2: sobrenadante y S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra <i>Fusarium 17</i> en sustrato PDA.....	69
Figura 8-37: Cambios Morfológicos en <i>Fusarium 54</i> y <i>17</i> durante las pruebas de actividad fungistáticas con biomasa (S3) de <i>W. confusa</i> obtenida en el tiempo 8 de fermentación	76
Figura 8-38: Cambios Morfológicos en <i>Fusarium 54</i> durante las pruebas de actividad fungistáticas con fermentado (S1) y biomasa (S3) de la BAL G obtenidas en el tiempo 4 de fermentación.....	77
Figura 8-39: Cambios Morfológicos en <i>Fusarium 17</i> durante las pruebas de actividad fungistáticas con fermentado (S1), sobrenadante (S2) y biomasa (S3) de la BAL G obtenidas en el tiempo 4 de fermentación	78
Figura 8-40: Amplificación por PRC de un fragmento de 700pb del gen ribosomal 16S. M, marcador de peso molecular 1Kb; 1 y 2, DNA genómico de <i>W. confusa</i> ; 3 y 4, DNA genómico de la BAL G.....	80

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 7-1. Modificación de Cowan y Steel para identificación de bacterias heterótrofas.	28
Tabla 8-1: Aislamiento de bacterias ácido-lácticas de cultivos de pitahaya amarilla sanos y afectados con podredumbre basal	38
Tabla 8-2: Porcentaje de inhibición consolidado de BAL aisladas de cultivos de pitahaya amarilla contra 5 especies de <i>Fusarium</i>	50
Tabla 8-3: Identificación bioquímica de BAL G	51
Tabla 8-4: Análisis blastn del gen ribosomal 16S de <i>W. confusa</i> realizado en el programa CLC Main Workbench 7.0.....	81
Tabla 8-5: Análisis blastn del gen ribosomal 16S de la BAL G realizado en el programa CLC Main Workbench 7.0.....	82

Introducción

En Colombia el cultivo de pitahaya amarilla es de gran importancia económica ya que ofrece posibilidades atractivas de mercadeo como fruta fresca y procesada, permitiendo posibilidades de entrada a nuevos productores. La fruta posee propiedades funcionales y medicinales que la convierten en un producto de gran aceptación y con una demanda creciente en países como Estados Unidos, Francia, Alemania, Holanda y Japón. Sin embargo Colombia ha tenido dificultades en aprovechar estas ventajas y oportunidades, debido a que el cultivo es afectado por diferentes microorganismos, y no se cuenta con tecnologías innovadoras que ayuden a disminuir los impactos ocasionados por algunos de ellos, tal es el caso del hongo *Fusarium*, donde algunas de éstas especies están asociadas a la pudrición basal en frutos de pitahaya amarilla. Una alternativa de solución a la afección de los cultivos de pitahaya por el hongo *Fusarium*, es el uso de microorganismos con propiedades antagonicas contra patógenos de plantas.

Según Propitaya, en el 2006 se cultivaron 700 hectáreas en pitahaya, con una producción estimada de 2000 toneladas anuales, sin embargo el cultivo ha sido afectado por enfermedades como, la pudrición basal del fruto ocasionada por especies del hongo *Fusarium*. La pudrición basal en frutos de pitahaya amarilla inicia con una lesión amarilla sobre la base del fruto, con un diámetro de máximo cinco milímetros en el sitio donde éste se une a la penca. A medida que la enfermedad va desarrollándose sobre la epidermis del fruto la lesión va tomando color café. La velocidad del desarrollo de la enfermedad depende de las condiciones ambientales y nutricionales de la planta (Corpoica *et al.*, 2013). Para reducir las pérdidas económicas ocasionadas por este microorganismo se ha recomendado la aplicación de fungicidas y fertilizantes químicos durante cada una de las etapas de crecimiento de la planta (Fei *et al.*, 2004). Sin embargo este tipo de tratamientos acarrear desventajas para el agricultor, consumidor y para el medio ambiente, entre sus principales desventajas están la pérdida de nutrientes y micronutrientes secundarios presentes en el suelo (Quintero, 1997).

El control biológico es un método de control de enfermedades a través de organismos vivos. En pitahaya amarilla se ha utilizado especies del género *Trichoderma sp* y cepas de hongos micorrícicos. Además de este método de control, los agricultores también realizan control de malezas, aplicación de fertilizantes y podas sanitarias (ICA, 2012). Una opción de control biológico en pitahaya amarilla es el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son conocidas hace muchos años por su potencial de preservación en alimentos, además de que ayudan a incrementar la viscosidad y la textura de productos fermentados. Las propiedades bio-preservativas se le atribuyen a la capacidad que tienen de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y algunas especies de hongos (Lavermicocca *et al.*, 2000; Magnusson *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2007).

Por lo anterior, en el presente trabajo a partir de cultivos de pitahaya amarilla afectados con pudrición basal, se aisló bacterias ácido-lácticas y se seleccionó la bacteria que presentó mayor actividad fungistática a contra especies de *Fusarium*. Adicionalmente se evaluó In vitro la actividad fungistática de *Weissella confusa*, una BAL aislada de líquido ruminal bovino contra especies de *Fusarium*. La bacteria que mayor actividad fungistática presentó contra el hongo en mención y *W. confusa* se caracterizó molecularmente. Los hongos utilizados en esta investigación se aislaron de cultivos de pitahaya amarilla afectados con pudrición basal, en estudios previos realizados en la Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira (resultados en proceso de escritura) por el profesor Eyder Daniel Gómez y su equipo investigador.

1. Planteamiento del problema

Para Colombia la cadena productiva de la pitahaya amarilla es promisoría dado que presenta un alto dinamismo en el mercado nacional y tiene gran potencial de demanda internacional, lo cual es atribuido a características como sabor dulce y suave, y alto contenido en vitaminas y fibra; sin embargo, el cultivo es atacado por microorganismos de diferentes géneros, especialmente por *Fusarium* que producen podredumbre basal del fruto y ocasionan pérdidas poscosecha importantes. Una propuesta para el control de este hongo patógeno, es el uso de bacterias ácido lácticas y/o de sus metabolitos antimicrobianos.

En Colombia, la producción de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) es de gran importancia socioeconómica, dado que es considerada como una fruta promisoría de exportación, la cual se cultiva para comercialización nacional e internacional, en los departamentos de Boyacá, Valle del Cauca, Bolívar, Huila, Santander, Cundinamarca, Quindío, Risaralda, Caldas y Tolima. En 2009, de un total de 827 hectáreas cultivadas, se encontró como mayor productor por área a Boyacá (40,3 %), seguido por Valle del cauca (28.5 %), Bolívar (9.1 %), Huila (8.1 %), Santander (5.9 %), Cundinamarca (4.8 %), Quindío (1.5 %), Risaralda (1 %), Caldas (0.6 %) y Tolima (0.2 %) (Tafur *et al.*, 2006).

En la actualidad, uno de los principales problemas en cultivos de pitahaya amarilla en Colombia es la contaminación por microorganismos patógenos, como bacterias y hongos, que en muchas ocasiones causan pérdida total del fruto. Dentro de los microorganismos que causan enfermedades en pitahaya amarilla se encuentran, *Erwinia carotovora* que se presenta en el fruto con pequeñas manchas amarillas que cubren el tallo y provocan putrefacción (Barras *et al.*, 1994), y degradación de la pared celular de la planta. Los hongos son otro importante agente patógeno causante de enfermedades en este cultivo, entre los cuales están, *Colletotrichum gloeosporioides* y especies de *Fusarium*, ambos afectan flores tropicales, frutas y vegetales (Dodd *et al.*, 1992).

En algunas regiones de Colombia se han registrado daños severos en cultivos de pitahaya amarilla causados por géneros de *Fusarium*, el cual es considerado como uno de los principales agentes patógenos causante de enfermedades en plantas. Estas especies son responsables de diversas alteraciones en las plantas, incluyendo marchitez, pudrición de raíces y tallos (Toruño, 1999). Entre las pudriciones más relevantes en pitahaya amarilla se encuentran las inducidas por este hongo, que provoca pudrición basal en el fruto y por consiguiente decrecimiento en producción y calidad (Wright *et al.*, 2007). *Fusarium* posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo hasta por seis años, su crecimiento es favorecido a temperaturas cálidas; también son capaces de colonizar el suelo e introducirse del xilema a toda la planta (González, 2003; Jones y Dang, 2006; Houterman *et al.*, 2008).

La pudrición basal en pitahaya amarilla, causada por especies de *Fusarium*, se encuentra distribuida en todos los departamentos de Colombia donde se cultiva la fruta, provocando pérdidas económicas importantes a los agricultores. *Fusarium*, además de inducir pudrición basal en pitahaya amarilla, puede producir diversas toxinas potencialmente riesgosas y de importancia económica y sanitaria (Desjardins *et al.*, 1994).

Una alternativa de control biológico contra hongos y bacterias, es la utilización de microorganismos antagónicos, como las bacterias ácido lácticas. El uso de bacterias ácido lácticas (BAL) han despertado la atención de investigadores como agentes de biocontrol contra bacterias y hongos patógenos causantes de enfermedades en animales y plantas. La actividad antagónica de estas bacterias se pueden explicar por la capacidad que tienen de producir metabolitos como, ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, reuterinas y bacteriocinas (Madigan *et al.*, 2004).

En este sentido, esta investigación busca responder estas preguntas: ¿Podrán bacterias ácido-lácticas aisladas y seleccionadas de cultivos de pitahaya amarilla afectados con pudrición basal, ejercer actividad fungistática contra especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en pitahaya amarilla? ¿Existirán diferencias estadísticamente significativas entre la actividad fungistática de *W. confusa*, la bacteria ácido láctica seleccionada y los metabolitos que estas producen; contra especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en pitahaya amarilla?

2. Justificación

Existen varias normas para la citación bibliográfica. Algunas áreas del conocimiento prefieren normas específicas para citar las referencias bibliográficas en el texto y escribir la lista de bibliografía al final de los documentos. Esta plantilla brinda la libertad para que el autor de la tesis utilice la norma bibliográfica común para su disciplina. Sin embargo, se solicita que la norma seleccionada se utilice con rigurosidad, sin olvidar referenciar “todos” los elementos tomados de otras fuentes (referencias bibliográficas, patentes consultadas, *software* empleado en el manuscrito, en el tratamiento a los datos y resultados del trabajo, consultas a personas (expertos o público general), entre otros).

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) es una fruta exótica originaria del trópico suramericano, caracterizada por su sabor y olor agradable, y considerada en Colombia como una fruta promisoriosa para el mercado Internacional y Nacional (Gómez *et al.*, 2004; Le-Bellec *et al.*, 2006). Posee propiedades medicinales de aceptación en el mercado que incrementan su precio en el mercado internacional (Nerd *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2006), sin embargo durante la poscosecha es afectada principalmente por bacterias y hongos tales como, *E. carotovora*, *C. gloeosporioides* y especies del género *Fusarium*, dentro de los cuales se destaca la especie *F. oxysporum*, el cual es considerado como el principal patógeno causante de pudrición basal en el fruto, y por consiguiente genera pérdidas económicas importantes para agricultores.

Para el control de estos hongos y bacterias se han desarrollado métodos físicos y químicos, como la utilización de fungicidas, fumigantes, fertilizantes químicos, sin embargo, estos productos desarrollan fungo-resistencia, contaminación ambiental, toxicidad y pérdida de nutrientes y micronutrientes secundarios presentes en el suelo. Por ello la búsqueda de nuevas estrategias que ayuden a disminuir el crecimiento de estos hongos es de gran interés para agricultores e investigadores. Se han estudiado alternativas biológicas, como el uso de otros microorganismos, entre ellos bacterias ácido lácticas, las cuales producen sustancias anti-microbianas como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estas sustancias son producidas como un

mecanismo de estrategia de las BAL y pueden ser letales para el sistema inmune de los microorganismos que se encuentren en un mismo hábitat.

Las BAL además de producir compuestos antimicrobianos, también son capaces de producir metabolitos antifúngicos como, propionato, fenillactato, hidroxifenillactato, péptidos cíclicos y ácidos grasos 3-hidroxi. Se ha encontrado diversos reportes de la actividad antibacteriana de bacteriocinas y otros compuestos producidos por BAL, sin embargo hay pocos reportes de su actividad anti-fúngica (Mauch *et al.*, 2010; Ndagano *et al.*, 2011). En estudios recientes se ha reportado bacterias ácido lácticas inoculadas con especies del género *Fusarium*, como, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, encontrando actividad inhibitoria contra todas estas especies de hongos. Sin embargo, hace falta evaluar el poder inhibitorio de BAL frente a microorganismos causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla. También podría pensarse en futuros estudios determinar qué tipo de metabolitos intervienen directamente en la inhibición.

La relevancia social de esta investigación es proporcionar herramientas de información para estudiantes de pregrado, posgrado, profesionales en acción, investigadores interesados en el área y agricultores, sobre una alternativa de control biológico que puede desarrollarse para combatir microorganismos patógenos causantes de enfermedades en pitahaya amarilla. Con ello se puede disminuir las pérdidas en producción de fruta y recuperar el mercado nacional e internacional que han perdido la confianza en un producto seguro.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad fungistática de *Weissella confusa* (bacteria ácido láctica aislada de rumen bovino) y de bacterias ácido-lácticas aisladas de cultivos de pitahaya amarilla, contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla, determinar las cinéticas de fermentación, y caracterizar molecularmente algunas de las bacterias ácido-lácticas.

3.2 Objetivos específicos

Evaluar in vitro la actividad fungistática de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de cultivos de pitahaya amarilla y seleccionar la que presente la mayor actividad fungistática contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla.

Evaluar in vitro la actividad fungistática de *W. confusa* (bacteria ácido láctica aislada de rumen bovino) contra especies de *Fusarium*, causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla.

Determinar las cinéticas de fermentación de *W. confusa* y de la bacteria ácido-láctica seleccionada en el objetivo 1, y la cinética de actividad fungistática de éstas dos bacterias, su biomasa y su sobrenadante contra especies de *Fusarium*.

Caracterizar molecularmente *W. confusa* y la bacteria ácido-láctica seleccionada en el objetivo 1.

4. Hipótesis

4.1 Hipótesis nula (H0)1: Bacterias ácido-lácticas aisladas y seleccionadas de cultivos de pitahaya amarilla afectados por pudrición basal, no poseen actividad fungistática In vitro contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal en pitahaya amarilla

4.2 Hipótesis alternativa (Ha)1: Bacterias ácido-lácticas aisladas y seleccionadas de cultivos de pitahaya amarilla afectados por pudrición basal, poseen actividad fungistática In vitro contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal en pitahaya amarilla.

4.3 Hipótesis nula (H0)2: *W. confusa*, no posee actividad fungistática In vitro contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal en pitahaya amarilla.

4.4 Hipótesis alterna (Ha)2: *W. confusa*, posee actividad fungistática In vitro contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal en pitahaya amarilla.

4.5 Hipótesis nula (H0)2: No existe diferencias estadísticamente significativas entre la actividad fungistática de *W. confusa*, su biomasa y su sobrenadante; contra especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en pitahaya amarilla.

4.6 Hipótesis alternativa (Ha)2: Existe diferencias estadísticamente significativas entre la actividad fungistática de *W. confusa*, su biomasa y su sobrenadante; contra especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en pitahaya amarilla.

4.7 Hipótesis nula (H0)2: No existe diferencias estadísticamente significativas entre la actividad fungistática de la bacteria ácido-láctica seleccionada, su biomasa y su sobrenadante; contra especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en pitahaya amarilla.

4.8 Hipótesis alternativa (Ha)₂: Existe diferencias estadísticamente significativas entre la actividad fungistática de la bacteria ácido-láctica seleccionada, su biomasa y su sobrenadante; contra especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en pitahaya amarilla. Se deben incluir tantos capítulos como se requieran; sin embargo, se recomienda que la tesis o trabajo de investigación tenga un mínimo 3 capítulos y máximo de 6 capítulos (incluyendo las conclusiones).

5. Antecedentes

La literatura científica reporta un número reducido de investigaciones, en las cuales se reporta la actividad anti-fúngica de bacterias ácido-lácticas contra otros microorganismos que se han relacionado como causantes de enfermedades en plantas. A continuación se presentan en orden cronológico investigaciones realizadas en el tema.

Gourama y Bullerman 1995, demostraron que una mezcla de especies de *Lactobaccillus*, crecidas en un inoculo comercial de ensilaje redujeron el crecimiento de *Aspergillus flavus* y la producción de sus aflatoxinas. El sobrenadante del caldo de fermentación de las especies de *Lactobacillus ssp.* inhibieron el crecimiento del hongo, pero no destruyeron la viabilidad de las esporas producidas por el hongo.

Niku-Paavola *et al.*, 1999, encontraron compuestos antimicrobianos en cultivo filtrado de *Lb. plantarum* VTTD-80147. Estos compuestos por separado en concentraciones de 10 ppm inhibieron el 10-15 % del crecimiento *F. avenaceum* VTT-D-80147. Cuando son aplicados conjuntamente con 1 % de ácido láctico inhiben el 100 % del crecimiento del microorganismo patógeno en mención.

Okkers *et al.*, 1999, Aislaron de secreción vaginal de una paciente en estado prenatal, *Lb. pentosus* TV35b, el cual produce un péptido parecido a bacteriocina. También encontraron que este compuesto posee actividad contra *Clostridium sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. sake*, *Listeria innocua*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium sp.* y *Candida albicans*. El péptido fue purificado con precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose. El tamaño molecular del péptido fue estimado entre 2.35 y 3.4 kDa.

Laitila *et al.*, 2002 encontraron que *Lb. plantarum* strains VTTE-78076 y VTTE-79098 fueron activas contra especies de *Fusarium* aisladas de maíz y cebada, como, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. oxysporum*. Sin embargo, entre especies y cepa se observó gran variación de la inhibición del crecimiento del hongo. El efecto anti-fúngico dependió en gran medida del nivel de contaminación y de las especies de hongos.

Ryan *et al.*, 2008, emplearon BAL en pruebas para reducir el propionato de calcio usado en la conservación de pan. Los resultados de este estudio muestran poder anti-fúngico de *Lb. plantarum* aislado de cereales, contra *A. niger*, *F. culmorum* y *Penicillium expansum*. También reportan que el crecimiento de las esporas de *P. roqueforti* no se vio afectada. Los ensayos se realizaron con adición por separado de propionato de calcio y *Lb. plantarum* a la masa madre del pan. Pero se observó un efecto sinérgico cuando se adicione el propionato de calcio y el microorganismo conjuntamente. Los autores concluyen que la adición de anti-fúngicos a la masa madre del pan puede reducir los niveles de aditivos químicos y garantiza la seguridad microbiológica del pan.

Pal y Ramana, 2009, purificaron una sustancia no proteica producida por *Weissella paramesenteroides* DFR-8, bacteria aislada de pepino (*Cucumis sativus*). Esta sustancia no es sensible a enzimas como lipasa, amilasa y catalasa, pero mostró actividad antagónica contra un amplio espectro de patógenos, incluyendo microorganismos Gram negativos. La molécula tiene una masa de aproximadamente 2.5 kDa y es termoestable a pH 4. Los autores concluyen que el amplio espectro de inhibición y la estabilidad del compuesto producido por esta bacteria son una alternativa para la preservación de alimentos.

Mauch *et al.*, 2010, aislaron 129 bacterias ácido lácticas de cerveza de cebada para probar su actividad anti-fúngica contra especies de *Fusarium*. Encontrando a *Lb. brevis* PS1, como el microorganismos que produjo mayor espectro de inhibición contra estos hongos y consecuentemente fue seleccionado para pruebas contra *F. culmorum*. Estas pruebas se realizaron con el sobrenadante libre de células y liofilizado (SLCL), encontrando que la presencia del 10 % de SLCL inhibió completamente el crecimiento del microorganismo. La actividad de los componentes producidos por *Lb. brevis* PS1 Fue

más alto a valores de pH bajos (pH<5). También se obtuvo que los tratamientos térmicos y/o proteolíticos reducen la actividad inhibitoria del SLCL. Los autores concluyen que los ácidos orgánicos y los componente proteicos producidos por *Lb. brevis* PS1 son activos contra especies de *Fusarium*.

Serna-Cock *et al.*, 2010, reportaron actividad antimicrobiana de *W. confusa*, bacteria aislada de líquido ruminal bovino, contra patógenos productores de mastitis bovina como, *S. aureus* y *S. agalactiae*.

Loaiza y Rubiano, 2011, también encontraron que *W. confusa* es activa contra *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, bacterias aisladas de humanos.

Ndagano *et al.*, 2011, reportaron la actividad anti-fúngica de *W. cibaria*, la cual se aisló de harina fermentada de yuca. Se encontró que la bacteria produjo, ácido 2-hidroxi-4-metilpentanoico, y otros ácidos orgánicos, los cuales fueron causantes de la actividad anti-fúngica. Sin embargo, la concentración producida en el sobrenadante libre de células era demasiado baja en comparación con su concentración mínima de inhibición. Los autores sugieren que la actividad inhibitoria fue causada por una sinergia de estos compuestos diferentes.

Crowley *et al.*, 2013 encontraron que *W. confusa* y *Lb. plantarum* tienen efecto antagonico contra *P. Expansum* en pera. También reportaron que *P. pentosaceus* 54 retardo el crecimiento del hongo en mención.

6. Marco teórico

6.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen filogenéticamente a la subdivisión de bacterias Gram positivas con bajo contenido en GC, su morfología celular está dada en cocos o bacilos agrupados en cadenas o tétradas. Estas bacterias originan ácido láctico como único producto (homofermentativas) y otros compuestos además de ácido láctico como etanol, diacetilo, ácido acético, y CO₂ (heterofermentativas) a partir de la fermentación de hidratos de carbono. Además se distinguen porque obtienen la energía únicamente mediante fosforilación a través del sustrato y porque pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, por esta razón se les considera como anaerobios aerotolerantes (Madigan *et al.*, 2004).

Los géneros pertenecientes a este grupo de bacterias tales como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Enterococcus* desarrollan un papel importante en la industria de alimentos fermentados, ya que ejercen actividad antimicrobial contra patógenos, lo cual ayuda a prolongar la vida útil de un producto y a conservar sus propiedades organolépticas (Van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007). Según Magnusson *et al.* (2003) tres mecanismos pueden explicar la actividad antimicrobial de las BAL; la producción de ácidos orgánicos, competencia por nutrientes y la producción de compuestos antagonistas. Por lo tanto, las BAL son consideradas agentes biopreservativos seguros para el consumo humano.

Muchas cepas de BAL son utilizadas ampliamente en la manufactura de productos alimenticios, como por ejemplo en la industria de panificación para contribuir al aroma y textura del producto final (De Vuyst y Vancanneyt, 2007). También son empleados como cultivos iniciadores en productos cárnicos (Messi *et al.*, 2001) y en alimentos funcionales como es el caso de probióticos (Topisirovic *et al.*, 2006); dichos productos traen consigo beneficios en la salud humana, ya que regulan la flora intestinal, previenen infecciones

por bacterias enteropatógenas y se utilizan en el tratamiento y prevención de diarrea (Mohd Adnan y Tan, 2007).

También se ha demostrado que las BAL son capaces de producir efecto antagónico contra hongos, Lavermicocca *et al.* (2000) encontraron disminución en el crecimiento de *A. niger* cuando se realizaron fermentaciones de pan con *Saccharomyces cerevisiae* y *Lb. plantarum*, en comparación con el control preparado sólo con *S. cerevisiae*. Los autores sugieren que la actividad inhibitoria de BAL puede ser consecuencia de producción de ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, el diacetilo, reuterina y otros metabolitos de bajo peso molecular.

Autores han reportado la capacidad de las BAL de producir simultáneamente ácido orgánicos, como en el caso de *Lb. san franciscensis*, que produce una mezcla de ácido acético, fórmico, propiónico, pentanóico, hexanóico; otras especies como *Lb. plantarum*, *Lb. coryniformis*, *Lb. sakei* y *Pediococcus pentosaceu* son capaces de producir ácido feniláctico, los cuales a altas concentraciones pueden inhibir diversas especies de hongos (Corsetti *et al.*, 1998; Lavermicocca *et al.*, 2000; Ström *et al.*, 2002; Magnusson *et al.*, 2003)

Se ha encontrado que el compuesto β -hydroxypropionaldehyde (reuterina), producido por *Lb. reuteri* presenta actividad anti-fúngica contra especies como *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Talarico *et al.*, 1988; Chung *et al.*, 1989).

Otra importante aplicación de las BAL es como productoras de bacteriocinas, las cuales por muchos años han sido tema de concentración de diversos investigadores. El interés creciente sobre el hallazgo de bacteriocinas puede ser debido a su efecto antimicrobiano que tienen estas sustancias contra patógenos de especial importancia en la industria de alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y otros. Estos compuestos son generados durante o al final de la fase exponencial de crecimiento (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1997) y se han encontrado en casi todas las especies microbianas, que forman parte de diferentes ambientes naturales como el de algunos alimentos, tejido vegetal, superficies mucosas, tracto intestinal de humanos y animales (Majhenič *et al.*, 2004).

6.1.1 Ácidos orgánicos

Diversos ácidos orgánicos son producidos durante la fermentación de BAL, ácido láctico, acético, propiónico, fórmico, butírico, benzoico y fenil láctico (El-Ziney, 1998). El mecanismo de acción de estos compuestos es causar daño en la membrana del patógeno a través de la neutralización del gradiente electroquímico causando muerte celular (Batish *et al.*, 1997). Baek *et al.* (2012) demostraron que el ácido acético y láctico producido por *Leuconostoc citreum* y *W. confusa* fueron potentes en la inhibición de *Clostridium sp. YS1*, *Neurospora sp. YS3* y *P. crustosum YS2*.

6.1.2 Peróxido de hidrógeno

Algunas BAL producen peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno, sin embargo no son capaces de degradarlo, lo que provoca acumulación de este compuesto y a su vez éste oxida la membrana lipídica y proteínas celulares de otros microorganismos (Kandler, 1983; Lindgren y Dobrogosz, 1990). Autores encontraron que una concentración del 5 % de peróxido de hidrógeno inhibe completamente el crecimiento de *P. expansum* en manzana, sugiriendo que la aplicación de pequeñas cantidades del compuesto en la fruta puede ser una alternativa al uso de fungicidas contra el microorganismo patógeno (Venturini *et al.*, 2002). Schnürer y Magnusson (2005) encontraron que la adición de peróxido de hidrógeno en cantidades mínimas en leche reduce el crecimiento de microorganismos indeseables.

6.1.3 Reuterina

La reuterina (β -hidroxipropionaldehído) es un compuesto producido por *Lb. Reuteri*, *Lb. brevis*, *Lb. Buchneri*, entre otras BAL (Chung *et al.*, 1989; Schütz y Radler, 1984). Se ha reportado que es capaz de inhibir el crecimiento de hongos patógenos como *Fusarium* (Chung *et al.*, 1989). Magnusson (2003), reporta que el glicerol incrementa la actividad inhibitoria de BAL.

6.1.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas sintetizadas ribosomalmente, producidas por diversas especies de bacterias incluyendo bacterias ácido lácticas y con capacidad de

inhibir otras bacterias estrechamente relacionadas (Tagg *et al.*, 1976; Gálvez *et al.*, 2007).

Magnusson y Schnürer (2001), encontraron que un compuesto proteico producido por *Lb. coryniformis subsp. coryniformis* cepa Si3 presento actividad antifungal contra varios hongos y levaduras. Gupta *et al.* (2014) reportan la actividad fungistática de péptidos antimicrobianos producidos por *Lb. plantarum* contra *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus* y *Penicillium chrysogenum*.

6.2 Factores que afectan la actividad antifungal

6.2.1 Temperatura y periodo de incubación

La temperatura y el periodo de incubación son factores importantes en el crecimiento de BAL y la producción de metabolitos antagonistas (Batish *et al.*, 1997). Cho *et al.* (2006) reportan que fermentaciones con BAL son afectadas principalmente por la temperatura. Sathe *et al.* (2007) obtuvo máxima actividad antifungal de 1280 AU/mL en fermentaciones a 30 °C con *Lb. plantarum* CUK501, lo cual ocurrió al final de su fase logarítmica. También observaron un decrecimiento en dicha actividad cuando el microorganismo se encontró en su fase estacionaria de crecimiento.

6.2.2 Compuestos nutricionales

En estudios se ha encontrado que el extracto de levadura, la glucosa, NaCl y CaCl₂ modulan la producción de sustancias antifungales producidas por *P. Acidilactici* y *Lb. rhamnosus*. Una concentración de extracto de levadura de 1.5 % produjo efecto positivo sobre la actividad antifungal de ambas BAL, así como la adición de CaCl₂ al sustrato de crecimiento (Effat *et al.*, 2001). Cheong *et al.* (2014) evaluaron el efecto del acetato de sodio sobre la actividad antifungal de BAL, encontrando que la ausencia de este compuesto en sustrato MRS afectaba negativamente la inhibición de hongos. Crowley *et al.* (2013) reportaron que a diferentes concentraciones de NaCl la actividad antifungal de BAL es estable.

6.2.3 pH

El pH es un factor crítico en la producción de metabolitos que está relacionado con el sustrato, el periodo de incubación, temperatura y el tipo de cepa (Gourama y Bullerman, 1995; Batish *et al.*, 1997; Sathe *et al.*, 2007). Alonso demostraron que *Lb. casei* bajo condiciones no controladas de pH (pH <3.6) no perdió su capacidad de producción de ácido láctico. En otros estudios se obtuvo una máxima actividad antifungal de BAL a pH 4 (Crowley *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2010) evaluaron el efecto pH sobre la actividad antibacteriana de *Lb. fermentum*, encontrando alta actividad inhibitoria sobre bacterias patógenas en sustrato MRS a las 36 horas de fermentación a un pH 4.

6.3 Generalidades de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*)

6.3.1 Descripción botánica

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) es una planta perenne, de conformación arbustiva, perteneciente a la familia de las cactáceas. Posee raíces principales de fijación, raíces secundarias y superficiales y raíces adventicias, que se producen sobre los lados planos de los tallos. Posee un tallo suculento que cumple funciones de fotosíntesis, de recepción y regulación de agua, tiene tres aristas con areolas en sus bordes, de donde nacen espinas y flores. La flor es tubular, hermafrodita, con ovario en la parte inferior, con un sólo lóbulo, una cámara nectarial, numerosos estambres, brácteas y pétalos blancos, amarillos o rosados. Las primeras floraciones ocurren al inicio de las lluvias, después de ser polinizadas toman posición colgante. El fruto es una baya ovoide con partes externas en forma de mamila, mide de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de diámetro, la pulpa es traslúcida y dulce con presencia de semillas negras digeribles, su cáscara puede ser de color rojo o amarillo (Profiagro, 2007).

6.3.2 Producción

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) es cultivo originario de países tropicales con climas secos, de temperaturas entre 18 y 28 °C y con altitudes entre los 30 y 1900 m (Mizrahi y Nerd 1997). Esta fruta se cultiva en Colombia, Israel, Brasil, Ecuador, Perú, Guatemala, México, Nicaragua, Panamá y otros países; donde Colombia es el primer

productor con el 76.3 % del área cultivada en el mundo con esta especie, seguida de Israel con 9.2 %, Brasil con 3.2 % y el resto de países con 11.3 %; además ocupa el 7.8% del total del área en pitahayas. Colombia e Israel representan el 64.4 % de la exportación total del 2009 (Nerd *et al.*, 2002; Ministerio de Fomento Industria y Comercio de Nicaragua, 2006, MADR, 2006). En el periodo 2004-2009, Colombia exporto pitahaya amarilla principalmente a Alemania, Francia y Holanda, lo que representó el 70.7 % de las exportaciones de la fruta. El crecimiento promedio anual de las exportaciones de pitahaya entre el 2005 y el 2007 fue del 9 %, incrementándose de USD 824.329 a USD 968.305. (Legiscomex, 2008).

La producción de pitahaya amarilla a nivel nacional se distribuye principalmente en el Valle del Cauca, Boyacá, Cundinamarca, Huila y Santander, siendo Boyacá el departamento con mayor área cultivada, correspondiente a 333 hectáreas que equivalen al 40.3 % del área cultivada, seguido por el Valle del cauca con 28.5 % (Gobernación de Boyacá, 2010).

La producción de pitahaya en Colombia es estacional, con dos cosechas al año, una de febrero a marzo y la otra de julio a agosto, por lo que hay épocas de sobreoferta y épocas de escasez. Los cultivos de Tolima son los primeros en iniciar la cosecha, seguidos por los de Valle del Cauca y Cundinamarca y, por último, los de Boyacá (Espinal *et al.*, 2005).

6.3.3 Enfermedades y plagas

En Colombia, la producción de pitahaya amarilla se ha visto afectada por diversos patógenos, incluyendo especies de 24 hongos, 52 Artrópodos, 17 Nemátodos, 3 moluscos y una bacteria (USDA, 2002). Entre los principales patógenos se encuentran, especies de *Colletotrichum* causante de antracnosis, especies de *Dothiorella* causantes de ojo de pescado del tallo, especies de *Drechslera cactivora* causantes de pudrición seca del tallo, especies de *Erwinia* causantes de pudrición suave del tallo y *F. oxysporum* causante de pudrición basal del fruto (Varón 2004, 2006). Sin embargo, se ha reportado que existen otros microorganismos asociados a la podredumbre basal del fruto (Gómez, en proceso de publicación).

La pudrición basal del fruto y la pudrición de tallo han generado pérdidas de fruta exportable superiores al 80 % y los costos por control de la enfermedad incrementan en un 50 %. En el Valle del Cauca en los municipios de Darién y Roldanillo la principal limitante es la pudrición basal del fruto, la cual ha registrado una incidencia superior al 70 %; esta enfermedad afecta la apariencia externa del fruto dificultando su comercialización en el mercado nacional e internacional (Varón, 2006).

La pudrición basal del fruto causada por un complejo del hongo *Fusarium*, ocasiona la aparición de pústulas en la base del pedúnculo (sitio de unión del fruto con la penca) y con los días se desarrolla el color amarillado y el ablandamiento en esa zona del fruto; en estado avanzado la zona afectada sufre necrosis, lo que produce la muerte de la planta. Esta enfermedad cuando no se previene, maneja y controla oportunamente causa daños hasta del 70 % y cuando causa daños mínimos es descalificada por comercializadores y exportadores, quienes la compran con un menor precio. Este patógeno también causa pudriciones de raíz y avanza de forma sistémica en la planta causando pudriciones en todas las pencas, que en algunas ocasiones actúa penetrando la penca (MADR, 2010).

6.4 Fusarium

El género *Fusarium* comprende una amplia gama de hongos, los cuales son patógenos de una gran variedad de plantas bajo ciertas condiciones ambientales. Este hongo es causante de enfermedades como tizón de plántulas, pudrición de raíz, fusariosis y pudrición de mazorca de maíz (Sutton, 1982; Parry *et al.*, 1995). Entre las especies fitopatógenas de *Fusarium* incluyen, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum* y otros (Sutton, 1982; Parry *et al.*, 1995; Miedaner, 1997; Tekauz *et al.*, 2000; Brennan *et al.*, 2003).

La gran mayoría de las especies de *Fusarium* tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios denominados micotoxinas, las cuales son de gran riesgo para la salud humana (Placinta *et al.*, 1999). Entre las micotoxinas producidas por esta especie de hongos tenemos, tricotecenos, fumonisinas, moniliformina y zearalenona (ZEA) (D'Mello *et al.*, 1999). Los trichothecenos son sesquiterpenos tricíclicos, se han reportado dos clases, los tipos A y B, se encuentran comúnmente en los cereales. La fumonisinas

comprende la fumonisina B1 (FB1) y B2 (FB2) y se encuentran comúnmente en el grano de maíz (D'Mello y Macdonald, 1997; D'Mello *et al.*, 1999).

Muchas especies de *Fusarium*, como *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. oxysporum* y *F. sporotrichioides* son productores de tricotecenos y ZEA (D'Mello *et al.*, 1999). *F. sporotrichioides* produce predominantemente trichothecenos tipo A, que incluyen las toxinas T-2, HT-2, neosolaniol, y diacetooxyscirpenol; *F. culmorum* y *F. graminearum* producen predominantemente tricotecenos de tipo B, incluyendo el deoxinivalenol, y sus derivados 3-acetil y 15-acetil y nivalenol. Autores han reportado que la humedad favorece la producción de ambas micotoxinas, sin embargo las temperaturas óptimas para la producción de estos metabolitos parecen ser específicas para el tipo de sustrato que se utilice y especie (Mateo *et al.*, 2002; Martins y Martins 2002).

El crecimiento, la supervivencia y la diseminación del hongo son influenciados por factores ambientales que pueden ser directos o indirectos como efecto en el modo de reproducción o efecto del suelo y tipo vegetación, respectivamente. La temperatura, humedad, intensidad de luz y el viento son uno de los factores más críticos que afectan la producción y la dispersión de los conidios asexuales y ascosporas sexuales (Doohan *et al.*, 2003).

Las condiciones óptimas ambientales para la producción y dispersión del inóculo varía dependiendo del tipo de reproducción, la cual puede ser sexual y / o asexual (Parry *et al.*, 1995; Leslie, 1996).

Los factores como, producción y dispersión del inóculo, germinación, crecimiento, competencia y producción de micotoxinas podría facilitar la patogénesis de plantas por hongos del género *Fusarium*. El clima influye sobre el potencial de incidencia de *Fusarium* y de la enfermedad, donde el desarrollo de la enfermedad varía dependiendo de la especie, tipo de inóculo, virulencia y tipo de tejido afectado (Tekauz *et al.*, 2000; Vigier *et al.*, 1997; Velluti *et al.*, 2000; Bateman y Murray, 2001). Conrath *et al.* (2002) reportan que el estrés osmótico y de temperatura puede indirectamente afectar el desarrollo de la enfermedad, activando el mecanismo de defensa de la planta contra el ataque de patógenos. Sin embargo pruebas in vitro de patogenicidad sugieren que las

especies son un factor más importante que las condiciones climáticas (Brennan *et al.*, 2003).

7. Materiales y métodos

7.1 Evaluación in vitro de la actividad fungistática de bacterias ácido-lácticas aisladas de cultivos de pitahaya amarilla contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*)

7.1.1 Aislamiento de las de bacterias ácido-lácticas de cultivos de pitahaya amarilla

Se seleccionó un lote de cultivo de pitahaya amarilla, afectado con pudrición basal. El lote fue facilitado por la Asociación de productores de pitahaya, Asoppitaya. Se tomó en campo muestras de frutas con podredumbre basal mediante hisopo estéril y posteriormente se transportaron bajo refrigeración al laboratorio de Bio-conversiones de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira donde se procesaron.

A partir de estas muestras se realizaron diluciones de 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-7} en agua peptona al 0.1 % y cada una de ellas se sembraron por duplicado en cajas con agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y con adición de azul de anilina. Las cajas se inocularon por duplicado por siembra en superficie con 0.1 mL de cada una de las diluciones y se incubaron a 33 y 37 °C por 48 horas. Las colonias presuntivas de ser BAL, aquellas que asimilaron el azul de anilina, se repicaron en agar MRS y se incubaron a 33 y 37 °C por 24 horas hasta obtener cultivo puro. Una vez se obtuvieron los cultivos puros, se realizó coloración Tinción de Gram y se determinó su morfología. Las cepas BAL seleccionadas bioquímicamente. Se crio-conservaron con glicerol al 45 % p/v, para posterior uso.

7.1.2 Selección de bacterias ácido-lácticas con actividad fungistática contra especies de *Fusarium*

- Medición de la actividad fungistática de BAL contra especies de *Fusarium*

A todas las cepas de BAL aisladas de cultivos de pitahaya amarilla afectados con *Fusarium*, se les realizó medición de la actividad fungistática.

La actividad fungistática se realizó con 5 cepas de *Fusarium*, 1, 54, 17, 14 y 22 obtenidas en estudios previos realizados por Gómez *et al.* (En proceso de publicación), las cuales mostraron estar asociadas a la podredumbre basal de pitahaya amarilla y que actualmente se conservan en la colección de cultivos del Laboratorio de Citogenética de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Estos hongos se hicieron crecer en agar papa dextrosa (PDA) a 26 °C por 8 días hasta esporulación. Posteriormente se colectaron esporas en tubos de ensayos, se adicionó agua peptona al 0.2% p/v y se agito vigorosamente (Magnusson *et al.*, 2003). Las suspensiones se ajustaron entre 10^4 y 10^5 esporas por mL y se crio-conservaron a -4 °C con adición de glicerol al 40 % v/v hasta su posterior uso.

El conteo de esporas (para realizar el ajuste a 10^4 o 10^5), se realizó por determinación microscópica del número de células usando una cámara de conteo Neubauer.

La actividad fungistática contra especies de *Fusarium* se evaluó en 2 sustratos, agar MRS y agar PDA, utilizando la metodología reportada por Uzair *et al.* (2008) y con algunas modificaciones reportadas por Serna *et al.* (Manuscrito en preparación).

Se tomó 10 μ L de suspensión de esporas (10^4 - 10^5) de la cepa de *Fusarium* y se sembró en el centro de cajas de Petri con 20 mL de agar papa dextrosa (PDA). A una distancia de 1.6 cm se colocó un disco de papel (Whatmann No. 1 de diámetro de 0.8 cm, Clifton, NJ, U.S.A.) que contenía 10 μ L de cultivos de BAL con 24 horas de incubación y a una concentración de 10^9 UFC mL⁻¹. Las cajas de Petri se incubaron a 37 °C por 2 días ya 26

°C por 6 días. Para cada ensayo se utilizó como control discos de papel filtro sin cultivo de la BAL.

El crecimiento del hongo se monitoreo mediante fotografías de los ensayos, para lo cual se utilizó la técnica de fotografía de León *et al.* (2006) con algunas modificaciones. La medición del área de crecimiento del hongo se calculó utilizando el software de evaluación de imágenes (Imagen j 1,40 g, Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, EE.UU).

La actividad fungistática se midió como porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo mediante la Ecuación (7-1).

$$\%I = \frac{CHC-CH}{CHC} * 100 \quad (7-1)$$

Donde, % I: es el porcentaje de inhibición de la especie de *Fusarium*; CH: es el área de crecimiento de la especie de *Fusarium* (cm²); CHC: es el área de crecimiento de la especie de *Fusarium* en el ensayo control (cm²).

- Criterio de selección de la bacteria ácido láctica

Se seleccionaron los hongos más sensibles a la cepa antagonica, luego se escogió la BAL que presentó la actividad fungistática más estable contra las especies de *Fusarium* seleccionados. Para ello, se tomó de referencia la fuente de origen de la BAL, los porcentajes de reducción del crecimiento de los hongos y las desviaciones estándar de cada ensayo.

7.1.3 Caracterización bioquímica de la BAL seleccionada

Para identificar bioquímicamente la bacteria seleccionada se realizó la metodología de producción de Catalasa, Prueba Oxidación-Fermentación y Tinción de Gram (Pineda *et al.*, 2008). Estas pruebas fueron seleccionadas según lo reportado por Cowan y Steel (1979) para bacterias heterótrofas (Tabla 7-1).

Tabla 7-1. Modificación de Cowan y Steel para identificación de bacterias heterótrofas

Reacción de Gram (cultivo fresco).	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Forma.	Coco Racimos	Coco Racimos	Coco Cadenas	Coco Térvadas	Bacilo	Coco pares							
Agrupación.													
Crecimiento aerobio.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento anaerobio.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Esporas.	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Movilidad.	-	-	-	-	-	+o-	+o-	+o-	+o-	+o-	+o-	+	-
Catalasa.	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Oxidasa									+	+	-	+	+
Fermentación de glucosa a ácido o a ácido + gas.	-	+	+	+	+	+(o-)	+	-	-	-	+	+	-
O/F.									-	O	F	F	O
<i>Micrococcus</i>	x												
<i>Staphylococcus</i>		x											
<i>Streptococcus</i>			x										
<i>Lactococcus</i>			x										
<i>Enterococcus</i>			x										
<i>Leuconostoc</i>			x										
<i>Pediococcus</i>			x	x									
<i>Aerococcus</i>				x									
<i>Lactobacillus</i>					x								
<i>Clostridium</i>						x							
<i>Bacillus</i>							x	x					
<i>Alcaligenes</i>									x				
<i>Pseudomonas</i>										x			
Enterobacterias											x		
<i>Aeromonas</i>												x	
<i>Chromobacterium</i>												x	
<i>Neisseria</i>													x

Fuente: Cowan, S.T., y K.J., Steel, 1979.

- Prueba con enzima catalasa.

Se colocó una azada de crecimiento (células de la BAL G) del cultivo sobre un portaobjetos, posteriormente se agregaron 2 gotas de peróxido de hidrógeno y se observó si hubo o no formación de burbujas. El resultado es positivo si hubo formación de burbujas, si sucede lo contrario el resultado es negativo.

- Prueba O/F (Oxidación-Fermentación)

Esta prueba consiste en determinar si un género o especie de bacteria es capaz de degradar un carbohidrato en presencia de oxígeno solamente o si el microorganismo puede degradarlo en presencia o ausencia de él. En el primer caso el organismo se denomina oxidativo (respiración aerobia) y en el segundo fermentativo (respiración aeróbica y/o anaeróbica).

Para ello se utilizó cultivo de Hugh y Leiffson con glucosa al 1 %, indicador de acidez o alcalinidad: Bromotimol azul (coloración amarilla indica pH 6 o menos; coloración azul indica pH de 7 o más).

Del cultivo de la BAL G se inoculo por el método de punción, dos tubos con el sustrato indicado, uno de ellos sin sellar (condiciones aeróbicas) y el otro sellado con parafina (condiciones anaeróbicas). Posteriormente se incubo a 37 °C durante 48 h. Finalmente se observó el crecimiento y la coloración del sustrato.

- Tinción de Gram

Para esta prueba se utilizó un cultivo bacteriano de la BAL G de 24 horas y se realizó el siguiente procedimiento:

Se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio y seco.

Se tomó una asada del cultivo bacteriano a examinar y se disolvió en la gota de agua.

Se hizo un extendido homogéneo procurando que quede una capa fina y se colocó a secar al aire.

Con la ayuda de un mechero, se fijó el cultivo bacteriano al portaobjetos pasándolo rápidamente por la llama.

Luego se tiño el frotis con cristal violeta durante un minuto y se lavó con agua corriente.

Se cubrió con lugol, durante un minuto y se lavó con agua corriente.

Se decoloro con alcohol al 95 % por 10 a 20 s y se lavó con agua corriente.

Se aplicó safranina, durante 30 s y se lavó con agua corriente.

Se dejó secar al aire y se observó con los diferentes objetivos hasta 100X.

Si la bacteria retuvo el colorante básico (violeta), después de completar la tinción, se denomina Gram positiva; si se decolora con el alcohol y toma la safranina, se denomina Gram negativa.

7.2 Evaluar In vitro, la actividad fungistática de *W. confusa* (bacteria ácido láctica aislada de rumen bovino) contra especies de *Fusarium*, causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla

En los experimentos se utilizó una cepa de *W. confusa* crio-conservada, la cual se seleccionó de un grupo de bacterias ácido-lácticas aisladas de líquido ruminal en investigaciones de Serna-Cock *et al.* (2010). La actividad fungistática de *W. confusa* contra las 5 cepas de *Fusarium* descritas en el numeral 7.1.2 se midió de igual forma como se describió el numeral 7.1.2

7.3 Determinar las cinéticas de fermentación de *W. confusa* y de la bacteria ácido-láctica seleccionada en el objetivo 1, y la cinética de actividad fungistática de éstas dos bacterias, su biomasa y su sobrenadante contra especies de *Fusarium*

Se realizaron cinéticas de producción de ácido láctico, ácido acético, consumo de sustrato, producción de biomasa, concentración celular de *W. confusa* y la BAL seleccionada en el objetivo 1; y la actividad fungistática de tres sustancias (fermentado, biomasa y sobrenadante) obtenidas a partir de fermentaciones separadas de *W. confusa* y de la BAL seleccionada. Las sustancias se describirán en la sección 7.3.2.

7.3.1 Fermentación

Se realizaron fermentaciones en discontinuo utilizando sustrato comercial puro (MRS) con adición de 40 % p/v de glucosa, el cual proveía las exigencias nutricionales de las bacterias ácido-lácticas (10 gL⁻¹ de peptona universal; 5 gL⁻¹ de extracto de carne, 5 gL⁻¹ de extracto de levadura; 20 gL⁻¹ de D (+)-glucosa; 2 gL⁻¹ de hidrogenofosfato dipotásico; 1 gL⁻¹ de Tween 80.2 gL⁻¹ de hidrogencitrato diamónico; 5 gL⁻¹ de acetato sódico; 0.1 gL⁻¹ de sulfato de magnesio; 0.05 gL⁻¹ de sulfato de manganeso) (De Man *et al.*, 1960).

Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyer de 1000 mL, con un volumen de trabajo de 300 mL, los cuales permanecieron agitados elipsoidalmente, a 100 rpm por 48 horas a 37 °C (equipo VWR Incubating Orbital Shaker VWR model 5000I, USA).

La fermentación se ajustó a pH 6,0 utilizando NaOH 4M. Se utilizó 10 % de inóculo con respecto al volumen del sustrato

Se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas de fermentación, para realizar cada una de las cinéticas (actividad fungistática, producción de ácido láctico, producción de biomasa, de células viables, consumo de sustrato, y ácido acético).

La actividad fungistática se determinó en cada tiempo, de la misma forma descrita en el numeral 7.1.2. En los tiempos referidos anteriormente se tomaron muestras de 5 mL de las sustancias 1, 2 y 3, las cuales se describirán en el numeral 7. 3.2

Para determinar ácido láctico se utilizó un Reflectoquant (RQflex plus 10, Germany), el cual consta de un intervalo de medida entre 3 y 60 mg/L de ácido láctico. Cuando la concentración de ácido láctico en la muestras no se encontraba dentro de ese rango, se realizaron diluciones utilizando agua destilada. Posteriormente, se introdujo la banda analítica en dichas muestras durante 2 segundos y se eliminó exceso de líquido sobre papel absorbente. Finalmente se procedió a realizar la medición en cada tiempo de fermentación (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas).

Para determinar biomasa, se tomaron en cada tiempo (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas), 10 mL de sustrato de fermentación, posteriormente, se centrifugaron a 10000 x g (Eppendorf Centrifuge-5804R, Germany) por 10 minutos y se removió el sobrenadante de cada muestra. La biomasa se lavó con solución salina y se secó en estufa a 100 °C (Norma AOAC 925.10, 1990), los resultados se expresaron en gramos de biomasa por litro de caldo de fermentación.

Para determinar la concentración de células viables, en cada tiempo de fermentación (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas), se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-10} en agua peptona al 0.1% p/v. Se sembró en profundidad por duplicado en cajas con agar MRS con azul de anilina. Las cajas se inocularon con 1 mL de cada una de las diluciones y se incubaron a 37 °C por 48 horas. El conteo de células viables se expresó como UFC/mL.

La concentración del sustrato se midió como concentración de azúcares reductores, por el método DNS, el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de calor descrita por Millar (1959). La medición se realizó en cada tiempo de fermentación (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas), para lo cual se tomaron muestras de 5 mL en los tiempos referidos.

Para la medición de ácido acético se tomaron muestras de 50 mL en los tiempos referidos y se enviaron al laboratorio de Industriales de la Universidad del Valle (Colombia) para análisis con HPLC.

A partir de las cinéticas de ácido láctico, biomasa y consumo de sustrato se calculó para *W. confusa* y para la bacteria identificada como G, la velocidad de crecimiento específica,

μ , rendimiento en producto ($Y_{p/s}$), rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y consumo de sustrato (CS) mediante las Ecuaciones (7-2), (7-3), (7-4).

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_i}{S_0 - S_i} \quad (\text{gg}^{-1}) \quad (7-2)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_0 - X_f}{S_0 - S_f} \quad (\text{gg}^{-1}) \quad (7-3)$$

$$\text{CS} = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \quad (\%) \quad (7-4)$$

Donde, S_0 : concentración inicial de azúcares totales (gL^{-1}), S_f : concentración final de azúcares totales (gL^{-1}), P_0 : concentración inicial de ácido láctico (gL^{-1}) P_f : concentración final de ácido láctico (gL^{-1}), X_0 : concentración inicial de biomasa (gL^{-1}), X_f : concentración final de biomasa (gL^{-1}).

7.3.2 Obtención de fermentado, biomasa y sobrenadante

El producto de la fermentación de las dos bacterias, *W. confusa* y la BAL aislada de cultivos de pitahaya amarilla, se dividió en tres volúmenes, a los cuales se les dio el nombre de sustancia 1 ó S1, sustancia 2 ó S2 y sustancia 3 ó S3. S1 correspondió al fermentado obtenido después de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 48 horas de fermentación. Al fermentado no se le realizó ningún procedimiento.

S2 correspondió al sobrenadante, el cual se obtuvo mediante centrifugación del fermentado por 15 min a 5000 x g (Eppendorf Centrifuge-5804R, Germany). El precipitado fue desechado. El sobrenadante se filtró dos veces, primero con filtro de 0,45 de diámetro y posteriormente con filtro 0.2 μm de diámetro y se envasó en tubos falcon de 50 mL.

S3 correspondió a la biomasa, la cual se obtuvo en el precipitado obtenido después de la centrifugación del fermentado por 15 min a 5000 x g (Eppendorf Centrifuge-5804R, Germany). El sobrenadante restante se desechó.

Con S1, S2 y S3 se realizaron pruebas de actividad fungistática (ver numeral 7.1.2) contra 2 especies de *Fusarium*, que fueron previamente seleccionadas por su sensibilidad (ver numeral 7.1.2).

7.3.3 Análisis de microscopia SEM

Con el objetivo de observar diferencias en la morfología del hongo por efecto de la actividad fungistática de bacterias ácido lácticas, se tomaron muestras de los tratamientos que arrojaron los mejores resultados en el numeral 7.3 y se enviaron a Cecoltec Ltda para análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

7.4 Caracterización molecular de la bacteria ácido-láctica aislada de cultivos de pitahaya amarilla

7.4.1 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN genómico de las BAL se siguió el procedimiento descrito por Dimkic *et al.* (2013) con algunas modificaciones. 5 mL de cultivo de *W. confusa* y de la BAL seleccionada se centrifugaron (10000 rpm, 2 minutos, 4 °C) en tubos falcon, una vez termino el proceso se procedió a desechar el sobrenadante y el pellet que se obtuvo se re-suspendió en 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 25 % de sacarosa y lisozima (8mg/mL) por 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió proteinasa K y SDS al 10 % y se incubo por 10 min a 65 °C. Posteriormente se adiciono un volumen de fenol-cloroformo y un volumen de buffer (50 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA y 25 % de sacarosa) y se centrifugo (14000 rpm, 5 minutos, 4 °C), luego se recuperó el sobrenadante; posteriormente seañadió1 volumen de cloroformo y se recuperó de nuevo el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 2 volúmenes de etanol frio y una décima parte de acetato de sodio 3 M, se centrifugo (10000 rpm, 2 minutos, 4 °C) y se eliminó el sobrenadante. El DNA que se obtuvo en el fondo del tubo se lavó con etanol al 70 %, y se re-suspendió en 50 µl de RNasa y buffer TE (Tris 50 mM, EDTA 10mM).

7.4.2 Amplificación de ARN ribosomal 16S

Se amplificó un fragmento del gen ribosomal 16S empleando los primers W01 y W012 (Soler *et al.*, 2008). La amplificación se realizó con la reacción en cadena polimerasa

(PCR) en un volumen total de 50 μ l que tendrá buffer Taq 10X ((NO₄)₂SO₄), 2 mM de Cl₂Mg, 0.4 mM de cada primer WO1 (5'-AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC-3') y WO12 (5'-TAC GCA TTT CAC C(GT) C TAC A-3'), 0.025 U/microlitro de Taq DNA polimerasa, 1 μ l de ADN cromosomal y 5 mM dNTPs. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador, con ciclo de desnaturalización por 4 minutos a 94 °C y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, con unión del iniciador a 50 °C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 60 segundos y una extensión final de 5 minutos a 72 °C (Soler *et al.*, 2008). Los productos de la amplificación del ARN 16S se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (0.8 % p/v) en buffer TAE 1X a 70 V durante 1 hora, con 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio; se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas (R)). La visualización de las bandas se realizó con un transiluminador de luz ultravioleta y se tomaron fotos en el documentador de Biorad.

7.4.3 Secuenciación de los fragmentos amplificados (análisis bioinformático)

El fragmento de PCR amplificado fue purificado y secuenciado en MacroGen-Korea. Las reacciones de secuenciación fueron ensambladas en el programa CLC Main Workbench 7.0. Para conocer la identidad de las secuencias, se realizó un análisis bioinformático en el programa Blastn (NCBI), utilizando la base de datos TL/16S_ribosomal_RNA_Bacteria_and_Archaea.

7.5 Diseño Experimental y análisis estadístico

Para el objetivo 1 se utilizaron un diseño completamente al azar, con arreglo factorial, con dos replicas así:

Factor bacteria ácido láctica, con 8 niveles: A, B, C, D, E, F, G, H.

Factor patógeno con 5 niveles: 5 especies de *Fusarium*: 1, 54, 17, 14 Y 22.

Factor sustrato: MRS y PDA

La variable de respuesta fue: actividad fungistática. Los resultados se analizaron a través del programa estadístico SAS versión 9.1 (Cary, NC). La comparación entre promedios se realizó a través de la prueba Tukey con una probabilidad de $p < 0.05$.

Para el objetivo 2 se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial, con dos replicas así:

Factor patógeno con 5 niveles: 5 especies de *Fusarium*: 1, 54, 17, 14 Y 22.

Factor sustrato: MRS y PDA

La variable de respuesta fue: actividad fungistática. Los resultados se analizaron a través del programa estadístico SAS versión 9.1 (Cary, NC). La comparación entre promedios se realizó a través de la prueba Tukey con una probabilidad de $p < 0.05$.

En el objetivo 3 se realizó un análisis estadístico independiente para la cinética de actividad fungistática, en donde se seleccionaron dos especies de *Fusarium* (aquellas que habían presentado mayor sensibilidad a *W. confusa* y a la BAL seleccionada, aislada del cultivo de pitahaya amarilla).

Para la cinética de actividad fungistática se utilizó un diseño factorial completamente al azar de 2×3 con repeticiones en 9 tiempos así:

Factor patógeno con 2 niveles: *Fusarium* 17, *Fusarium* 54

Factor producto de fermentación producido por *W. confusa* y por la BAL seleccionada con 3 niveles: fermentado (S1), sobrenadante (S2) y biomasa (S3)

Los tiempos de fermentación fueron, 0, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 y 48 horas

Las variables de respuesta fueron: actividad fungistática. Los resultados se analizaron a través del programa estadístico SAS versión 9.1 (Cary, NC). La comparación entre promedios se realizó a través de la prueba Tukey con una probabilidad de $p < 0.05$.

En las cinéticas de producción ácido láctico, producción de biomasa, consumo de sustrato y ácido acético se calcularon las desviaciones estándar entre los triplicados para cada tiempo de fermentación. También se calcularon los parámetros cinéticos descritos previamente.

8. Resultados y discusión

8.1 Evaluación in vitro de la actividad fungistática de bacterias ácido- lácticas aisladas a partir de cultivos de pitahaya amarilla y selección de la que presentó la mayor actividad fungistática contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla

8.1.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas de pitahaya amarilla con y sin síntomas de pudrición basal

Se obtuvieron 36 muestras de diferentes lugares del cultivo de pitahaya amarilla, incluyendo fruta, pedúnculo, base de la fruta, vástago, suelo y raíz; de estas muestras se aislaron 57 colonias presuntivas de ser bacterias ácido-lácticas (BAL), sin embargo mediante observaciones al microscopio, solamente 8 bacterias resultaron tener la morfología propia de BAL. En la Figura 8-1 se puede observar muestras tomadas de fruta sana y afectada por *Fusarium*.

Figura 8-1. Pitahaya amarilla sana y afectada por *Fusarium*



En la Tabla 8-1 podemos observar las 8 cepas ácido-lácticas aisladas. Todas las bacterias ácido lácticas provenían de plantas afectadas, donde A, B, C y F se aislaron de fruta afectada; D, G Y H de base de fruta afectada y E de fruta sana.

Se encontraron que las bacterias en su morfología fueron cocobacilos pequeños, medianos y grandes, donde bacterias como A y B se disponían en cadenas.

La temperatura de crecimiento óptima para A, B, E, F, G y H fue 37 °C, y para C y D fue entre 27 y 37 °C.

Tabla 8-1: Aislamiento de bacterias acido-lácticas de cultivos de pitahaya amarilla sanos y afectados con podredumbre basal

Identificación de BAL en experimentos	Fuente	Morfología	Temperatura de crecimiento
A	Fruta afectada de planta afectada.	cocobacilos pequeños en cadenas, Gram positivos	37 °C
B	Fruta afectada de planta afectada	Cocos grandes en cadenas, Gram positivos	37 °C
C	Fruta afectada de planta afectada	Cocobacilos medianos, Gram positivos	27-37 °C
D	Base de fruta afectada de planta afectada	Cocobacilos mediano en cadenas, Gram positivos	27-37 °C
E	Fruta sana de planta afectada.	Cocobacilo mediano, Gram positivos	37 °C
F	Fruta afectada de planta afectada.	Cocobacilos pequeños, Gram positivos	37 °C
G	Base de fruta afectada de planta afectada.	Cocobacilos pequeños, Gram positivos	37 °C
H	Base de fruta afectada de planta afectada.	Cocobacilos medianos, Gram positivos	37 C

8.1.2 Selección de la BAL G, como cepa indicadora contra especies de *Fusarium* causantes de la pudrición basal de pitahaya amarilla

Pruebas fungistáticas en sustrato MRS

En nuestro estudio, las pruebas fungistáticas realizadas demostraron que el crecimiento de *Fusarium* 1 fue afectado al utilizar las BAL C, D, E, F y G, con porcentajes de reducción que oscilaron entre 36.45 y 44 %, donde estos valores son diferentes estadísticamente con respecto a los obtenidos con las BAL A, B y H (ver tabla 8-2). En las Figura 8-2

Figura 8-3 se observa el efecto inhibitorio de la BAL G y las demás BAL contra *F. 1*, respectivamente.

Figura 8-2: (a) Actividad fungistática de BAL G contra *Fusarium* 1 en sustrato agar MRS y (b) su control

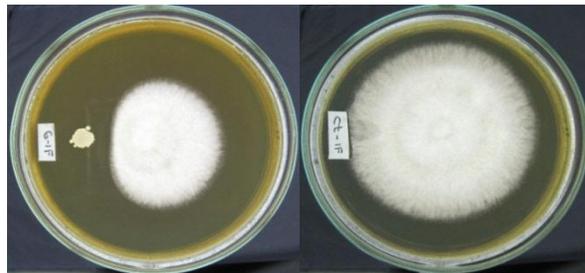
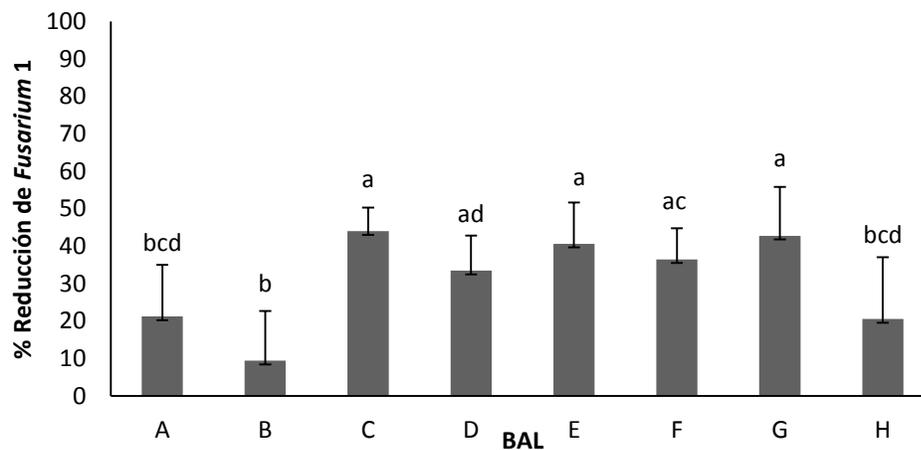


Figura 8-3: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium* 1 en sustrato agar MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

El porcentaje de reducción del crecimiento de *Fusarium 54* superó el 50 % cuando se utilizó la BAL F como biocontrolador *in vitro*; siendo esta bacteria la más potente con respecto a las otras BAL, lo cual se vio reflejado en las diferencias estadísticas observadas en la tabla 8-2; sin embargo la desviación estándar de este ensayo fue alta comparada con otras bacterias como, A, C y D. El porcentaje de reducción del crecimiento de *F. 54* obtenido con otras bacterias como A, C, E, G y H no presentaron diferencias significativas entre sí, donde la BAL G presentó un porcentaje de reducción de 49 %, valor más alto después del obtenido con G. En este ensayo también se observaron las desviaciones estándar más altas (E, F, G y H) con respecto a todas las pruebas fungistáticas tanto en MRS como en PDA. En las; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 8-4 Figura 8-5 se observa el efecto inhibitorio de la BAL F y las demás BAL contra *F. 54*, respectivamente.

Figura 8-4: (a) Actividad fungistática de las BAL F contra *Fusarium 54* en sustrato agar MRS y (b) su control

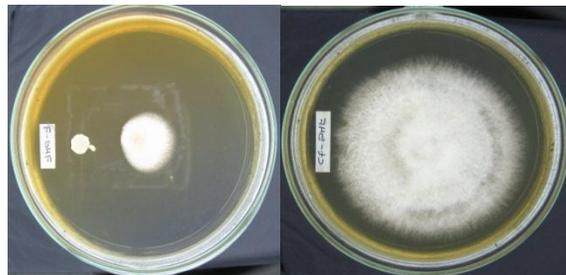
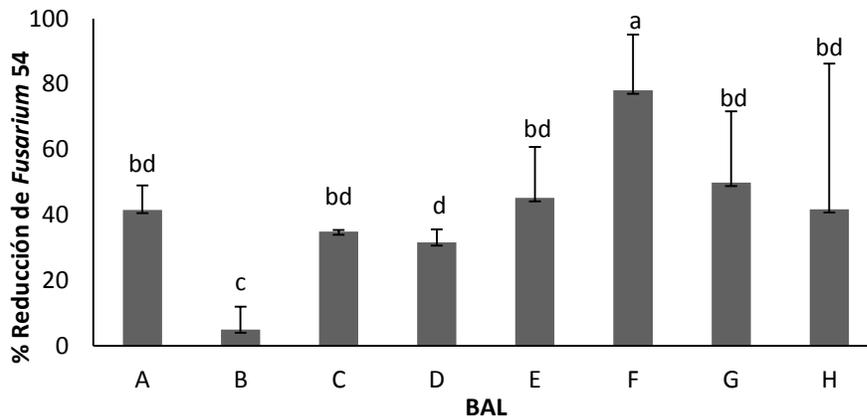


Figura 8-5: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 54* en sustrato agar MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Los porcentajes de reducción del crecimiento de *Fusarium 14* oscilaron entre 22.3 y 35.7 %, donde las BAL, A, C, D, E, F G y H no presentaron diferencias significativas entre sí (tabla 8-2); además la estadística descriptiva arrojó desviaciones estándar menores a 10 para todas las BAL. En la **Figura 8-6** podemos observar el efecto fungistático de la BAL A contra *F. 14* que correspondió al 29.38 % de reducción en el crecimiento del hongo. En la **Figura 8-7** podemos observar el efecto fungistático de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 14* en sustrato agar MRS.

Figura 8-7 se observa el efecto inhibitorio de todas las BAL aisladas contra *F. 54*.

Figura 8-6: (a) Actividad fungistática de la BAL A contra *Fusarium 14* en sustrato agar MRS y (b) su control

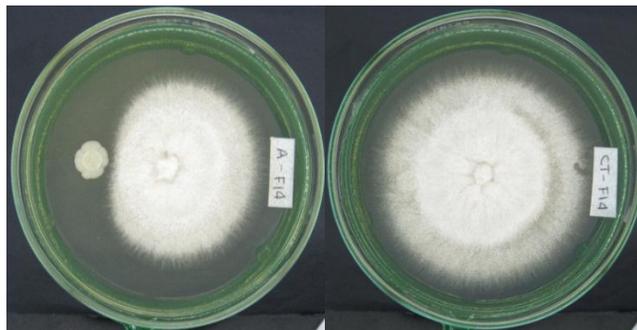
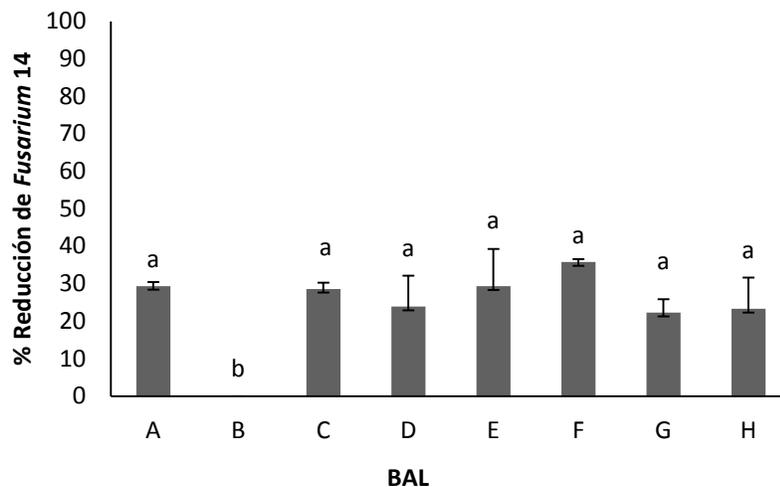


Figura 8-7: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 14* en sustrato agar MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En las pruebas fungistáticas contra *Fusarium 17* la BAL D fue la que más redujo su crecimiento, presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto a las BAL A, B, y F, con un valor de 54 %. Otras bacterias como C, E, G y H lograron reducciones entre 39.8 y 48 %, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (ver tabla 8-2). En este ensayo las desviaciones estándar fueron menores de 9 para todas las BAL. En las

Figura 8-8 y

Figura 8-9 se observa el efecto inhibitorio de la BAL F y las demás BAL contra *F. 17*, respectivamente.

Figura 8-8: (a) Actividad fungistática de la BAL D contra *Fusarium 17* en sustrato agar MRS y (b) su control

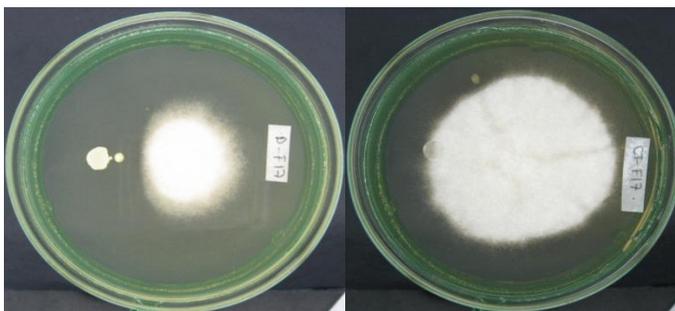
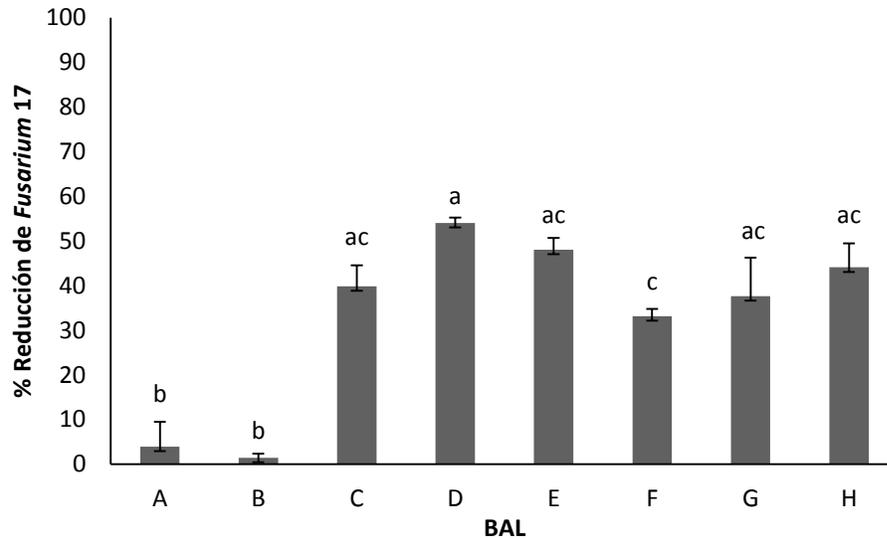


Figura 8-9: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 17* en sustrato agar MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Los porcentajes de reducción obtenidos en las pruebas fungistáticas contra *Fusarium 22* no superaron el 50 %, donde las BAL con mayor poder fungistático fueron C, E y H, quienes no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (ver tabla 8-2). En las

Figura 8-11 se puede observar el efecto inhibitorio de la BAL H y las demás BAL contra *F. 22*, respectivamente. Se destaca que las desviaciones estándar fueron menores de 7 para todas las BAL.

Figura 8-10: (a) Actividad fungistática de la BAL H contra *Fusarium 22* en sustrato agar MRS y (b) su control

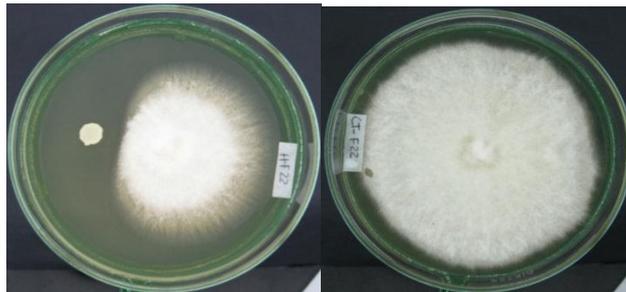
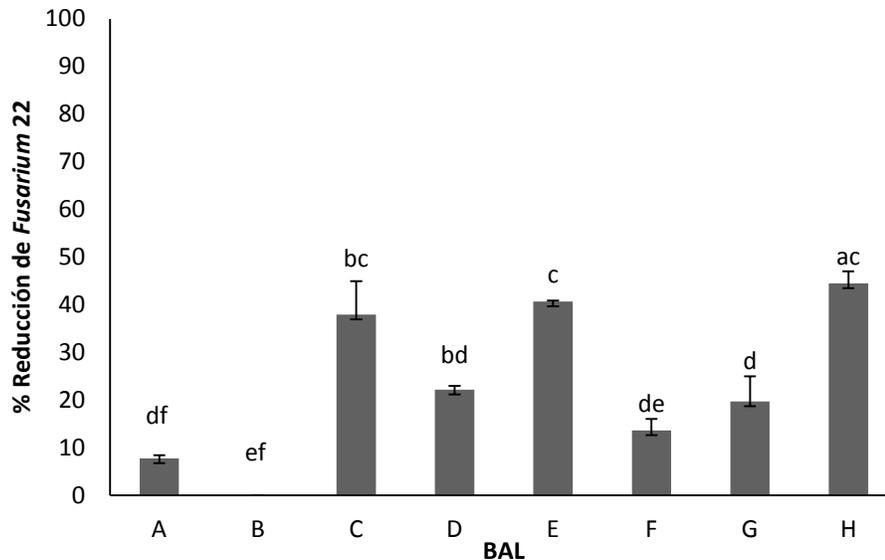


Figura 8-11: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 22* en sustrato agar MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Pruebas fungistática en sustrato PDA

En sustrato PDA cuando se realizaron pruebas fungistáticas contra *Fusarium 1* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre A, E, F y G con respecto a los porcentajes de reducción, sin embargo estas BAL al compararlas con respecto a B y H presentaron diferencias estadísticas (ver tabla 8-2). Los mayores porcentajes de reducción se obtuvieron cuando se utilizó como biocontrolador las BAL A, E, F y G, los cuales oscilaron entre 27.5 y 34.8 % (ver

Figura 8-13). Las desviaciones estándar de los ensayos con estas bacterias fueron menores a 10. En la Figura 8-12 se puede observar el efecto fungistático de la BAL A contra *F. 1*.

Figura 8-12: (a) Actividad fungistática de la BAL A contra *Fusarium 1* en sustrato agar PDA y (b) su control

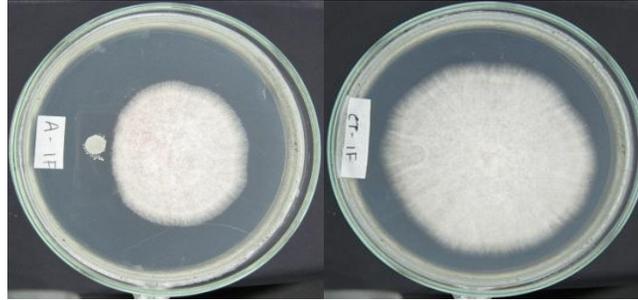
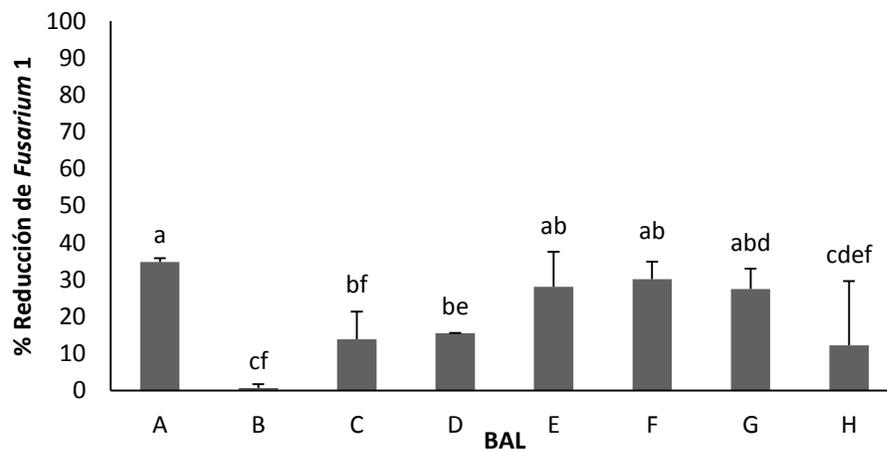


Figura 8-13: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 1* en sustrato agar PDA



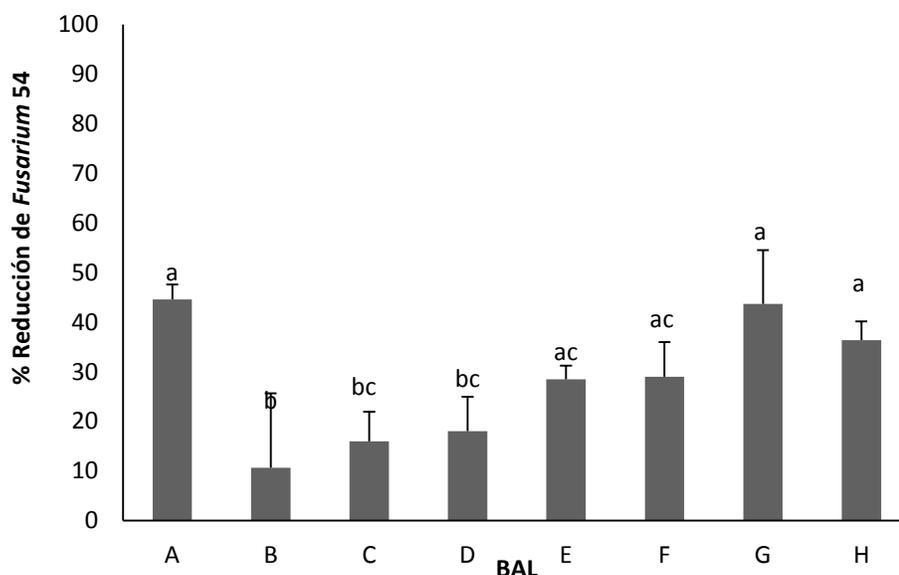
Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Las BAL que lograron obtener la mayor actividad fungistática frente a *Fusarium 54* fueron A y G con valores correspondientes a 44.5 y 43.7 %, respectivamente, las cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a B, C y D (ver Figura 8-15). Sin embargo A y G presentaron desviaciones estándar mayores a 10. En la Figura 8-14 se puede observar el efecto fungistático de la BAL G contra *F. 54*.

Figura 8-14: (a) Actividad fungistática de la BAL G contra *Fusarium 54* en sustrato agar PDA y (b) su control



Figura 8-15: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 54* en sustrato agar PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

El crecimiento de *Fusarium 14* solo pudo ser inhibido hasta en 18.5 % por la bacteria A, la cual presento diferencias estadísticamente significativas con respecto a los porcentajes de reducción obtenidos en B, C, F, G y H (ver Figura 8-17); sin embargo el ensayo con la BAL A tuvo una desviación estándar de 8. Para las otras BAL las desviaciones estándar no superaron valores de 3. Los porcentajes de reducción obtenidos con las BAL aisladas de pitahaya amarilla para F. 22 indican que este hongo no es sensible a dichas bacterias antagonicas, por lo cual no sería un candidato para las pruebas siguientes en esta investigación. En la Figura 8-16 se puede observar el efecto fungistático de la BAL A contra F. 14.

Figura 8-16: (a) Actividad fungistática de la BAL A contra *Fusarium 14* en sustrato agar PDA y (b) su control

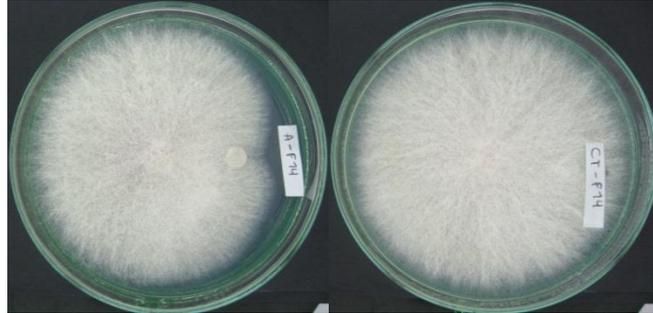
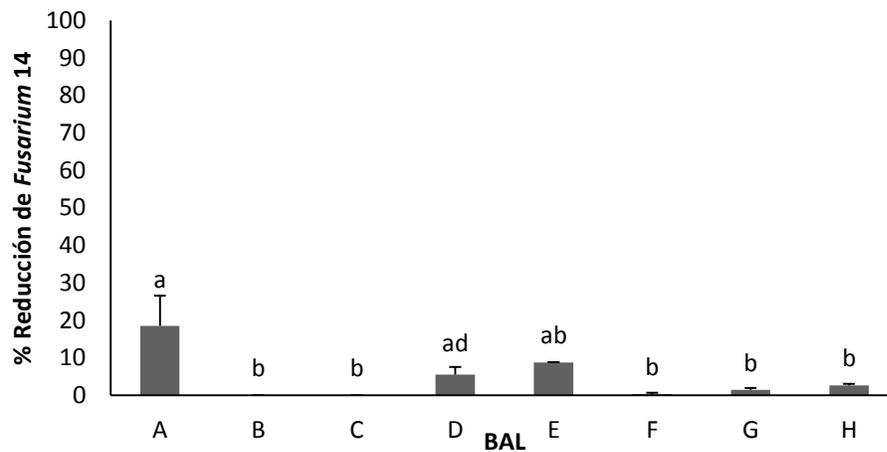


Figura 8-17: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 14* en sustrato agar PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En las pruebas fungistáticas realizadas frente a *Fusarium 17* los porcentajes de reducción obtenidos con las BAL A, C, D, E, F, G y H no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí; con valores que oscilaron entre 23.5 y 35.9 % (ver tabla 8-2). Lo que indica que el tipo de cepa no afecta el crecimiento del hongo, lo cual se puede observar en la Figura 8-19 con la BAL E. En la Figura 8-18 se puede observar el efecto fungistático de la BAL E contra *F. 17*.

Figura 8-18: (a) Actividad fungistática de la BAL E contra *Fusarium 17* en sustrato agar PDA y (b) su control

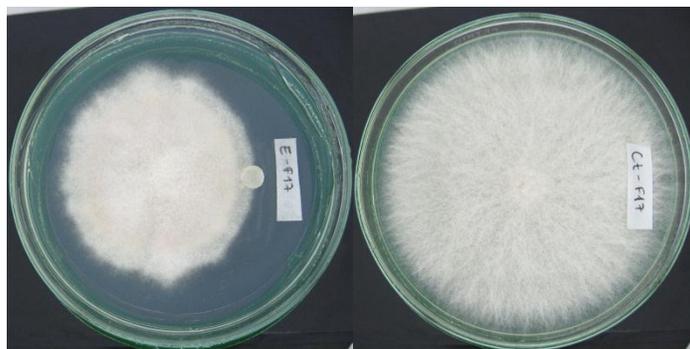
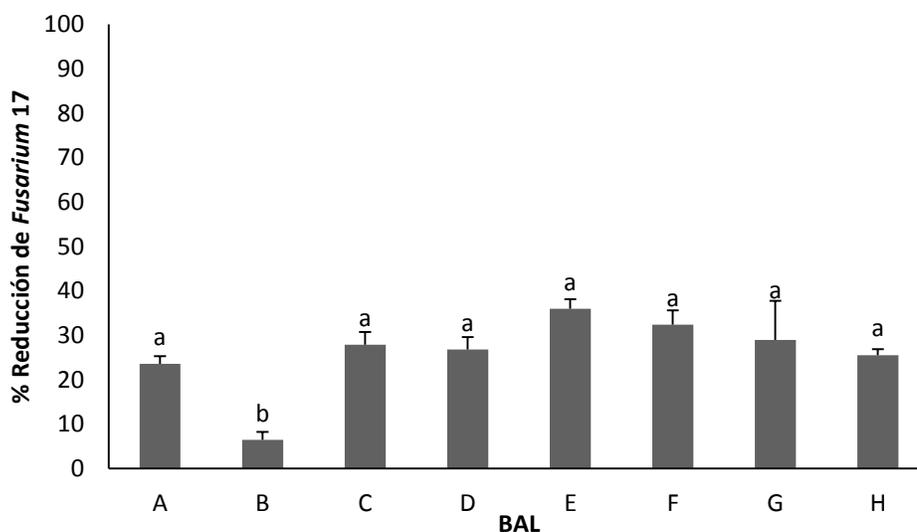


Figura 8-19: (a) Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 17* en sustrato agar PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Los porcentajes de reducción del crecimiento de *Fusarium 22* no superaron el 10 % y no hubo diferencias estadísticas entre sí, lo cual indica que las BAL en estudio no son potenciales para el control de este hongo (ver Figura 8-21), así mismo se puede observar y corroborar este comportamiento en la Figura 8-21.

Figura 8-20: (a) Actividad fungistática de la BAL G contra *Fusarium 22* en sustrato agar PDA y (b) su control

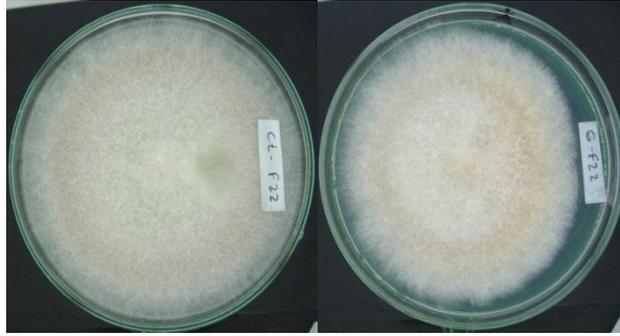
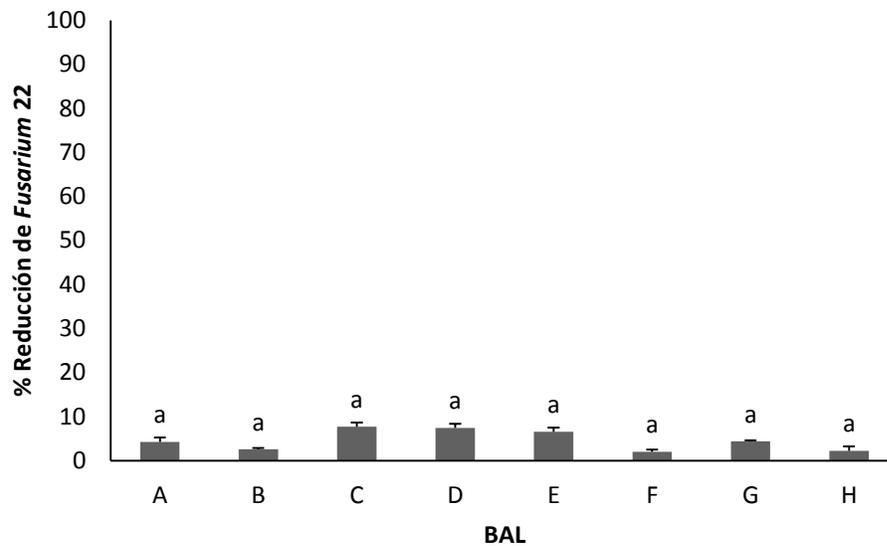


Figura 8-21: Actividad fungistática de 8 cepas de BAL contra *Fusarium 22* en sustrato agar PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos replicas y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En este estudio se observó que 7 BAL (excepto BAL B) tenían una actividad fungistática moderada frente a por lo menos una cepa de hongo evaluada (ver Tabla 8-2).

En esta investigación la variable respuesta fue dependiente de la especie de *Fusarium* ($p < .0001$), cepa antagonista ($p < .0001$) y sustrato ($p < .0001$). La prueba de Tukey arrojó que las cepas más sensibles fueron *F. 54* y *F. 17*, las cuales se escogieron para realizar la selección de la BAL con mayor potencial fungistático. De las 8 BAL, E, F y G fueron las que presentaron mejor actividad fungistática frente a las especies de *Fusarium* evaluadas

en sustrato MRS y PDA. Sin embargo, en la tabla 8-2 se puede observar que hubo diferencias estadísticas entre cada BAL sobre el potencial de reducción del crecimiento de los hongos *F. 17* y *F. 54*. Por ello, para la selección de la BAL G, se tuvo en cuenta 3 criterios, los porcentajes de reducción obtenidos en sustrato MRS y PDA, las desviaciones estándar y el lugar de aislamiento de la BAL, donde este último criterio depende del interés de esta investigación. Primero descartamos los tres hongos menos sensibles a las bacterias antagónicas, que fueron *F. 1*, *F. 14* y *F. 22*. Posteriormente seleccionamos la bacteria que cumplía todos los criterios de selección arriba mencionados, y se tuvo que la BAL G, como el biocontrolador más potencial para realizarle las pruebas posteriores.

Estudios similares se encontraron que cepas de *Lb. plantarum* mostraron actividad inhibitoria contra *F. graminearum* 96, *F. culmorum* 46, *F. verticillioides* y *A. flavus* 1038L en sustrato caldo MRS (Gagiu *et al.*, 2013). En nuestro estudio los mejores resultados de actividad fungistática se lograron en sustrato agar MRS, el cual presento diferencias significativas con respecto al sustrato PDA. Crowley *et al.* (2013) aislaron 500 BAL aisladas de fuente animal, humana y de planta, donde se encontró un amplio espectro anti-fúngico contra *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. notatum*, *P. roqueforti*, *Rhizopus stolonifer*, *F. culmorum*, *A. fumigatus* y *R. mucilaginosa*. Otros autores probaron 897 BAL aisladas de diferentes fuentes como, hierbas, frutas y verduras, de las cuales 36 tenían una actividad fungistática débil, 11 tenían actividad moderada y 12 mostraron fuerte actividad; todos las BAL fueron identificadas por secuenciación de 16S rDNA como *Lb. plantarum* (Cheong *et al.*, 2014). Se ha reportado que la causa principal de este tipo de resultados, puede ser debido a la producción de ácido acético y feniláctico durante el crecimiento de la bacteria (Lavermicocca *et al.*, 2003); de igual forma otros autores señalan que la actividad fungistática es debido a componentes solubles en el sobrenadante (Tang *et al.*, 2010). Sin embargo no se ha reportado el mecanismo fungistático exacto de las BAL, dado que diversos metabolitos primarios y secundarios tienen interacción entre si y su efecto sinérgico hace complejo su investigación (Legan, 1993).

Tabla 8-2: Porcentaje de inhibición consolidado de BAL aisladas de cultivos de pitahaya amarilla contra 5 especies de *Fusarium*

		Actividad fungistática de BAL contra especies de <i>Fusarium</i> (%)				
BAL	SUSTRATODE CRECIMIENTO	F1	F54	F14	F17	F22
A	MRS	21.20 (bcd)	41.51 (bd)	29.38 (a)	3.92 (b)	7.70 (df)
	PDA	34.86 (a)	44.57 (a)	18.53 (a)	23.53 (a)	4.25 (a)
B	MRS	9.40 (b)	4.94 (c)	0 (b)	1.40 (b)	0 (ef)
	PDA	0.73 (cf)	10.53 (b)	0 (b)	6.40 (b)	2.6 (a)
C	MRS	44 (a)	34.88 (bd)	28.61 (a)	39.81 (ac)	37.93 (bc)
	PDA	13.86 (bf)	15.95 (bc)	0 (b)	27.85 (a)	7.74 (a)
D	MRS	33.44 (ad)	31.60 (d)	23.93 (a)	54 (a)	22.17 (bd)
	PDA	15.50 (be)	18.02 (bc)	5.47 (ad)	26.75 (a)	7.47 (a)
E	MRS	40.63 (a)	45.16 (bd)	29.34 (a)	48.02 (ac)	40.65 (c)
	PDA	28.07 (ab)	28.48 (ac)	8.72 (ab)	35.93 (a)	6.57 (a)
F	MRS	36.45 (ac)	78.06 (a)	35.77 (a)	33.14 (c)	13.56 (de)
	PDA	30.16 (ab)	28.98 (ac)	0.36 (b)	32.35 (a)	2.01 (a)
G	MRS	42.74 (a)	49.83 (bd)	22.30 (a)	37.62 (ac)	19.70 (d)
	PDA	27.54 (abd)	43.70 (a)	1.44 (b)	28.90 (a)	4.37 (a)
H	MRS	20.52 (bcd)	41.72 (bd)	23.28 (a)	44.06 (ac)	44.44 (ac)
	PDA	12.58 (cdef)	36.35 (a)	2.59 (b)	25.47 (a)	2.26 (a)

*Letras iguales indican que existen diferencias significativas entre porcentajes de reducción del crecimiento de cada hongo para cada sustrato (MRS ó PDA), letras diferentes indican que no existen diferencias significativas entre porcentajes de reducción del crecimiento de cada hongo para cada sustrato. Los valores son los promedios de duplicados.

- Caracterización bioquímica de la BAL G

Los resultados de la prueba bioquímica pueden observarse en la **Tabla 8-3**, los cuales corresponden a lo reportado por Cowan y Steel en la casilla subrayada en negro.

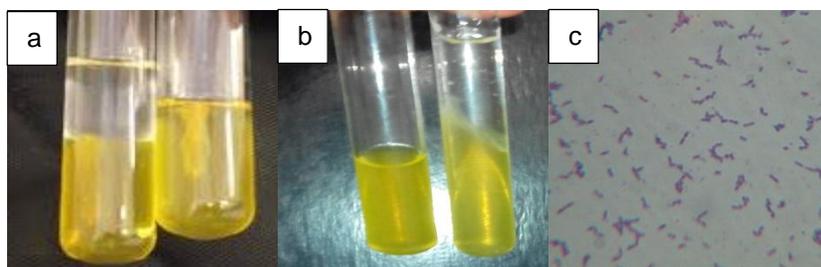
Tabla 8-3: Identificación bioquímica de BAL G

Prueba	Resultado
Catalasa	-

oxidación-Fermentación	+
Tinción Gram	Gram positivas y forma de bacilo

A continuación se muestran las figuras de la prueba de **O/F (Oxidación-Fermentación)**, donde la muestra toma un color amarillo (Figura 8-22 a y b) y de la tinción de Gram (Figura 8-22 c).

Figura 8-22: Prueba O/F (Oxidación-Fermentación) y tinción de Gram de la BAL G

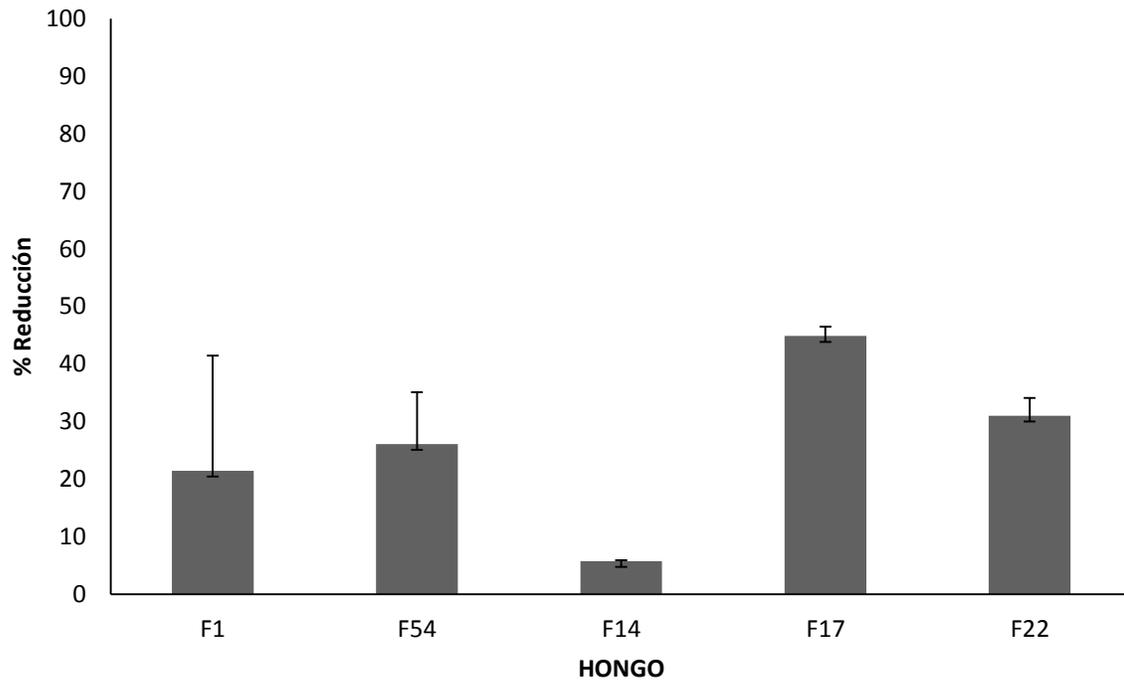


Según los resultados obtenidos y reportados en la Tabla 8-3 y en la Figura 8-22 podemos dilucidar que la bacteria en estudio pertenece al género *Lactobacillus*, lo que nos corrobora que la bacteria aislada es de un género de BAL, el cual se ha reportado por autores con potencial de inhibición de hongos (Ström *et al.*, 2002; Prema *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

8.2 Actividad fungistática in vitro de *W. confusa* contra especies de *Fusarium*, causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla

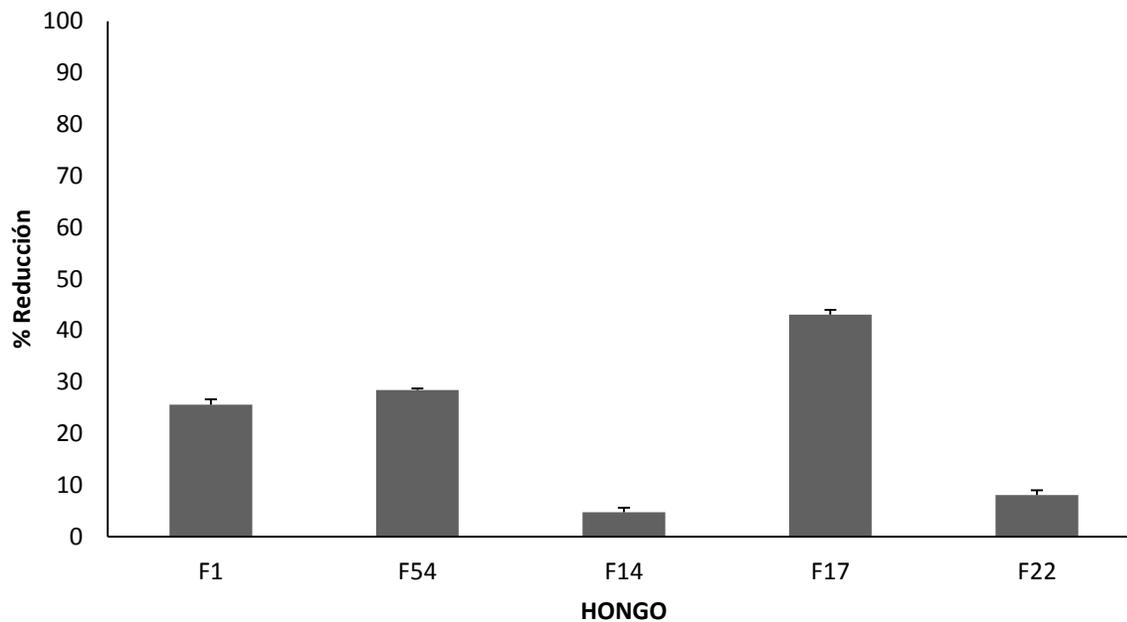
La actividad fungistática de *W. confusa* contra 5 especies de *Fusarium* evaluadas en este estudio se puede observar en las **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y Figura 8-24 se encontró que tanto en sustrato MRS (sustrato favorable para la bacteria ácido láctica) como en sustrato PDA (sustrato favorable para el crecimiento de los hongos), el hongo más sensible a *W. confusa* fue *Fusarium* 17 con porcentaje de reducción en su crecimiento superior al 40 %. Además, en sustrato PDA, *W. confusa* mostró marcado antagonismo contra *Fusarium* 1.

Figura 8-23: Actividad fungistática (medida como porcentaje de reducción del crecimiento de los hongos) de *W. confusa* contra 5 especies de *Fusarium* en sustrato MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Figura 8-24: Actividad fungistática (medida como porcentaje de reducción del crecimiento de los hongos) de *W. confusa* contra 5 especies de *Fusarium* en sustrato PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con dos repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

A pesar que no se encontraron porcentajes de reducción superiores al 10 % contra *Fusarium* 14, estos ensayos permitieron demostrar el potencial fungistático de *W. confusa* contra patógenos causantes de pudrición basal de pitahaya amarilla. Los análisis estadísticos mostraron que la actividad fungistática de una misma BAL, difiere según el sustrato que se utilice. Se pudo demostrar que utilizando un sustrato que favorece al microorganismo antagónico se favoreció la actividad fungistática como lo fue el sustrato MRS.

Estos resultados son de vital importancia para conocer el potencial antagónico de la BAL y por ende de competencia por nutrientes y espacio (Janisiewicz *et al.*, 2000), en el caso del sustrato PDA aunque no es el medio óptimo para el crecimiento de la BAL se encontró un efecto antagónico importante contra los hongos en estudio. También se puede observar que ambos sustratos, tanto PDA como MRS poseen los requerimientos nutricionales para el desarrollo de estos hongos, sin embargo ni con estas ventajas con respecto a la bacteria, el hongo pudo evitar reducir significativamente su crecimiento, principalmente *F. 54*, *F. 17* y *F. 1*. Lo cual indica que la BAL posee un alto potencial inhibitorio contra hongos de la especie *Fusarium* aun en condiciones adversas, como en el sustrato PDA; es decir que al crecer en un medio bajo en nutrientes utiliza la

competencia por nutrientes como su principal mecanismo de antagonismo logrando de esta forma inhibir el crecimiento de *Fusarium*.

Los resultados en MRS se esperaban dado que es el mejor sustrato para el crecimiento de BAL, además que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de un hongo de esta especie. Diversos estudios han reportado el modo de acción de la BAL, el cual consiste en la producción de metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, bacteriocinas y compuestos de bajo peso molecular; y a la competencia por nutrientes (Parada *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2007a, b; Ruiz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Belguesmia *et al.*, 2014; Asurmendi *et al.*, 2015). Sin embargo no existen reportes sobre actividad fungistática de BAL contra hongos causantes de enfermedades en pitahaya amarilla.

Estos resultados son de gran importancia; teniendo en cuenta el daño ambiental y social ocasionado por el uso de agroquímicos de forma indiscriminada en estos cultivos, y que el control biológico de enfermedades en pitahaya amarilla son una alternativa potencial al uso de este tipo de químicos. Adicionalmente, hasta el momento en la literatura científica no se reporta estudios sobre qué tipo de sustratos son los adecuados para medir actividad fungistática entre BAL y hongos; teniendo en cuenta que BAL y hongos poseen requerimientos nutricionales diferentes. Autores reportan la actividad fungistática de BAL pero no citan si el sustrato MRS o PDA u otro tipo de sustrato son óptimos para estas mediciones. Mandal *et al.* (2013) evaluaron el efecto del sustrato de crecimiento sobre la actividad antifungal de *P. acidilactici* LAB 5 y encontraron que la inhibición contra microorganismos patogénicos fue afectado por los componentes del sustrato MRS y extracto de malta. Otros autores reportan el efecto de la temperatura, pH, nivel de oxígeno, enzimas proteolíticas y actividad de agua sobre la actividad antifungal bacterial (Lavermicocca *et al.* 2000; Magnusson y Schnürer 2001; Franco *et al.* 2011; Oranusi *et al.* 2013; Dogi *et al.* 2013). Sin embargo, no existe información científica reportada sobre un medio adecuado para la cuantificación de la inhibición de una BAL contra un hongo. Por lo cual creemos que son necesarios más estudios para estandarizar los sustratos de crecimiento usados para medir actividad fungistática entre BAL y hongos. Sathe *et al.* (2007), Rouse *et al.* (2008), y Valerio *et al.* (2009), confirman la actividad fungistática de componentes proteicos de especies de *Weissella* contra especies de *Fusarium*. Nuestros resultados son acordes con previos estudios; sin embargo es necesaria más

investigación para evaluar la efectividad de la aplicación de *W. confusa* para el control de especies de *Fusarium* que afectan cultivos de pitahaya amarilla.

8.3 Cinéticas de fermentación de *W. confusa* y de la bacteria ácido-láctica aislada de cultivos de pitahaya amarilla

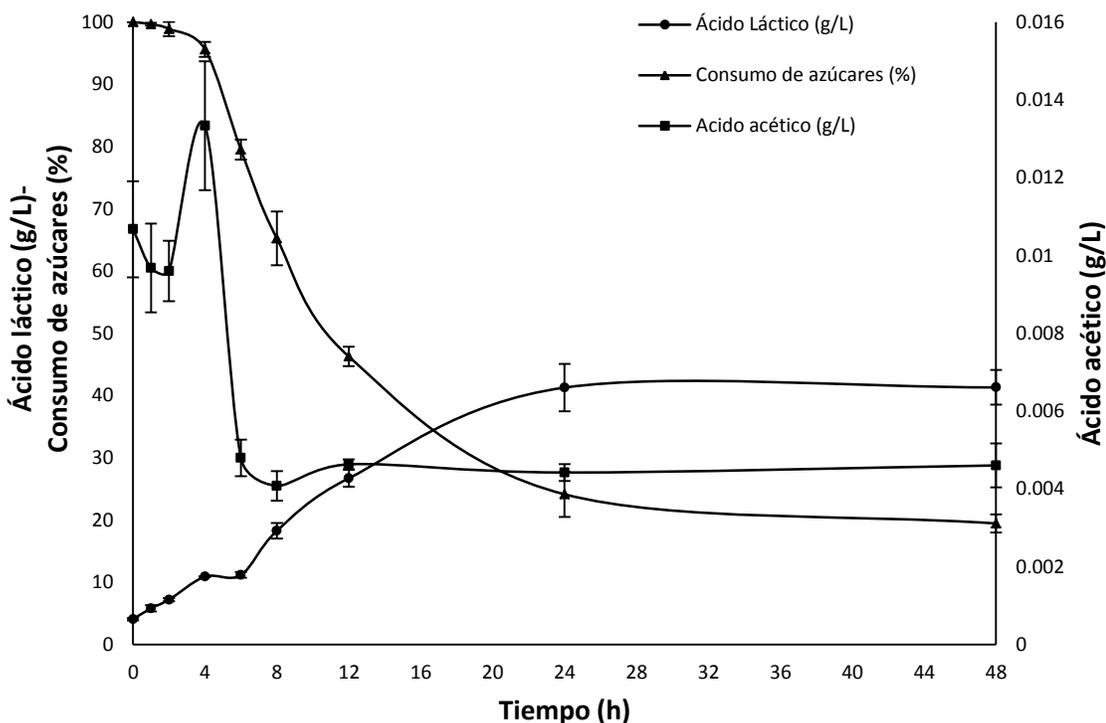
8.3.1 Cinéticas de ácido láctico, ácido acético, consumo de azúcares, biomasa y concentración celular

Para *W. confusa*, las Figura 8-25 y Figura 8-26 presentan, las cinéticas de producción de ácido láctico, ácido acético, consumo de sustrato, producción de biomasa, recuento de células vivas. La **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 8-29 muestra la cinética de actividad fungistática de S1, S2, y S3 contra *F. 54* en sustrato MRS. La Figura 8-30 muestra la cinética de actividad fungistática de S1, S2, y S3 contra *Fusarium 17* en sustrato MRS. La Figura 8-31 muestra la cinética de actividad fungistática de S1, S2, y S3 contra *Fusarium 54* en sustrato PDA. Finalmente, la **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 8-32 muestra la cinética de actividad fungistática de S1, S2, y S3 contra *Fusarium 17* en sustrato PDA

Para la bacteria G, las Figura 8-27 y Figura 8-28, presentan las cinéticas de producción de ácido láctico, ácido acético y consumo de sustrato, y las cinéticas de producción de biomasa, recuento de células vivas. La **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 8-33 corresponde a la actividad fungistática de S1, S2 y S3 contra *Fusarium 54* en sustrato MRS.

La Figura 8-34 presenta la cinética de la actividad fungistática de S1, S2 y S3 contra *Fusarium 17* en sustrato MRS. La Figura 8-35 muestra la cinética de la actividad fungistática de S1, S2 y S3 contra *Fusarium 54* en sustrato PDA. Finalmente, Figura 8-36 muestra la cinética de la actividad fungistática de S1, S2 y S3 contra *Fusarium 17* en sustrato PDA.

Figura 8-25: Cinética de producción de ácido láctico, ácido acético y consumo de azúcares de *W. confusa* durante 48 horas de fermentación



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones.

Las concentraciones de ácido láctico para *W. confusa* en caldo MRS+glucosa oscilaron entre 5.8 y 41.3 g/L, obteniendo un comportamiento ascendente; donde entre la 6 y 24 hora hubo un incremento considerable en la producción del ácido orgánico (ver Figura 8-25). Esto pudo ser debido a los componentes del sustrato, los cuales son óptimos para el crecimiento de BAL (De Man *et al.*, 1960); además la adición de 40 % de glucosa mejoró estos resultados en comparación a lo obtenido por Serna *et al.* (2010), lo cual se explica por la fuente de carbono que representa el sustrato para bacterias de este grupo, que puede ser aprovechada a través de vía glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) si las BAL son homofermentativas y por vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa si son heterofermentativas (Axelsson, 1998).

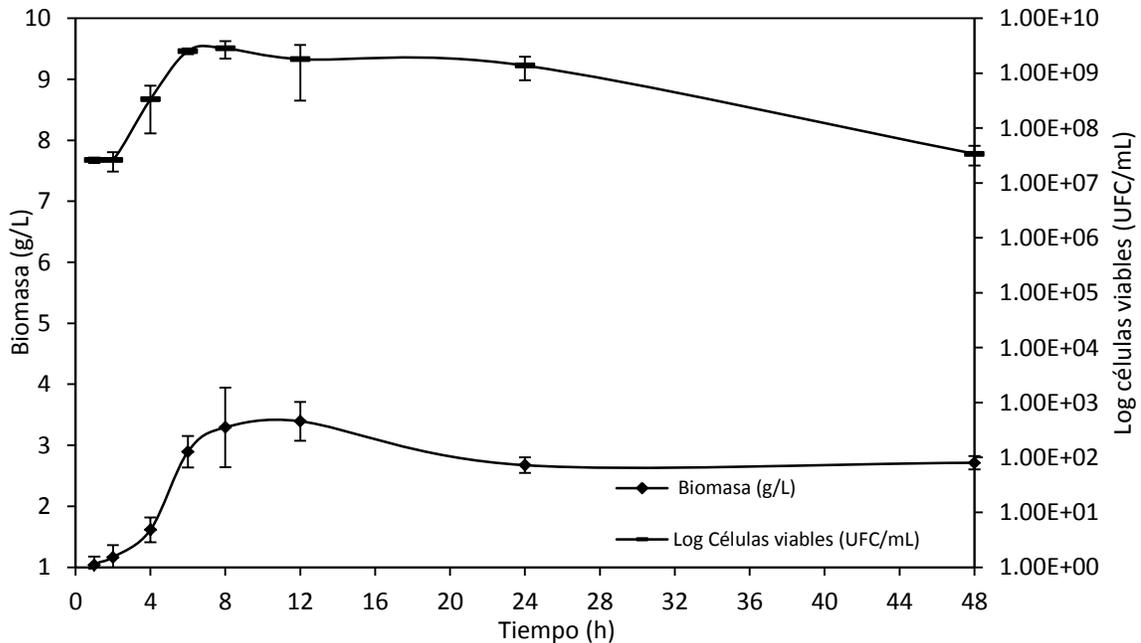
La producción de ácido acético fue menor a la obtenida con ácido láctico, teniéndose un comportamiento oscilativo; donde la máxima producción de este metabolito fue de 0.013 g/L en la 4 hora de fermentación, a partir de esta hora se observa una caída hasta las 8 horas, seguido por una constante en sus valores hasta finalizar la fermentación (0.004

g/L) (ver Figura 8-25). Los resultados de ácido láctico y acético pueden variar de forma diferente dependiendo de la BAL y del sustrato; Salmerón *et al.* (2014) encontraron que *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* y *Lb. reuteri* en diferentes sustratos registraron concentraciones de ácido láctico y acético superiores a 3 y 0.2 g/L, respectivamente; las cuales fueron altas en comparación a las obtenidas en este estudio. Zalán *et al.* (2010) reportaron que los perfiles de ácidos orgánicos pueden cambiar de acuerdo al sustrato de fermentación y a la BAL empleada, incluso entre cepas de la misma especie. Lo que indica que las concentraciones de ácido láctico y acético podrían aumentar si se utilizaran otras fuentes de carbono y nitrógeno para las bacterias ácido lácticas.

Los resultados de ácidos orgánicos son de importancia para el análisis de la actividad fungistática de esta BAL, ya que se ha reportado que la producción de metabolitos de naturaleza de ácidos tiene efecto inhibitorio contra el crecimiento de hongos (Rathore *et al.*, 2012).

En términos de consumo de azúcares se puede observar en la Figura 8-25 un descenso rápido a partir de la 4 hora de fermentación (95.63 %) hasta las 24 horas (24.12 %); con azúcares residuales de 12.9 g/L correspondiente a 19.43 % de sustrato no consumido. Indicando que el sustrato MRS suplementado con 40 % glucosa provee los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de la BAL, lo cual se puede correlacionar con las altas concentraciones de ácido láctico; no obstante los azúcares residuales fueron altos en comparación a los obtenidos en ensayos posteriores con la BAL G. Por lo cual es necesario evaluar otros sustratos de crecimiento que ayude a incrementar el rendimiento de la fuente de carbono para obtener menor cantidad de azúcares residuales. Patel *et al.* (2013) en pruebas con *W. confusa* y *W. cibaria* utilizaron glucosa, xilosa y xilooligosacáridos como sustratos de crecimiento, y encontraron que los mejores resultados en la producción de ácido láctico y acético se lograron con xilooligosacáridos en comparación con el crecimiento con glucosa; pero estas producciones de ácido láctico fueron dependientes de esta cepa.

Figura 8-26: Cinética de producción de biomasa y unidades formadoras de colonias por mililitro de *W. confusa* durante 48 horas de fermentación

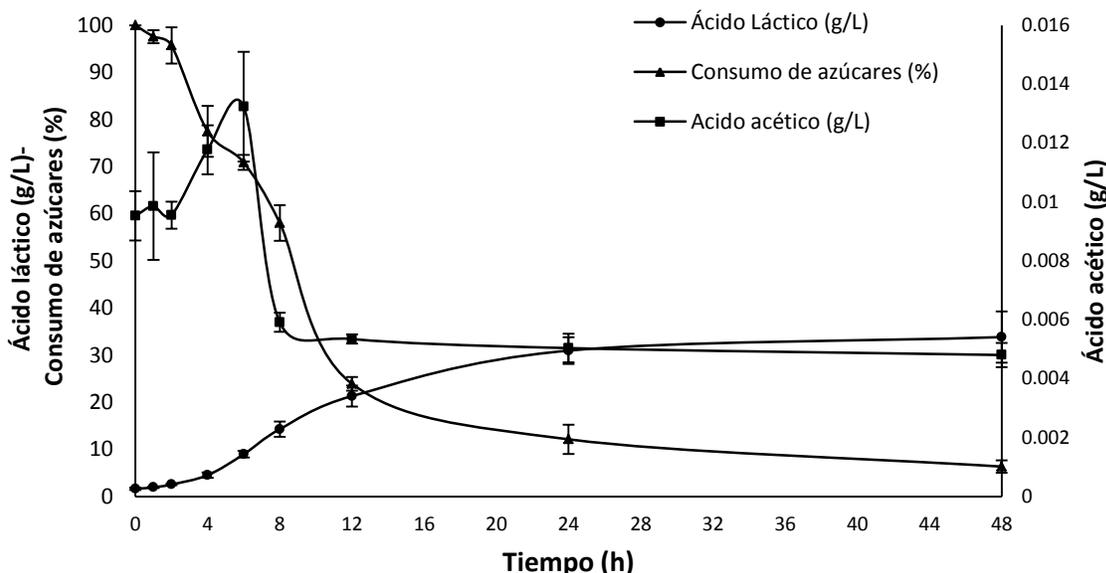


Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones.

La curva de concentración de biomasa muestra una típica curva de crecimiento microbiano con fase exponencial desde que la hora 2 de la fermentación hasta la hora 6, fase estacionaria hasta la hora 13, y a partir de la hora 14, mayor proporción de muerte celulares.

En la figura de viabilidad celular se observa crecimiento exponencial hasta la hora 6, fase estacionaria hasta la hora 13 y mayor muerte celular a partir de la hora 14 (ver Figura 8-26). Este comportamiento se correlaciona con la producción de biomasa. Adicionalmente se midieron los parámetros cinéticos de la BAL como velocidad específica de crecimiento μ , % de conversión de glucosa, rendimiento celular ($Y_{x/s}$) y el rendimiento en producto ($Y_{p/s}$), obteniéndose valores de 0.22 h^{-1} , 80.5 %, 0.037 gg^{-1} y 0.69 gg^{-1} , respectivamente.

Figura 8-27: Cinética de producción de ácido láctico, ácido acético y consumo de azúcares de la BAL G durante 48 horas de fermentación



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones.

Para la BAL G en sustrato caldo MRS+glucosa se obtuvo cantidades de ácido láctico que oscilaron entre 1.94 y 33.8 g/L, entre la 4 y 24 hora se obtuvo incrementos considerables del ácido orgánico (ver Figura 8-27). Las cantidades de ácido láctico producidas por ambas bacterias son de importancia para dilucidar la fuente de poder fungistática de dichas bacterias contra los hongos en estudio. Zalán *et al.* (2010) en fermentaciones en caldo MRS encontraron que BAL como *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* y *Lb. curvatus* produjeron altas concentraciones de ácido láctico (36.03–76.65 g/L). Estos autores relacionaron positivamente la producción del ácido láctico y acético con el poder inhibitorio frente a especies de *Fusarium*.

En términos de ácido acético se obtuvo concentraciones bajas, donde la producción máxima de este ácido orgánico se presentó en la hora 6 con 0.013 g/L. Entre la hora 8 y 48 se observó una constancia en la producción de este metabolito, con valores correspondientes a 0.005 y 0.004 g/L, respectivamente (ver Figura 8-27). Estos resultados son bajos comparados con los obtenidos por Gao *et al.* (2008) en una fermentación con *Lb fermentum*, *Lb plantarum* y *Lb paracasei*.

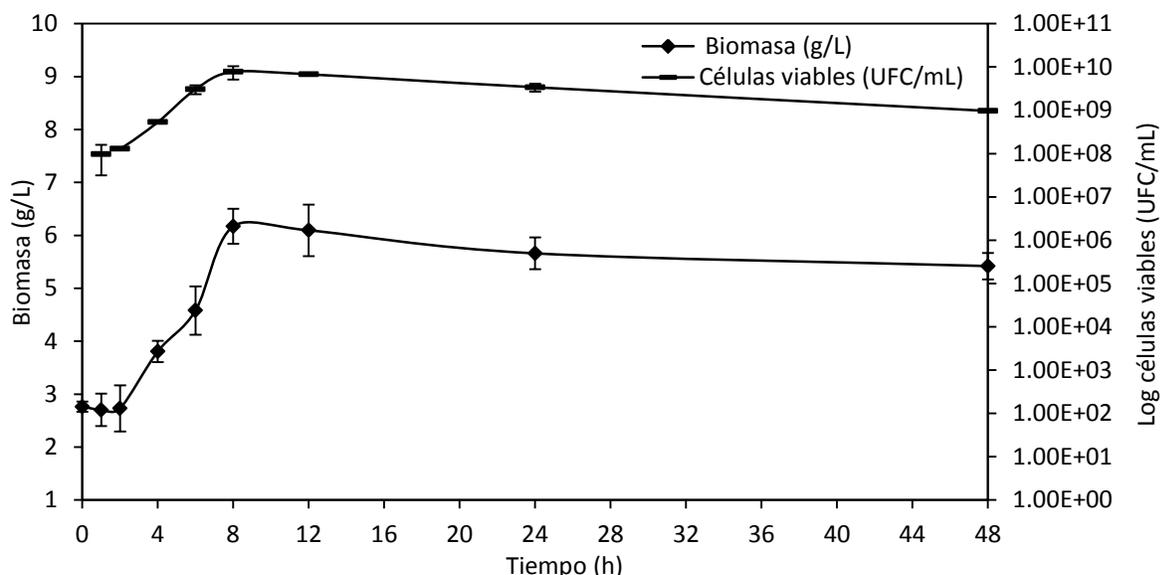
Los metabolitos producidos durante la fermentación de una bacteria dependen de la vía de oxidación de los hidratos de carbono, en el caso de BAL homofermentativas, éstas

utilizan la fuente de energía (en este caso caldo MRS con 40 % de suplemento de glucosa) y convierten más del 85 % en ácido láctico; mientras que otras BALs heterofermentativas convierten la glucosa en diferentes metabolitos como, ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, acetato, acetaldehído (Suskovic *et al.* 2010). Según los resultados obtenidos en nuestro estudio la BAL G es un microorganismo heterofermentativo, esto lo demuestra la presencia de ácido láctico y acético como productos metabólicos de la fermentación de caldo MRS (Axelsson, 1998; Palles *et al.*, 1998; Oude *et al.*, 2001).

Debido a las bajas concentraciones obtenidas en ácido acético en este estudio la actividad fungistática podría atribuirse a la producción de ácido láctico o a la producción de metabolitos de origen proteico como bacteriocinas. Aunque otros autores reportan que el ácido acético a pequeñas concentraciones es más efectivo que el ácido láctico. Sin embargo para esclarecer el efecto del ácido acético es necesario realizar pruebas posteriores donde se demuestre el efecto de las concentraciones de éste ácido sobre el crecimiento fúngico y el efecto del sustrato sobre la producción de estos metabolitos (Corsetti y Settanni, 2007; Caplice y Fitzgerald 1999; Zalán *et al.*, 2010).

Los niveles de azúcares reductores decrecieron rápidamente en las primeras 12 horas de fermentación con 23.9 % de consumo de azúcares correspondientes a una concentración de 15.1 g/L con respecto a los azúcares iniciales, lo que pudo provocar rápido aumento en el número de células viables (ver Figura 8-27 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Mientras que se observa una caída lenta desde la 12 horas hasta las 48 horas de fermentación, obteniéndose 4.02 g/L de azúcares residuales correspondientes al 6.3 % de azúcares no consumidos. Como se mencionó en la sección 8.1.2 la BAL aislada de pitahaya amarilla es de especie *Lactobacillus*, que son conocidos por sus vías de fermentación de hidratos de carbono (Axelsson, 1998; Vos *et al.*, 2011). En este caso la BAL G es heterofermentativa debido a que produce varios metabolitos a través de la degradación de la fuente de carbono (ácido láctico y acético). Los resultados obtenidos en consumo de sustrato pueden explicarse debido a que el sustrato utilizado es óptimo para el crecimiento de especies de *Lactobacillus* dado que contiene fuentes de nitrógeno, polisacáridos, potenciadores del crecimiento y vitaminas (De Man *et al.*, 1960).

Figura 8-28: Cinética de producción de biomasa y unidades formadoras de colonias por mililitro de la BAL G durante 48 horas de fermentación

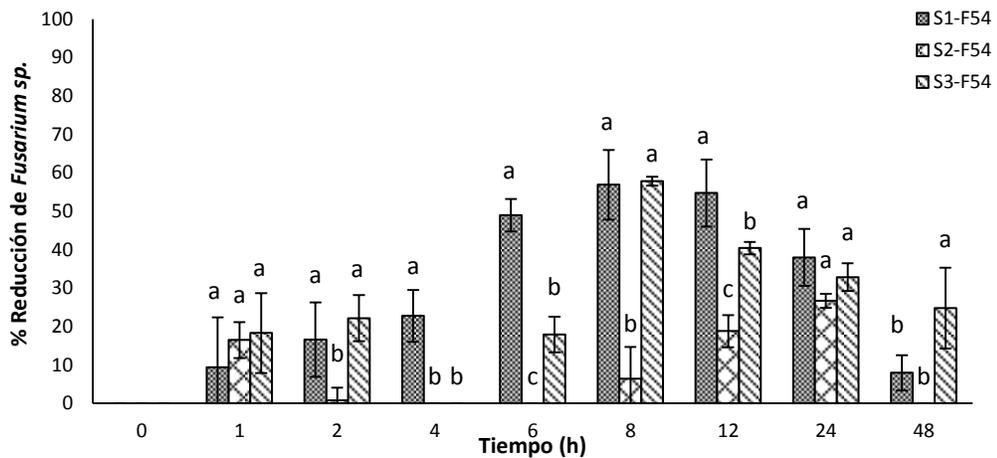


Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones.

Los resultados de biomasa y de concentración celular para la BAL G se observan en la Figura 8-28. Se pueden ver curvas de crecimiento microbiano con crecimiento exponencial hasta la octava hora de fermentación, y a partir de las 12 horas mayor muerte celular. Para la biomasa se obtuvo un incremento significativo entre la hora 2 y 8 con valores correspondientes a 2.73 y 6.17 g/L; donde este último valor fue la máxima producción de biomasa. También se puede ver que después de 8 horas de fermentación la BAL G estabiliza la producción de biomasa. Este comportamiento se correlaciona con la concentración de células vivas, donde se obtuvo el máximo crecimiento en la hora 8 con 7.75×10^9 cfu/mL. Además también se obtuvieron los parámetros cinéticos de la BAL G, como velocidad específica de crecimiento μ , % de consumo de sustrato, rendimiento celular ($Y_{x/s}$) y rendimiento en producto ($Y_{p/s}$) con valores correspondientes a $0,46 \text{ h}^{-1}$, 93,63 %, $0,045 \text{ gg}^{-1}$ y $0,54 \text{ gg}^{-1}$, respectivamente. A pesar que la BAL G obtuvo mayor porcentaje de consumo de sustrato, *W. confusa* presentó mayor selectividad por el ácido láctico (ver rendimientos en productos), mientras que la BAL G podría tener mayor selectividad por otros compuestos. Se debe resaltar que la rápida caída de ácido acético a partir de la hora 6 puede ser debido a que éste ácido puede ser precursor para la producción de otros metabolitos, esto también puede estar ocurriendo con *W. confusa*.

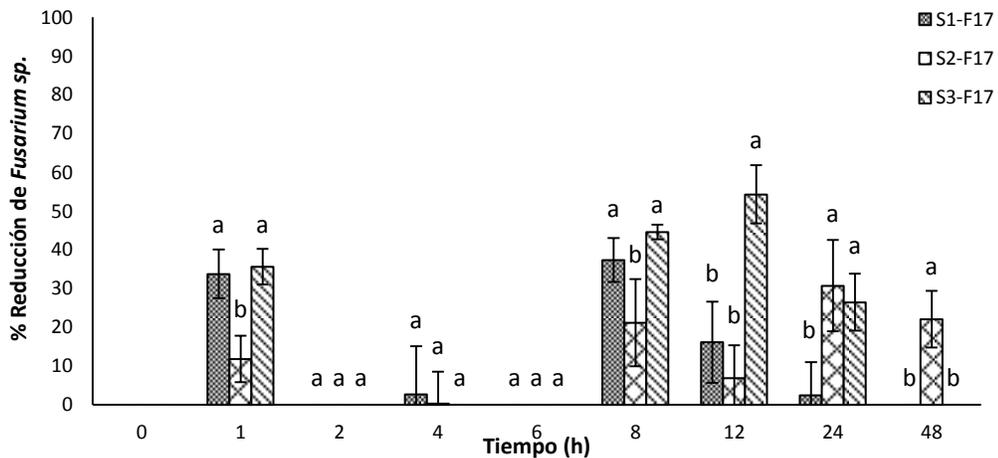
8.3.2 Cinética de actividad fungistática de tres sustancias producidos por *W. confusa* y la BAL G contra *Fusarium 54* y 17 en sustrato MRS y PDA

Figura 8-29: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de *W. confusa* contra *Fusarium 54* en sustrato MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Figura 8-30: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de *W. confusa* contra *Fusarium 17* en sustrato MRS

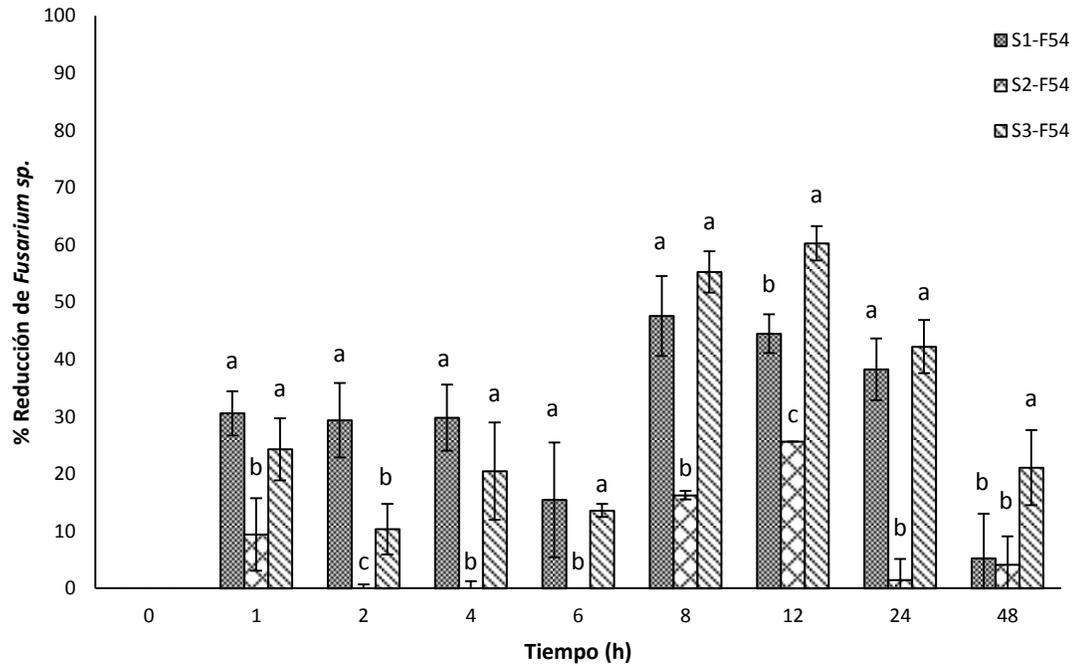


Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En sustrato MRS, la actividad fungistática de S1 y S3 contra F54 incrementó conforme aumentó la biomasa hasta obtener la máxima actividad fungistática, lo cual ocurrió en la 8 hora de fermentación, es decir, cuando la bacteria iniciaba su fase estacionaria de crecimiento (ver Figura 8-29). Lo cual indica que la producción de sustancias antifungales no está asociada al crecimiento de la bacteria. También se pudo evidenciar que no hubo diferencias entre estas dos sustancias en el tiempo de mayor actividad fungistática, lo cual se pudo observar en otros tiempos de fermentación; esto indica que el tiempo de obtención de las sustancias no afectó la actividad fungistática del fermentado (S1) y la biomasa (S3) para estos casos. La sustancia S2 tuvo un comportamiento oscilativo, sin embargo entre el tiempo 8 y 24 se observó una tendencia a incrementar su actividad fungistática, lo cual indica que el tiempo de obtención afectó el poder fungistático del sobrenadante. Esta sustancia fue la que menos poder fungistático ejerció sobre el crecimiento del hongo.

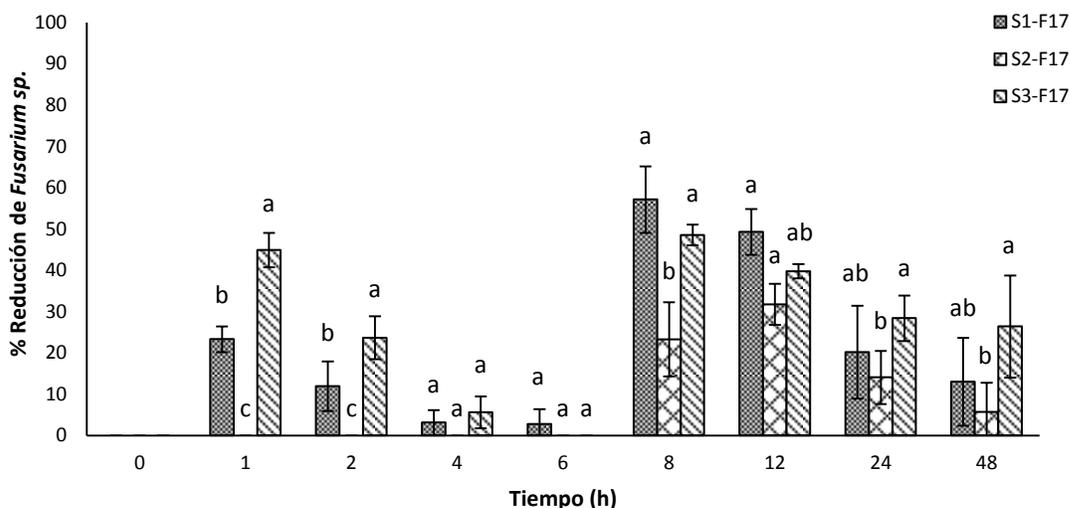
En sustrato MRS, la actividad fungistática de las sustancias S1 y S3 de *W. confusa* contra *Fusarium* 17 en todos los tiempos de fermentación fue menor a 60 %. En la Figura 8-30 se puede observar que la máxima actividad antifungal de la sustancia S1 fue en el tiempo 8, tiempo en el cual la bacteria se encontraba en su fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, la sustancia S3 tuvo su máxima actividad fungistática en el tiempo 12; es decir que dicha actividad tampoco se encuentra asociada al crecimiento microbiano. Con la sustancia 2 se obtuvo porcentajes de reducción menores al 40 %, en donde su máxima actividad fungistática se dio en el tiempo 24. Es decir que la actividad fungistática de S1 y S3 contra *F. 17* no se asocia al crecimiento de la bacteria, además los metabolitos causantes de dicha inhibición son producidos en la fase de estacionaria de la bacteria, por ende son metabolitos secundarios. Además este metabolito también tiene actividad fungistática cuando se obtuvo en el tiempo 48 de fermentación, lo cual puede deberse a la producción de compuesto antifúngicos.

Figura 8-31: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de *W. confusa* contra *Fusarium 54* en sustrato PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Figura 8-32: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de *W. confusa* contra *Fusarium 17* en sustrato PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

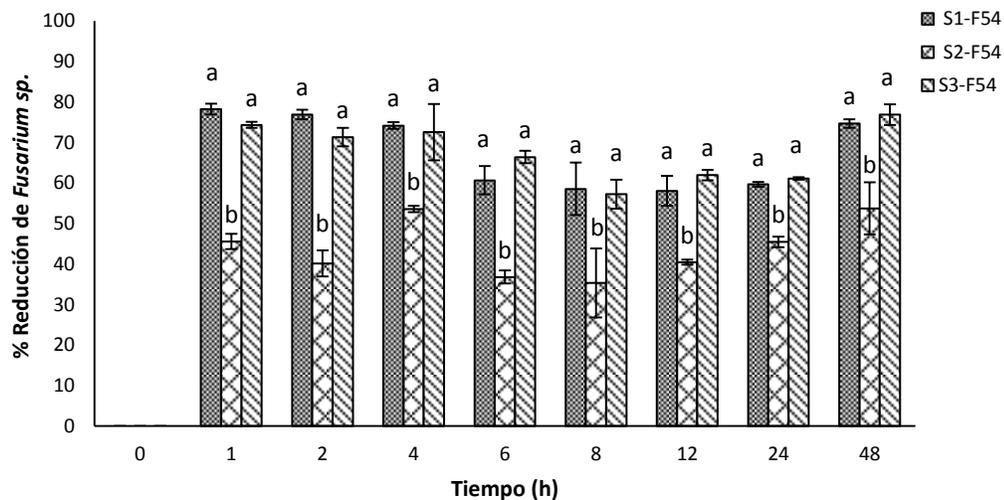
Para las cinéticas de PDA, la actividad fungistática contra *F. 54* se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 8-31, donde se evidencia tanto para S1 y S3 que las primeras horas de fermentación el poder fungistático fue variable. Sin embargo a partir del tiempo 8 y 12, respectivamente; se observaron las máximas reducciones del crecimiento del hongo para cada una de las sustancias mencionadas, además se pudo ver un comportamiento descendiente a partir de este momento. Con el metabolito S2 se obtuvo la menor actividad fungistática con respecto a S1 y S3, además su comportamiento fue variable con respecto al tiempo; también se observa que su máximo poder fungistático se obtuvo en el tiempo 8 y 12, lo cual es acorde con los resultados obtenidos con las otras sustancias. Se concluye que las sustancias S1, S2 y S3 no se encuentran asociadas al crecimiento de la bacteria. Sin embargo el poder inhibitorio de la sustancia S3 fue significativamente ($p > 0.05$) mayor que el de S1 en el tiempo 12 y 48. Este comportamiento resulta complejo de explicar, teniendo en cuenta que la bacteria (S1) y la biomasa (S3) son sustancias similares, la primera se encuentra con el sobrenadante (S2) y la biomasa se encuentra libre de sobrenadante; sin embargo esta biomasa en el tiempo puede seguir produciendo metabolitos. Por tanto se esperaría comportamientos parecidos en todos los tiempos de fermentación.

Los porcentajes de reducción obtenidos con el hongo *F. 17* en sustrato PDA fueron menores a 60 %. En la Figura 8-32 se puede observar un comportamiento descendiente desde el tiempo 1 hasta el 6, y lo mismo sucede entre el tiempo 8 y 48 para las

sustancias S1 y S3. Se resalta que estas sustancias producen su máxima actividad antifungal en el tiempo 8. Estos resultados indican que el metabolito responsable de la mayor actividad fungistática se produce durante la fase estacionaria de crecimiento microbiano como en la mayoría de los casos. También se observa que los mayores porcentajes de inhibición no tuvieron diferencias entre sí para cada tiempo, lo cual indica que la sustancia S1 o S3 ejercerá el mismo efecto frente al hongo *F. 17*. Por otro lado la sustancia 2 tuvo mayor efecto antagónico en el tiempo 8 y 12, donde la bacteria se encuentra en su fase estacionaria de crecimiento.

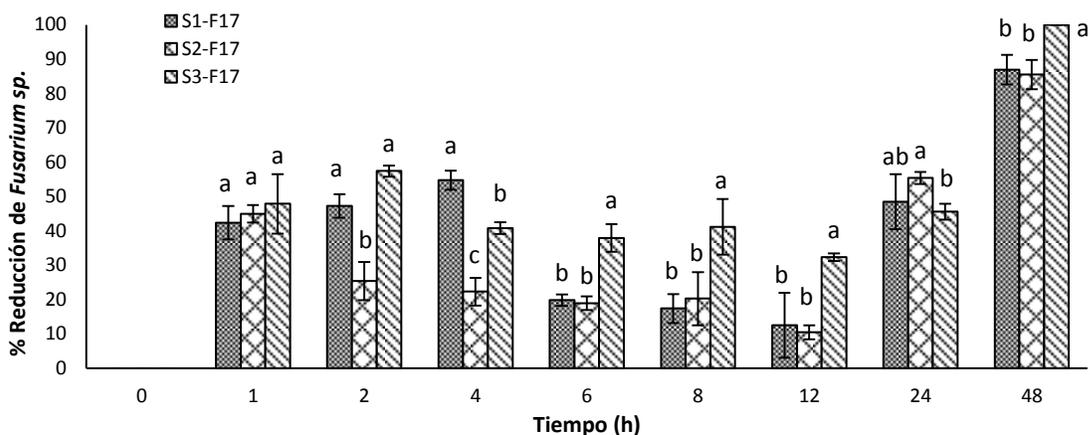
Los resultados obtenidos en todas las pruebas fungistáticas con las tres sustancias pueden ser debido a que los metabolitos causantes del poder antifungal son bajo peso molecular. Es necesario confirmar esta hipótesis con estudios futuros.

Figura 8-33: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra *Fusarium 54* en sustrato MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Figura 8-34: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra *Fusarium 17* en sustrato MRS



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

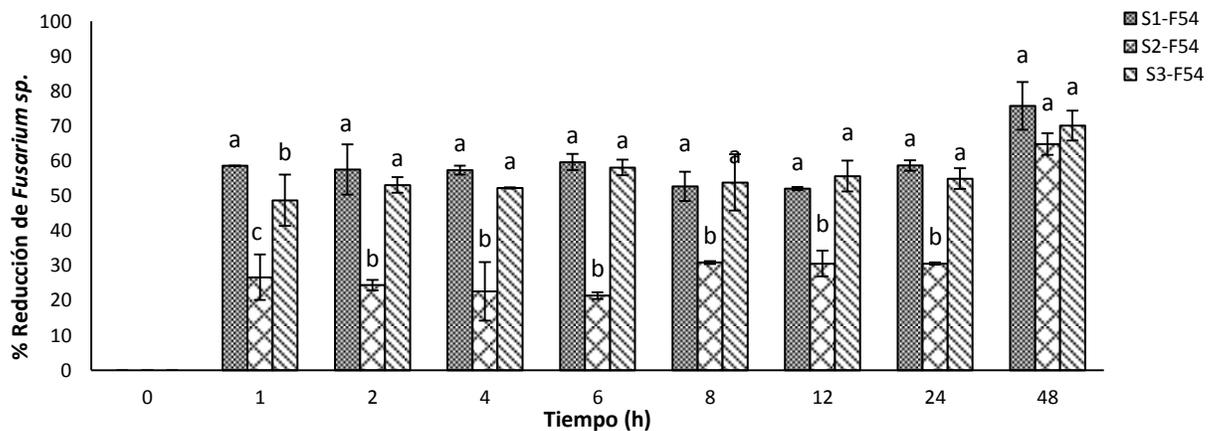
En sustrato MRS, la mayor actividad fungistática de la BAL G contra *F. 54* se obtuvo con las sustancias S1 y S3, donde no hubo diferencias significativas entre sí para todos los tiempos. En la Figura 8-33 se observa para S1 y S3 un comportamiento constante desde el tiempo 1 y 4; la actividad fungistática disminuyó a la 6 y 8 h; y se incrementó en la hora 12 hasta cumplir 48 h. La mejor actividad fungistática se obtuvo en el tiempo 48 con porcentajes de reducción superiores al 70 % para S1 y S3. Con esta BAL se puede observar que la sustancia S2 ejerció menor efecto inhibitorio en comparación que las otras sustancias; lo cual es acorde con lo obtenido con *W. confusa*, sin embargo con la BAL G se observan porcentajes de reducción superiores al 30 % para todos los tiempos. Además el comportamiento de la sustancia S2 fue oscilativo, donde en el tiempo 48 se obtuvo su máxima actividad.

Se concluyó que utilizar la S1 y S3 de forma independiente como biocontrolador no afecta los resultados de actividad fungistática. Estos resultados no se han reportado en literatura científica, por lo cual no existe explicación para este comportamiento. Sin embargo se puede plantear la hipótesis que los metabolitos responsables de la actividad fungistática podrían producirse durante las primeras y últimas horas de fermentación, indicando que la variable respuesta podría estar asociada a la producción de biomasa y además también esta actividad puede ser debido a metabolitos secundarios producidos en las últimas horas de fermentación, que realzan el poder fungistática en el tiempo 48; entonces podríamos estar hablando de un efecto sinérgico entre compuestos

antifungales, tal como lo planteo Voulgari *et al.* (2010); Yang y Chang (2010). Por lo que es complejo dilucidar el tipo de metabolito que pudo ocasionar la reducción del crecimiento del hongo. Según estos resultados nosotros recomendamos estudios específicos en cada una de las sustancias estudiadas.

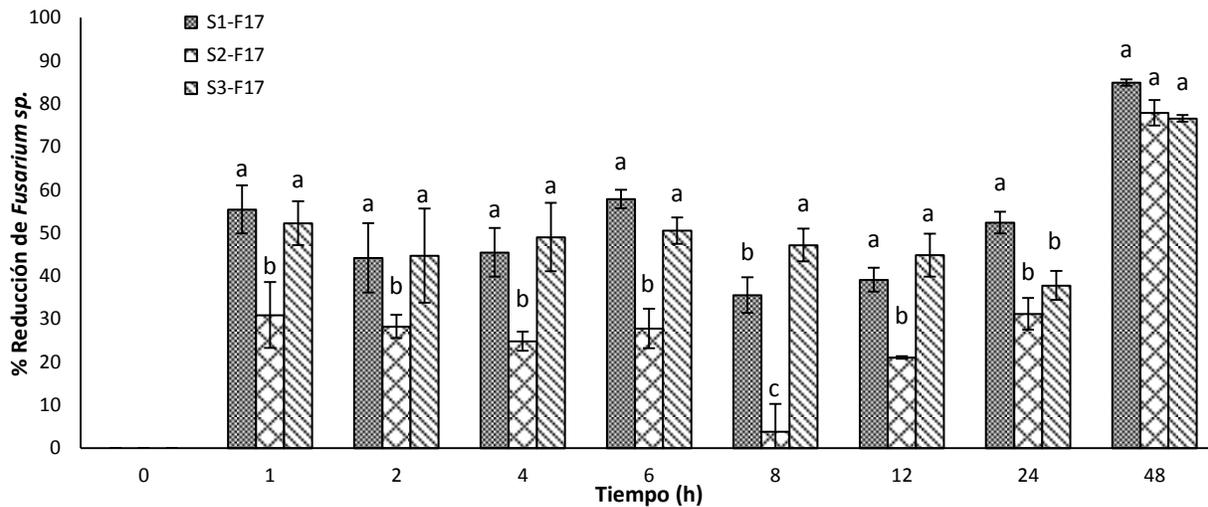
El poder fungistático de las sustancia S3 contra *F. 17* en sustrato MRS fue significativo con respecto a S1 y S2 en algunos tiempos de fermentación. Es decir que la actividad fungistática producida por S2 no tuvo diferencias significativas con respecto a la sustancia S1 en algunos tiempos de fermentación. En la **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 8-34 se observa que la máxima actividad fungistática de las tres sustancias se obtuvo en el tiempo 48, donde hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad fungistática producida por S1 con respecto a la obtenida con S2 y S3. Estos resultados podrían correlacionarse con la producción de ácido láctico que es alto en el tiempo 48 de fermentación, o también puede atribuirse a otro tipo de metabolitos.

Figura 8-35: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria o fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra *Fusarium 54* en sustrato PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Figura 8-36: Cinética de actividad fungistática de tres sustancias (■ S1: bacteria fermentado, ▨ S2: sobrenadante y ▩ S3: biomasa) de fermentación de la BAL G contra *Fusarium 17* en sustrato PDA



Las barras de error representan las desviaciones estándar de los ensayos con tres repeticiones y una caja de Petri como unidad experimental. Medias seguidas por la misma letra en las barras significa que no existen diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En la Figura 8-35 se observa que los mejores resultados de porcentajes de reducción se obtuvieron en el tiempo 48 h, el cual fue el único punto, donde no se presentaron diferencias significativas entre las tres sustancias. También se puede ver que a través del tiempo para cada sustancia se sigue un patrón constante en la variable respuesta, excepto para el tiempo 48, en el cual se marca diferencia.

En la Figura 8-36 se puede resaltar, que los mejores resultados de actividad fungistática se obtuvieron en el tiempo 48, donde no se presentaron diferencias significativas entre actividades fungistáticas de las tres sustancias. La actividad fungistática lograda para las tres sustancias desde el tiempo 1 hasta 48 fue variable. Estos resultados obtenidos con *F. 17* pueden ser debido a la alta producción de ácido láctico o a un efecto sinérgico con otro tipo de metabolito.

Los resultados obtenidos en todas las pruebas fungistáticas con las tres sustancias pueden ser debido a que los metabolitos causantes del poder antifungal son de alto y bajo peso molecular. Es necesario confirmar esta hipótesis con estudios futuros

Para analizar la actividad antifungal de BAL contra 2 cepas de *Fusarium* (*F. 54* y *F. 17*), se evaluó la inhibición del crecimiento de estos dos hongos patógenos con dos cepas ácido-lácticas, *W. confusa* y la BAL G, las cuales fueron previamente aisladas de líquido ruminal bovino y cultivos de pitahaya amarilla afectados con podredumbre basal, respectivamente. Se encontró que ambas cepas mostraron fuerte actividad antifungal contra las cepas *F. 54* y *F. 17*. La actividad antifungal del fermentado, el sobrenadante y la biomasa de las BALs (S1, S2 y S3) contra *Fusarium* se muestra en las figuras 29 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Los resultados obtenidos con los metabolitos de *W. confusa* indican que las sustancias S1 y S3 ejercieron el mayor efecto antagónico contra los hongos en estudio cuando se obtuvieron dichos productos de la 8 y 12 hora de fermentación, tiempo en el cual la bacteria se encuentra en su fase estacionaria de crecimiento, indicando que los productos responsables de la actividad fungistática podrían ser metabolitos secundarios.

La actividad fungistática de S2 fue oscilatoria y menor en comparación con S1 y S3 en todos los tiempos de obtención los productos (S1, S2 y S3). Resultados similares se obtuvieron con Ahmadova *et al.* (2013) donde se obtuvo actividad antifúngica de la cepa *Lb. curvatus* A61, aislada de queso Azerbaijani contra *Cladosporium* y *Fusarium ssp*; sin embargo esta misma actividad se redujo cuando se utilizó sobrenadantes del cultivo de la BAL. Autores han demostrado que la actividad antifúngica es debido a compuestos de diferente naturaleza. Lavermicocca *et al.* (2000), Ström *et al.* (2002), Zhang *et al.* (2010a), Ryan *et al.* (2011) encontraron que el poder antifúngico de bacterias es debido a la producción de ácido fenil láctico (PLA), 4-hidrofenil láctico, ciclo (l-Phe-l-Pro), ciclo (l-Phe-trans-4-OH-l-Pro), ácido propionico, ácido cumárico, ácido fenilpropanico, ácido 2-methylcinnamic, ácido salicílico y sodio decanoato. Otros autores reportan bacteriocinas y compuestos de bajo peso molecular con actividad antifungal producida por *Lb. pentosus* y *Lb. coryniformis* (Magnusson *et al.*, 2003). Se ha reportado que estas sustancias de forma independiente no causan efecto antagónico, ya que las cantidades producidas en una fermentación no llegan a las concentraciones mínimas para inhibir un hongo Vermeulen *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2009). Ahmadova *et al.* (2013) reportaron que la baja actividad antifúngica del sobrenadante es debido a la baja concentración de los compuestos responsables de dicha actividad. Por lo cual la actividad fungistática de la

BAL podría ser debido a un efecto sinérgico entre los diferentes compuestos producidos por la bacteria durante la fermentación y la incubación. Esta actividad fungistática, según Corsetti *et al.* (1998), Schnurer y Magnusson (2005) se ve reforzada por los productos finales de la fermentación, como ácidos orgánicos.

Además estos resultados indican que cuando se obtiene el producto de fermentación en fase estacionaria la actividad fungistática es máxima. Sin embargo se debe tener en cuenta que estos ensayos se realizaron en cajas de Petri con medio sólido (MRS y PDA), los cuales se incubaron durante 7 días; es decir que la bacteria presente en dichos productos (S1 y S3) siguió su proceso de crecimiento durante estos días de incubación. Por lo tanto la actividad fungistática pudo variar durante el tiempo de incubación. Esta última variable no fue objeto de estudio pero debe tenerse en cuenta en futuros estudios. De todas formas, este estudio demuestra que las pruebas fungistáticas realizadas con productos de fermentación de una BAL como S1, S2 y S3 se afectó por el tiempo de obtención de cada una de ellas; es decir cuando el producto se obtuvo a partir de la BAL en fase estacionaria se logró resultados de actividad fungistática altos contra especies de *Fusarium* como, *F. 54* y *F. 17*.

De otro lado, los resultados obtenidos con las sustancias S1 y S3 también pueden explicarse por los mecanismos de comunicación entre bacterias, denominado Quórum Sensing (QS). A este mecanismo se le atribuye la producción de bacteriocinas de bacterias Gram positivas, en donde la expresión de genes y la síntesis de proteínas dependen de la concentración celular (Kuipers *et al.*, 1998). En algunos casos de bacterias Gram positivas, dicho mecanismo se regula por un péptido inductor que pueden ser BLIS (Bacteriocin-like inhibitor substances) o bacteriocinas sin actividad antimicrobiana, encargadas de detectar la densidad celular a través de señales químicas, y un regulador de respuesta que sintetiza, transporta y regula la formación de bacteriocinas con actividad antimicrobiana (Kleerebezem, 2004). Es decir que el incremento de la población podría inducir la síntesis de bacteriocinas en S1 y S3.

Las bacteriocinas se producen generalmente en la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria temprana, la cual es inducida por situaciones de estrés y competencia con otros microorganismos (Martinez *et al.*, 2013), en nuestro caso

Fusarium. El modo de acción de las bacteriocinas depende de factores como, cepa, condiciones de crecimiento (pH, temperatura, nutrientes), competencia con otros microorganismos, entre otros (Demain, 1998; Diep y *et al.*, 2000; Maldonado 2004; Barboza-Corona *et al.*, 2007; Parada *et al.*, 2007). Por lo que su actividad antagónica puede ser variable, inestable e inconsistente (Schillinger *et al.*, 1996). Se ha reportado que la bacteriocina actúa formando poros a través del diferencial del potencial citoplasmático (Ghraiiri *et al.*, 2012). En algunos casos tiene un efecto bacteriostático, en otros casos bactericida, donde puede haber lisis celular o no (Cintas *et al.*, 2001). La ausencia u agotamiento de la bacteria podría limitar la producción del péptido que induce la producción de la sustancia antimicrobiana; que indirectamente esta correlacionada con el crecimiento celular. Esto en caso que la inhibición se le atribuya a este mecanismo de QS. Todo lo anterior, resulta en bajos porcentajes de reducción del crecimiento del hongo, variabilidad e inconsistencia de la misma variable.

La producción de bacteriocinas se puede dar en fermentaciones *in vitro* en condiciones óptimas de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, entre otras (Leroy y De Vuyst, 2005); es decir que cualquier variación en éstas condiciones puede ser determinante en la síntesis de estos compuestos y por ende en la producción de biomasa (Verluyten *et al.*, 2004) ya que la producción de bacteriocinas es dependiente del crecimiento celular de la bacteria (Leroy y De Vuyst, 1999).

Este mecanismo de producción de bacteriocinas también fue citado por Nes *et al.* (1996) donde para la síntesis de Sakacina P de *Lb. Sake* necesitaron un péptido sin actividad antibacteriana como factor inductor. Diep *et al.* (1996) también encontraron que la presencia de moléculas peptídicas sin actividad fueron responsables de la síntesis de bacteriocinas de *Lb. plantarum*.

Existen otros mecanismos que no requieren de una cepa sensible como péptido inductor, es decir que la misma bacteriocina regula su propia síntesis, como por ejemplo, la nisina (Guder *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (2012), demostraron que el péptido (inductor) FII-22 obtenido del sobrenadante libre de células de *Lb. pentosus* indujo la producción una bacteriocina, la cual fue afectada por la cantidad del péptido inductor agregada al ensayo y el tiempo de incubación en el cual se agregó al cultivo, ellos obtuvieron la producción de bacteriocina óptima cuando se agregó el péptido al

cultivo 8 horas después de la incubación. Otros han reportado que la producción de la bacteriocina PLNC8 producida por *Lb. plantarum* es estimulada ambientalmente por la presencia de bacterias Gram positivas específicas (Maldonado *et al.*, 2004).

Por otro lado, comparando la actividad fungistática de la bacteria G y *W. confusa* se puede afirmar que S1, S2 y S3 obtenidas de la fermentación de la BAL G tuvieron mayor actividad fungistática contra las especies de *Fusarium*

Con respecto a la BAL G, algunos resultados de actividad fungistática se asocian con la fase exponencial de crecimiento de la bacteria, pero los mejores resultados fueron logrados con las sustancias obtenidas en los últimos tiempos de fermentación; es decir que también existen metabolitos asociados a la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria. Estos resultados, también puede deberse a los mecanismos de quorum sensing utilizados por las bacterias, el cual depende del nivel de estrés de ésta misma; que a su vez es causado por factores como tipo hongo (*F. 54* y *F. 17*), y medio (MRS y PDA). Estos resultados generalmente se han atribuido al efecto de los ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico (Elsanhoty, 2008). Autores han planteado la hipótesis con respecto al mecanismo de inhibición de ácidos orgánicos, la cual consiste en el daño que ocasionan estos ácidos sobre la membrana plasmática debido a la neutralización y permeabilidad, que ocasiona la muerte de microorganismos patógenos (Batish *et al.*, 1997; Dalié *et al.*, 2010).

Otros estudios plantean que la inhibición de hongos podría ser debido a la producción de metabolitos dependientes de condiciones específicas de pH y temperatura (Elsanhoty, 2008). Baek *et al.* (2012) demostraron que el ácido acético y láctico producido por *Leuconostoc citreum* y *W. confusa* fueron potentes en la inhibición de *Clostridium* sp. YS1, *Neurospora* sp. YS3, y *P. crustosum* YS2, donde obtuvieron una producción de ácido acético alta en comparación con nuestros resultados con de 2.66 y 3.62 g/L para *L. citreum* y *W. confusa*, respectivamente. Sin embargo otros estudios han reportado que el poder fungistático de BAL es debido al efecto sinérgico entre otros compuestos (Hassan y Bullerman 2008; Voulgari *et al.* 2010; Yang y Chang 2010). Otros autores reportan actividad antifungal de *Lb. plantarum*, la cual fue máxima en la fase exponencial y se mantuvo en la fase estacionaria de crecimiento; lo cual se puede comparar con nuestros

resultado con la BAL G (Wang *et al.*, 2011). Dallagno *et al.* (2011) encontraron que *Lb. Plantarum* produce metabolitos al final de la fermentación (72 horas), lo cual según los autores ha ayudado al conocimiento de metabolitos con poder antifungal.

Una gran cantidad de estudios sobre la actividad fungistática de BAL han sido reportados. Laitila *et al.* (2002) demostraron que BAL como *Lb. plantarum* poseen efecto fungistático contra cepas de *Fusarium* que causan problemas en cereales. Prema *et al.* (2010) encontraron que cepas de *Lb. plantarum* tienen un amplio espectro contra hongos en pruebas en platos de agar. Ström *et al.* (2002) aislaron un cepa de *Lb. plantarum* de ensilaje de hierba, donde encontraron una fuerte actividad antifungal, y lo atribuyeron a dipéptidos cíclicos como, ciclo(L-Phe-L-Pro), ciclo(L-Phe-trans-4-OH-LPro) y 3-ácido feniláctico. Wang *et al.* (2011) encontraron que *Lb. plantarum* IMAU100 posee un alta actividad antifungal contra *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Phytophthora drechsleri Tucker*, *F. oxysporum* y *Glomerella cingulata*. Tropcheva *et al.* (2014) demostraron la capacidad antifungal de cepas ácido lácticas KR3, KR51 y KR53, una de ella identificada como *Lb. brevis* contra *F. graminearum*. Autores reportan la fuerte actividad inhibitoria de *Lb. reuteri* R2 contra *Trichophyton tonsurans* (Guo *et al.*, 2011). Otros resultados de inhibición, en este caso contra *C. gloeosporioides* lograron utilizando cultivos de BAL y sus sobrenadantes, las cuales fueron aisladas de frutas y vegetales (El-Mabrok *et al.*, 2013). Delavenne *et al.* (2012) demostraron una fuerte actividad antifungal de *Lb. Harbinensis* en yogurt contra todas la especies de hongos evaluadas que incluyen *Debaryomyces hansenii*, *Kluveromyces lactis*, *K. marxianus*, *P. brevicompactum*, *R. mucilaginosa* y *Yarrowia lipolytica*. Janisiewicz *et al.* (2000) plantearon y demostraron que el poder inhibitorio de BAL contra patógenos de plantas puede ser debido competencia por nutrientes y espacio, considerado como un mecanismo de antagonismo.

A pesar que ya existe resultados de BAL con patógenos en plantas, no se encuentra reportes de estudios con hongos específicos de cultivos de pitahaya amarilla. Para nuestro conocimiento este es el primer estudio de BAL aisladas de cultivos de pitahaya amarilla en el Valle del Cauca – Colombia. En nuestro trabajo se encontró una especie de *Lactobacillus* (BAL G) y de *W. confusa* con alta actividad fungistática contra especies de *Fusarium* (*F. 54* y *F. 17*); patógenos causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla.

8.3.3 Análisis de microscopia SEM

Mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) se observaron cambios morfológicos de los hongos *F. 54* y *F. 17* por efecto de la exposición por 7 días a las sustancias S1, S2, S3 producidas por *W. confusa* y por la BAL G. La observación SEM muestra que la morfología normal de *F. 54* y *F. 17* son hifas con forma tubular con paredes celulares suaves, septadas y conidios con depresión central o curvadas (ver Figura 8-37 a, c). Después de los tratamientos los hongos presentaron morfologías con daño en la pared celular de las hifas y porosidades. Para *W. confusa* contra *F.54* y *F. 17* se observó que la biomasa (S3) obtenida en el tiempo 8 de fermentación afectó significativamente la morfología ambos hongo, principalmente se pueden ver porosidades en las paredes de las hifas (ver Figura 8-37 b-d). Esto demuestra que la biomasa producida por *W. confusa* no solo afectan el crecimiento de los hongos en cajas de Petri, sino que también induce cambios en la las hifas y conidos del hongo.

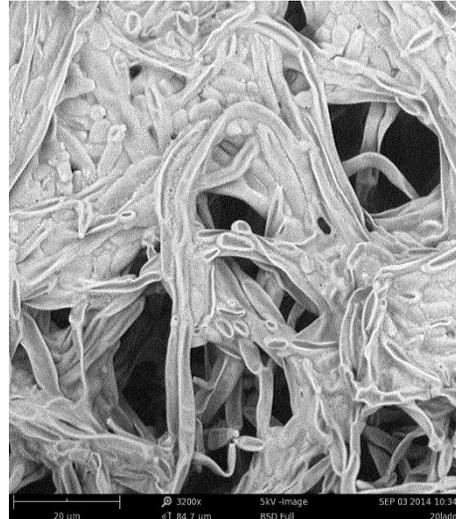
En la Figura 8-38 a,b,c se muestra el efecto de las sustancias S1 y S3 de la BAL G obtenidas en el tiempo 4 de fermentación contra *F. 54* con respecto al control. Para *F. 17* se obtuvo que las tres sustancias obtenidas en el tiempo 4 de fermentación afectaron significativamente la forma de las hifas y conidios, observándose hifas con daño en la pared celular y múltiples porosidades (ver Figura 8-39, a,b,c,d). Los resultados obtenidos son acordes a lo reportado por Ghrairi *et al.* (2012), y Okereke y Montville (1992), quienes reportan el mecanismo de acción de algunas bacteriocinas, principalmente lantibioticos, los cuales inhiben los microorganismos patógenos formando poros en su membrana celular, mediante la caída del potencial transmembranal y/o con el gradiente de pH.

Esto tiene como resultado la interrupción del transporte de aminoácidos y causa la liberación de material celular.

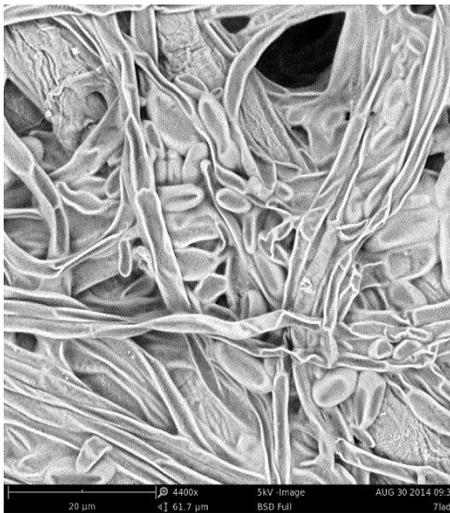
Figura 8-37: Cambios Morfológicos en *Fusarium* 54 y 17 durante las pruebas de actividad fungistáticas con biomasa (S3) de *W. confusa* obtenida en el tiempo 8 de fermentación



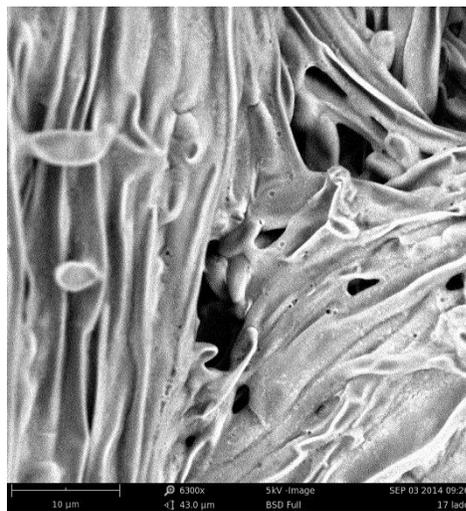
a. Control *Fusarium* F17



b. Biomasa (S3) de *W. confusa* obtenida en el tiempo 8 de fermentación vs. *Fusarium* F54

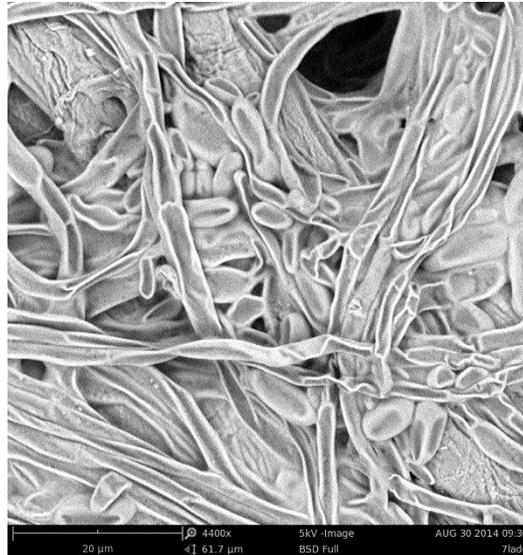


c. Control *Fusarium* F54

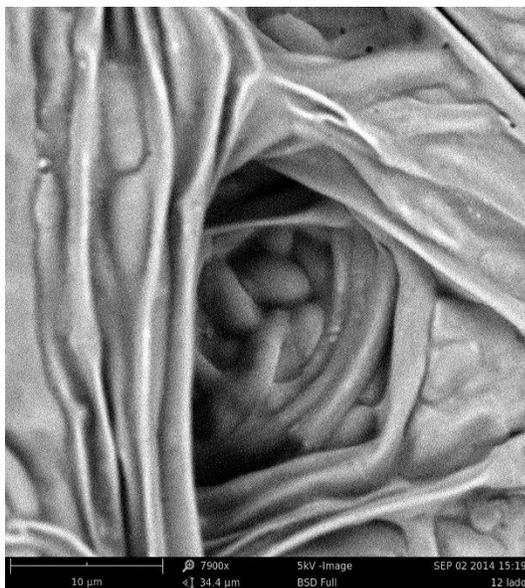


d. Biomasa (S3) de *W. confusa* obtenida en el tiempo 8 de fermentación vs. *Fusarium* F17

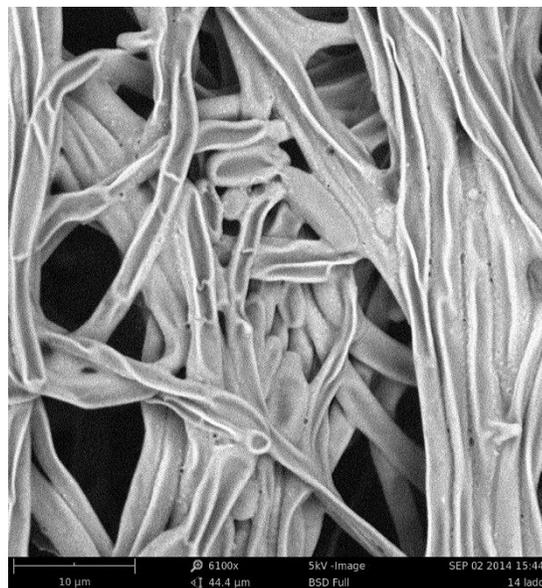
Figura 8-38: Cambios Morfológicos en *Fusarium* 54 durante las pruebas de actividad fungistáticas con fermentado (S1) y biomasa (S3) de la BAL G obtenidas en el tiempo 4 de fermentación



a. Control *Fusarium* F54

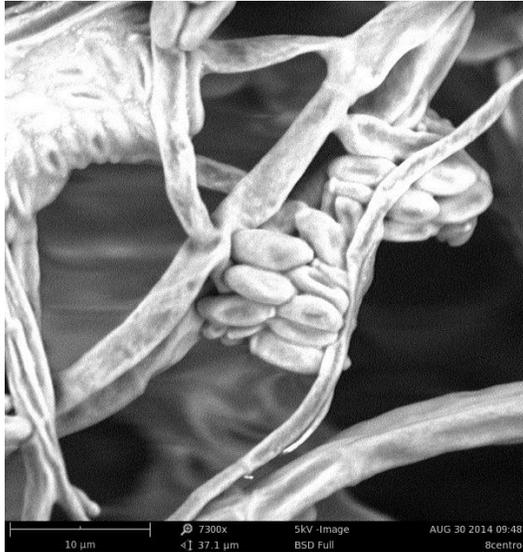


b. Fermentado (S1) de la BAL G obtenida en el tiempo 4 de fermentación vs. *Fusarium* F54

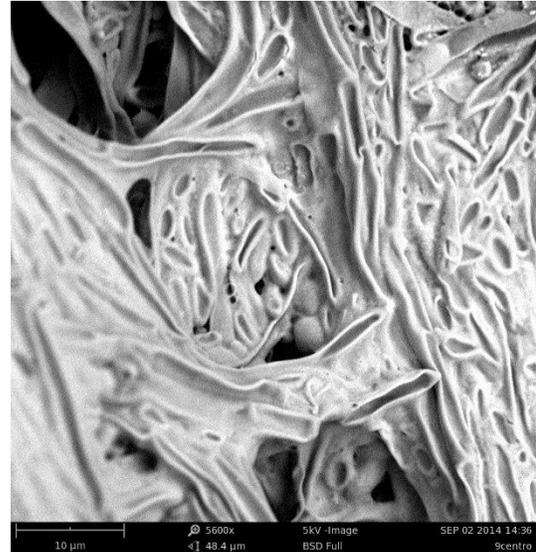


c. Biomasa (S3) de la BAL G obtenida en el tiempo 4 de fermentación vs. *Fusarium* F54

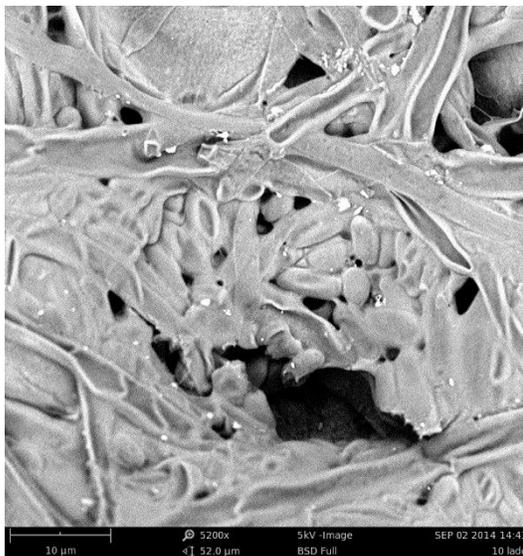
Figura 8-39: Cambios Morfológicos en *Fusarium 17* durante las pruebas de actividad fungistáticas con fermentado (S1), sobrenadante (S2) y biomasa (S3) de la BAL G obtenidas en el tiempo 4 de fermentación



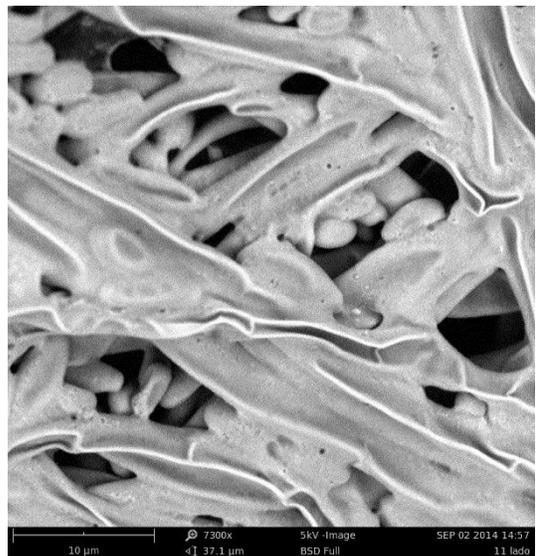
a. Control *Fusarium F17*



b. Fermentado (S1) de la BAL G obtenida en el tiempo 4 de fermentación vs. *Fusarium F17*



c. Sobrenadante de la BAL G (S2) obtenida en el tiempo 4 de fermentación vs. *Fusarium F17*



d. Biomasa (S3) de la BAL G obtenida en el tiempo 4 de fermentación vs. *Fusarium F17*

8.4 Caracterización molecular a *W. confusa* y a la bacteria ácido-láctica aislada de cultivos de pitahaya amarilla

Se amplificó por PCR y se secuenció un fragmento de aproximadamente 700 bp del gen ribosomal 16S para *W. confusa* y para la BAL G (Figura 8-40). Ambos fragmentos incluyen las regiones variables V1 a la V4 del gen 16S rRNA. Para *W. confusa* se obtuvo una secuencia de 664 nt que presentó un porcentaje de identidad de 100 % con *W. Cibaria* strain II-I-59 16S ribosomal RNA (NR_036924) y un 98.85 % con *W. confusa* strain JCM 1093 16S ribosomal RNA (NR_113258) (ver Tabla 8-4).

Serna *et al.* (2010) reportan la identificación bioquímica de la BAL utilizada en este estudio como *W. Confusa*; sin embargo, la caracterización molecular realizada en este estudio mostró un 100 % de identidad con la bacteria *W. cibaria*. Por lo anterior, en este estudio se demuestra mediante caracterización molecular que la BAL aislada de líquido ruminal es *W. cibaria*.

Varios estudios han reportado que especies relacionadas al género *Weissella* poseen actividad antibacteriana y fungistática contra patógenos (Trias *et al.*, 2008; Mauch *et al.*, 2010; Ndagano *et al.*, 2011). Baek *et al.* (2012) reportaron que BAL como *Leuconostoc citreum* y *W. confusa* poseen actividad inhibitoria contra *Clostridium sp.*YS1, *Neurospora sp.* YS3, and *Penicillium crustosum* YS2., lo que fue atribuido a la producción de ácido acético y láctico de estas bacterias.

Para la BAL G que se aisló de cultivos de pitahaya amarilla, específicamente de la base de fruta afectada con *Fusarium*, se obtuvo una secuencia de 631 nt, que mostró un porcentaje de identidad de 100 % con *Lb. plantarum* WCFS1 strain WCFS1 16 S ribosomal RNA (NR_075041), un 100 % *Lb. pentosus* 124-2 16S ribosomal RNA (NR_029133) y un 99.85 % con *Lb. plantarum* strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA (NR_113338) (ver Tabla 8-5). Por lo anterior, se recomienda secuenciar un fragmento mayor del gen ribosomal 16S para confirmar su identidad o secuenciar otros genes que permitan distinguir entre *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*.

En nuestro estudio se obtuvo altos porcentajes de reducción del crecimiento de especies de *Fusarium* en pruebas fungistática con la BAL G (ver Tabla 8-2), la cual fue identificada molecularmente como *Lb. plantarum*. Resultados similares reportan Arasu *et al.* (2014) con especies de *Lactobacillus* aislados de productos fermentados de Korea, donde la cepa antagonista con mayor poder inhibitorio contra hongos fue *Lb. plantarum*. Esta BAL ha sido reportada por diversos autores (Latila *et al.*, 2002; Sjögren *et al.*, 2003; Ström *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Sangmanee *et al.*, 2014) con potencial inhibitorio contra microorganismos patógenos, como bacterias y hongos, lo cual se atribuye a los metabolitos que ésta produce durante su crecimiento.

Figura 8-40: Amplificación por PRC de un fragmento de 700pb del gen ribosomal 16S. M, marcador de peso molecular 1Kb; 1 y 2, DNA genómico de *W. confusa*; 3 y 4, DNA genómico de la BAL G

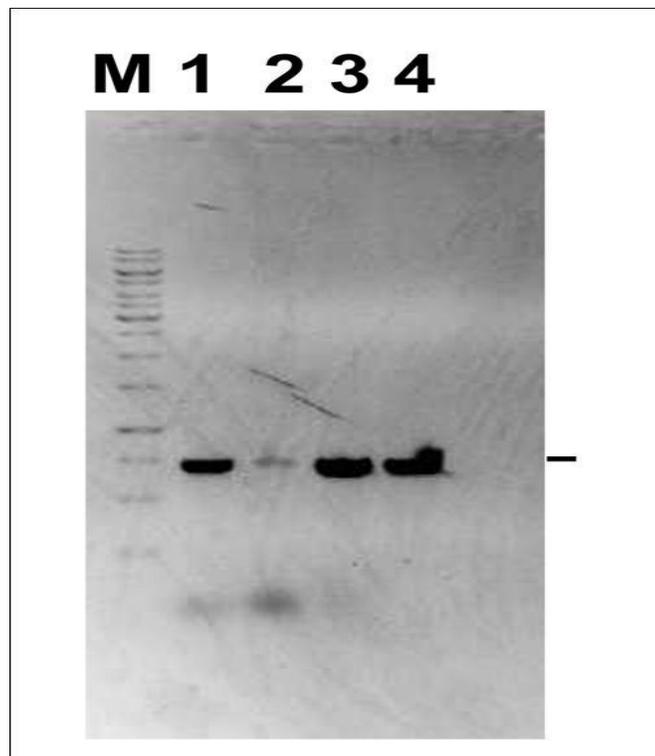


Tabla 8-4: Análisis blastn del gen ribosomal 16S de *W. confusa* realizado en el programa CLC Main Workbench 7.0

Número de accesión	Bacteria	Valor E	Score	% identidad
NR_036924	Weissella cibaria strain II-I-59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.390,00	100,00
NR_113258	Weissella confusa strain JCM 1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.350,00	98,85
NR_040816	Weissella confuse strain JCM 1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.330,00	98,83
NR_040813	Weissella viridescens strain NRIC 1536 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.224,00	95,77
NR_075058	Weissella koereensis KACC 15510 strain KACC 15510 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.220,00	95,11
NR_029041	Weissella koereensis strain S-5623 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.202,00	95,04
NR_113775	Weissella hellenica strain NBRC 15553 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.192,00	94,53
NR_117039	Weissella ceti strain 1119-1A-09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.188,00	95,65
NR_025642	Weissella soli strain Mi268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.186,00	94,24
NR_112087	Weissella kandleri strain NRIC 1628 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.184,00	94,62
NR_040809	Weissella minor strain NRIC 1625 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.184,00	94,60
NR_044759	Weissella paramensenteroides 16S ribosomal RNA gene, complete sequence>gi 64531904 ref NR_118771.1 Weissella hellenica strain NCFB 2973 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.182,00	94,39
NR_044659	Weissella kandleri strain L250 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.174,00	93,56
NR_040822	Weissella thailandensis strain FS61-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.170,00	94,06
NR_118386	Weissella diestrammenae strain ORY33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.158,00	95,17
NR_040815	Weissella paramensenteroides strain NRIC 1542 16S ribosomal RNA gene, partial sequence>gi 558508644 ref NR_104568.1 Weissella paramensenteroides strain NRIC 1542 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.154,00	93,86
NR_118876	Weissella viridescens strain NCDO 1655 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.126,00	91,51
NR_114312	Weissella oryzae strain SG25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.120,00	92,37
NR_040812	Weissella halotolerans strain NRIC 1627 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.112,00	92,87
NR_119224	Weissella hellenica strain NCFB 2973 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.066,00	96,10
NR_116326	Weissella beninensis strain 2L24P13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.048,00	90,70
NR_108858	Weissella fabalis strain M75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.038,00	90,22
NR_042663	Weissella ghanensis strain 215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.038,00	90,22
NR_116897	Weissella fabaria strain 257 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.018,00	89,64
NR_036788	Lactobacillus pontis strain LTH 2587 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	892,00	86,02

NR_043148	Lactobacillus oligofermentaans strain AMKR 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	872,00	85,80
NR_041830	Leuconostoc fallax strain DSM 20189 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	872,00	86,30
NR_119069	Lactobacillus reuteri strain DSM 20016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	872,00	85,53

Tabla 8-5: Análisis blastn del gen ribosomal 16S de la BAL G realizado en el programa CLC Main Workbench 7.0

Número de accesión	Bacteria	Valor E	Score	% identidad
NR_075041	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1 16 S ribosomal RNA, complete sequence	0,00	1.384,00	100,00
NR_029133	Lactobacillus pentosus 124-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.368,00	100,00
NR_113338	Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.364,00	99,85
NR_115605	Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.360,00	99,71
NR_025447	Lactobacillus paraplantarum strain DSM 10667 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.356,00	99,56
NR_104573	Lactobacillus plantarum strain CIP 10315116S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.354,00	100,00
NR_042394	Lactobacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.354,00	100,00
NR_117813	Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.338,00	99,85
NR_042676	Lactobacillus fabifermentans strain LMG 2428416S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.336,00	98,70
NR_042254	Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis strain DKO 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.334,00	98,83
NR_113339	Lactobacillus fabfermentans strain DSM 2111516S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.322,00	98,68
NR_112690	Lactobacillus plantarum strain NBRC 1589116S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.288,00	99,85
NR_109000	Lactobacillus xiangfangensis strain 3.1.116S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.264,00	99,22
NR_125561	Lactobacillus mudanjiangensis strain 11050 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.170,00	96,32
NR_114388	Lactobacillus silagei strain IWT 12616S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.144,00	93,60
NR_112645	Lactobacillus similis strain JCM 2765 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.142,00	93,38
NR_116854	Lactobacillus koreensis strain DCY 50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.138,00	93,33

84 Evaluación de la actividad fungistática in vitro de BAL contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw)

NR_042243	Lactobacillus hammesii strain TMW 1.1236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.114,00	92,39
NR_042194	Lactobacillus tucetii strain CECT 5920 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.110,00	92,00
NR_116411	Lactobacillus kimchicus strain DCY51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.102,00	92,21
NR_075024	Lactobacillus brevis ATCC 367 strain ATCC 367 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.100,00	91,95
NR_114251	Lactobacillus senmaizukei strain NBRC 103853 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.100,00	92,30
NR_041659	Lactobacillus rapi strain YIT 11204 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.100,00	91,87
NR_113290	Lactobacillus senioris strain YIT 12364 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.096,00	91,87
NR_044704	Lactobacillus brevis strain ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.096,00	91,81
NR_042456	Lactobacillus parabrevis strain LMG 11984 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1.088,00	92,01
NR_042438	Lactobacillus graminis strain G90 (1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.088,00	91,55
NR_113289	Lactobacillus saniviri strain YIT 12363 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1.086,00	91,70

9. Conclusiones y perspectivas

9.1 Conclusiones

Se confirmó que bacterias ácido lácticas aisladas de cultivos de pitahaya amarilla tiene actividad fungistática contra hongos productores de enfermedades en dicho cultivo, como es el caso de pudrición basal de pitahaya amarilla.

BAL aisladas de un nicho vegetal (cultivos de pitahaya amarilla) presentaron mayor actividad fungistática que una BAL aislada de nicho animal (líquido ruminal bovino), esto confirma que BAL aisladas del mismo nicho dónde se produce una enfermedad, pueden estar tratando de cumplir un efecto antagónico contra los patógenos.

Se demostró que la bacteria ácido láctica aislada de líquido ruminal bovino, identificada bioquímicamente como *W. confusa* y reportada en previos estudios con potencial en patógenos causantes de mastitis bovino, también posee espectro de actividad fungistática contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla. Para nuestro conocimiento, esta investigación es la primera que reporta estos resultados.

Podemos afirmar que las sustancias de fermentación de *W. confusa*, fermentado y biomasa respectivamente, poseen actividad antagónica contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal; notablemente más altas que el sobrenadante, lo que indica que el compuesto antagónico causante de la actividad fungistática podrían ser metabolitos de alto peso molecular que se encuentran asociadas a la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria.

Demostramos que las sustancias de la BAL G, fermentado, sobrenadante y biomasa poseen actividad fungistática contra los hongos en estudio; lo que indica que el

compuesto antagónico causante de la actividad fungistática podrían ser metabolitos de alto y bajo peso molecular, los cuales podrían encontrarse asociados a la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria. Sin embargo dado a los resultados obtenidos en la hora 4 de fermentación podría también tratarse de otros metabolitos que estarían asociados a la fase exponencial.

Las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato, ácido láctico, ácido acético, y concentración celular ayudan a correlacionar algunos comportamientos presentados en la cinética de actividad fungistática, sin embargo no explican completamente dicha variable, debido a que está relacionada con diversos factores (pH, temperatura, tiempo de incubación, nutrientes, etc) que son complejos de explicar. Por lo que es necesario realizar otras investigaciones sobre la naturaleza de los compuestos antifúngicos producidos durante la fermentación, mecanismo de acción y sinergismo entre ellos; los cuales podrían proporcionar más información detallada.

Los análisis de microscopia SEM corroboran los resultados obtenidos en cajas de Petri de las BALs *W. confusa* y G contra *Fusarium* 54 y 17, demostrando que tanto los metabolitos como la biomasa de las bacterias ácido lácticas inducen a la formación de porosidades en las hifas de *Fusarium* F54 y F17, lo cual ocasiona la interrupción del transporte de aminoácidos y causa la liberación del material celular, lo cual se ve reflejado en el porcentaje de reducción del crecimiento de ambos hongos.

Se demostró que la BAL identificada bioquímicamente como *W. confusa*, en análisis moleculares se identificó como *W. cibaria*; y la BAL G mostró un porcentaje de identidad de 100 % con *Lb. plantarum* y 100 % *Lb. pentosus*. Por ello, se debe secuenciar un fragmento mayor del gen ribosomal 16S para confirmar su identidad o secuenciar otros genes que permitan distinguir entre *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*.

9.2 Perspectivas

Secuenciar otros genes que permitan distinguir entre *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus* y *W. confusa* y *W. cibaria*.

Es recomendable realizar otros estudios con las BAL E (la única BAL aislada de fruta sana de planta afectada) y F, para conocer su potencial de control fungistático de las sustancias de fermentación.

Se recomienda realizar un estudio a profundidad del efecto del ácido láctico y acético a diferentes concentraciones sobre la actividad antifungal de la BAL para conocer con certeza el efecto inhibitorio de estos metabolitos. Otras investigaciones son necesarias para determinar la existencia del mecanismo Quórum Sensing en *W. confusa* y la BAL G.

Es necesario realizar otras investigaciones sobre la naturaleza de otros compuestos fungistáticos producidos durante la fermentación de *W. confusa* y G, que proporcionen información detallada que explique la actividad fungistática de estas bacterias

Bibliografía

Ahmadova A, Todorov SD, Hadji-Sfaxi I, Choiset Y, Rabesona H, Messaoudi S, Kuliyevev A, De Melo Franco BDG, Chobert JM, Haertlé T. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*. 20, 2013, 42-49.

Alonso S, Herrero M, Rendueles M, Díaz M. Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. *Process Biochemistry*. 49, 2014, 732–739.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed., Arlington, Virginia, USA. 1990.

USDA United States Department of agriculture. Animal and plant health inspection service-APHIS. 2012.

Arasu MV, Kim DH, Kim PI, Jung MW, Ilavenil S, Jane M, Lee KD, Al-Dhabi NA, Choi KC. In vitro antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf. *Annals of Microbiology*. 64, 2014, 1333–1346.

Axelsson L In: Salminen S, von Wright A (eds) *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York. 1998.

Baek E, Kim H, Choi H, Yoon S, Kim J. Antifungal Activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in Rice Cakes. *The Journal of Microbiology*. 50, 2012, 842–848.

Barras F, Gijsegem FV, Chatterjee AK. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*. 32, 1994, 201–34.

Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*. 187, 2007, 117–126.

Bateman GL, Murray G. Seasonal variation in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Applied Soil Ecology*. 18, 2001, 117–128.

Batish VK, Roy U, Lal R, Grover S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17, 1997, 2009–2225.

Belguesmia Y, Rabesona H, Mounier J, Pawtowsky A, Le Blay G, Barbier G, Haertlé T, Chobert JM. Characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellan–xanthan beads during batch fermentation, *Food Control*. 36, 2014, 205-211.

Bhugaloo-Vial P, Grajek W, Dousset X, Boyaval P. Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*. 21, 1997, 450-457.

Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM. Studies on in vitro growth and pathogenicity of *Fusarium fungi*. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 2003, 577–587.

Castro JA, Baquero LE, Narváez CE. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase from pitahaya amarilla fruits (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*. 35, 2006, 91-100.

Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 1999, 131–149.

Cheong EYL, Sandhu A, Jayabalan J, Le TTK, Nhiep NT, Ho HTM, Zwielehner J, Bansal N, Turner MS. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common

cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*. 2014, 46, 91-97.

Cho J, Lee D, Yang C, Jeon J, Kim J, Han H. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters*. 257 (2006) 262–267.

Chung TC, Axelsson L, Lindgren SE, Dobrogosz WJ. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2, 1989, 137-144.

Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7, 2001, 281–305.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 7, 2002, 210–216.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asociación de productores y comercializadores de pitaya - Asoppitaya, Ingeniero Agrónomos Asociados Ltda - Frutales de la Cabaña. 2013. Manual Técnico Tecnología para el manejo de pitaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia. Colombia, Palmira, Valle del Cauca. ISBN: 978-958-740-147-9.

Corsetti A, Gobetti M, Rossi J, Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 1998, 253–256.

Corsetti A, Settanni L. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*. 40, 2007, 539–558.

Cowan, ST, Steel, KJ. Manual for the identification of medical bacteria, Editorial: Cambridge : Cambridge University Press, 1974 (rep.1979).

Crowley S, Mahony J, van Sinderen D. Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiologica* (Praha). 58, 2013, 291-299.

Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria –Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*. 21, 2010, 370–380.

Dane-Proexport, 2010. Exportaciones Colombianas 0810904000 Pitahayas Frescas. Consultado en la web en: http://www.Proexport.com.co/SIICExterno/Intel/Export/Producto/Exportaciones.aspx?seleccion=Exportaciones_Colombianas&Tipo=Bienes&Menu=Intel/ExportProductos.

Delavenne E, Ismail R, Pawtowski A, Mounier J, Barbier G, Le Blay G. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*. 30, 2012, 206-213.

De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23, 1960, 130-135.

Demain AL. Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology*. 1, 1998, 259-264.

D'Mello JPF., Macdonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 69, 1997, 155–166.

D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. *Fusarium* mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*. 80, 1999, 183–205.

Desjardins AE, Plattner DR, Nelson PE. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 1994, 1695-1697.

De Vuyst L, Vancanneyt M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 24, 2007, 120–127.

Diep DB, Havarstein LS, Nes IF. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178, 1996, 4472–4483.

Diep DB, Axelsson L, Grefslí C, Nes IF. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology*. 146, 2000, 2155–2160.

Dimkić I, Zivković S., Berić T., Ivanović Z., Gavrilović V., Stanković S, Fira D. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*. 65, 2013, 312–321.

Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 2003, 755–768.

Dodd JC. et al. 1992. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. In *Colletotrichum-Biology, Pathology and Control* (Bailey, J.A. and Jeger, M.J., eds), pp. 326–336, CAB International.

Dogi CA, Fochesato A, Armando R, Pribull B, De Souza MMS, Da Silva Coelho I, Araujo de Melo D, Dalceró A, Cavaglieri L. Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*. 114, 2013, 1650–1660.

Effat BA, Ibrahim GA, Tawfik NF, Sharaf OM. Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*. 29, 2001, 251–262.

El-Mabrok ASW, Hassan Z, Mokhtar AM, Hussin KM. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* LAB-C5 and LAB-G7 isolated from Malaysian Fruits. *Acta Biologica Malaysiana*. 2, 2013, 22-30.

Elsanhoty RM. Screening of some *lactobacillus* strains for their antifungal activities against aflatoxin producing aspergilli in vitro and maize. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 6, 2008, 35–40.

El-Ziney M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria metabolites: The role of lactic acid enterocin 5701 and reuterin. Ph.D. Thesis, University of Gent, pp. 3– 23.1998.

Espinal CF, Martínez HJ, Peña Y. 2005. La cadena de los frutales de exportación en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. En: Observatorio Agrocadenas Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Documento de Trabajo N°67.

Fei WC, Wang, YM. 2004. Plant protection manual. Taiwan Agriculture Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Press.

Franco TS, Garcia S, Hirooka EY, Ono YS, Dos Santos JS. 2011. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *Journal of Applied Microbiology*. 111:739-748.

Gagiu Valeria, Israel-Roming Florentina, Belc Nastasia, Dima Romulus. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* strains and calcium propionate on spoilage fungi. *Romanian Biotechnological Letters*. 18, 2013, 8214-8220.

Ghraiiri T, Chaftar N, Hani K. Bacteriocins: Recent advances and opportunities Progress in Food and Preservation. 1, 2012, 485–511.

Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120, 2007, 51–70.

Gao L, Yang H, Wang X, Huang Z, Ishii M, Igarashi Y, Cui Z. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 99, 2008, 2742–2748.

Gobernación de Boyacá 2009. Evaluaciones Agropecuarias Municipales. Boletín N° 19. 137 p.

Gómez C, Dueñas J, Garzón MC, Medina J, Moreno Z, Perdomo C, Pizarro J, Villarreal A. 2004. Pitahaya Amarilla. Informe Inteligencia de Mercados. Perfil de Producto # 33, Corporación Colombina Internacional. www.cci.org.co (Cons. 18/02/2009).

González P. 2003. Enfermedades del tomate. Marchitamiento vascular del tomate (en línea). Facultad de agronomía / Unidad de Fitopatología. Montevideo. Uruguay. Consultado 10 agosto 2003. Disponible en http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/fusarium_tom.html.

Gourama H, Bullerman LB. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*. 58, 1995, 1249–1256.

Gourama H. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*. 30, 1997, 279–283.

Gourama H, Bullerman LB. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus caseipseudopantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. 34, 1997, 131–143.

Guo J, Mauch A, Galle S, Murphy P, Arendt EK, Coffey A. Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiology*. 111, 2011, 474-483.

Gupta R, Srivastava S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology*. 42, 2014, 1-7.

Hassan YI, y Bullerman LB. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*. 121, 2008, 112–115.

Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLoS Pathogens*. 4, 2008, 1-6.

ICA. 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer. Medidas para la temporada invernal. Produmedios. Bogotá, D.C. Colombia.

Janisiewicz W, Tworowski T, Sharer C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*. 90, 2000, 1196-1200.

Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*. 444, 2006, 323–329.

Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49, 1983, 202–224.

Kleerebezem M. Quorum sensing control of antibiotic production; nisin and subtilin auto regulate their own biosynthesis. *Peptides*. 25, 2004, 1405-1414.

Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, de Vos WM. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64, 1998, 15-21.

Laitila A, Alakomi HL, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Haikara A. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 2002, 566–576.

Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2000, 4084–4090.

Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2003, 634-640.

Le-Bellec F, Vaillant F, Imbert E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A new fruit crop, a market with a future. *Fruits*. 61, 2006, 237-250.

Legan JD. Moulds spoilage of bread: The problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 32, 1993, 33-53.

Legiscomex 2008. Inteligencia de Mercados. Frutas exóticas en Colombia, Colombia p. 14 – 16.

León K, Domingo Mery, Pedreschi F, León J. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*. 39, 2006, 1084–1091.

Leroy F, De Vuyst L. Temperature and pH conditions that prevail during the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1999, 974–981.

Leroy F, De Vuyst L. Bacteriocin-producing strains in a meat environment; in Barredo Fuente JL (eds): *Methods in Biotechnology–Microbial Products and Biotransformations*. Totowa, Humana Press, pp 369–380. 2005.

Leslie JF. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 392, 1996, 153–164.

Lindgren S, Dobrogosz W. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Review*. 87, 1990, 149–163.

Loaiza-Castillo NB. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Weissella confusae* y sus metabolitos frente a *Klebsiella pneumoniae*. Trabajo de Grado dirigido por Liliana

Serna Cock. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, 2011.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock-Biología de los microorganismos. Prentice Hall, 10ª Edición. Upper Saddle River, NJ, p. 400. 2004.

MADR. 2006. Apuesta exportadora agropecuaria, 2006-2020. Bogotá, Colombia. 119p.

Magnusson J, Schnürer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology. 67, 2001, 1-5.

Magnusson J. Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 2003.

Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 219, 2003, 129–135.

Maldonado A, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of grampositive bacteria. Archives of Microbiology. 181, 2004, 8–16.

Maldonado A, Jiménez-Díaz R, Ruiz-Barba JL. Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism. Journal of Bacteriology. 186, 2004, 1556–1564.

Mandal V, Sen SK, Mandal NC. Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound(s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. Natural Product Communications. 2, 2007, 671–674.

Mandal V, Sen SK, Mandal NC. Production and partial characterisation of an inducer-dependent novel antifungal compound(s) by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93, 2013, 2445-2453.

Majhenič AČ, Venema K, Allison GE, Matijašić BB, Rogelj I, Klaenhammer TR. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. Applied Microbiology and Biotechnology. 63, 2004, 705–714.

Martinez FAC, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, Oliveira RPS. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review Biotechnology Advances, 31, 2013, 482–488

Martins ML, Martins HM. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. Food Chemistry. 79, 2002, 315–318.

Mateo JJ, Mateo R, Jiménez M. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. International Journal of Food Microbiology. 72, 2002, 115–123.

Mauch A, Dal Bello F, Coffey A, Arendt EK. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. International Journal of Food Microbiology. 141, 2010, 116-121.

Messi P, Bondi M, Sabia C, Battini R, Manicardi G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. International Journal of Food Microbiology. 64, 2001, 193–198.

Miedaner T. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. Plant Breeding. 116, 1997, 201–220.

Millar GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 1959, 426-429.

Ministerio de Fomento Industria y Comercio. Secretaría Técnica de la Comisión Nacional de Promoción de Exportaciones. Proyecto de Fortalecimiento de la Gestión de Comercio Exterior. Nicaragua. 2006.

Mizrahi Y, Nerd A. Cacti as crops. *Horticultural Reviews*. 18, 1997, 291-320.

Mohd Adnan AF, TanIKP. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potencial. *Bioresource Technology*. 98, 2007, 1380–1385.

Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, VandermotenS, Phonart P. Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *Journal of Food Science*. 76, 2011, 305–311.

Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, HoloH.. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70, 1996, 113-128.

Nerd A, Sitrit Y, Kaushik RA, Mizrahi Y. High summer temperatures inhibit lowering in vine pitahaya crops (*Hylocereus* spp). *Scientia Horticulturae*. 96, 2002, 343-350.

Niku-Paavola ML, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A. New types of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 1999, 29–35.

NIMF. 2002. Normas Internacionales Para Medidas Fitosanitarias NIMF 14. FAO.

ICONTEC. 1996. NTC 3554 - Frutas frescas: pitaya. Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Bogotá, Colombia.

Okereke, A., Montville, T.J., 1992. Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2463–2467.

Okkers DJ, Dicks LMT, Silvester M, Joubert JJ, Odendaal HJ. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin- like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology.* 87, 1999, 726-734.

Oranusi S, Braide W, Oguoma OI. Antifungal properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Ricinus communis*, *Pentaclethra macrophylla* and Yoghurts. *Global Advanced Research Journal of Food Science and Technology.* 2, 2013, 001-006.

Ortiz X, Acevedo X, Martínez H. Características y estructuras de los frutales de exportación en Colombia. Observatorio Agrocadenas Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. 2002.

Oude Elferink SJWH, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67, 2001, 125–132.

Pal A., Ramana K. Isolation and preliminary characterization of a nonbacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*). *Process Biochemistry.* 44, 2009, 499–503.

Palles T, Beresford T, Condon S, Cogan TM. Citratemetabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology.* 85, 1998, 147–154

Parada JL, Caron C, Bianchi P, Medeiros A, Socol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 50, 2007, 521- 542.

Parry DW, Jenkinson P, McLeod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals – a review. *Plant Pathology.* 44, 1995, 207-238.

Pascual L, Daniele M, Ruiz F, Gribaudo L, Pájaro C, Barberis L. Interaction between bacteriocins from lactobacilli on pathogens strains. Rev. Hig. Aliment. 21, 2007a, 552-553.

Pascual L, Daniele M, Ruiz F, Pájaro C, Barberis L. Spectrum of activity of bacteriocin *Lactobacillus fermentum* L15 on several strains. Rev. Hig. Aliment. 21, 2007b.

Patel A, Falck P, Shah N, Immerzeel P, Adlercreutz P, Ståhlbrand H, Prajapati JB, Holst O, Nordberg Karlsson E. Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. FEMS Microbiology Letters. 346, 2013, 20-28.

Prema P, Smila D, Palavesam A, Immanuel G. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. Food and Bioprocess Technology. 3, 2010, 379–386.

Pineda ME, De Prager M, Pena A, Escarria L, Gallo P, Ramos F, Molina O, Martínez L, Escobar F. Guías para el Laboratorio, Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, segunda edición. 2008.

Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Animal Feed Science and Technology. 78, 1999, 21–37.

Profiagro. 2007. Estudio de factibilidad pitahaya. Programa Fitosanitario para el AGRO, para la mitigación de barreras técnicas de acceso al mercado de EEUU. Quito.

Quintero DR. Ing. Agrónomo., M.Sc. Edafólogo. Fertilización nitrogenada en caña de azúcar. Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña, 1997.p11-13.

Rathore S, Salmerón I, Pandiella SS. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*. 30, 2012, 239-244.

Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Van Sinderen D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 2008, 915-923.

Rubiano-Duque LF. Acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Escherichia coli*. Trabajo de Grado dirigido por Liliana Serna Cock. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, 2011.

Ruiz FO, Gerbaldo G, Asurmendi P, Pascual LM, Giordano W, Barberis IL. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr. Microbiol.* 59, 2009, 497-501.

Ryan LAM, Dal Bello F, Arendt EK. The use of sourdough fermented by antifungal LABs to reduce the amount of calcium propionate in breads. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 2008, 274–278.

Ryan LAM, Dal Bello F, Czerny M, Koehler P, Arendt EK. Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 2009, 1060–1064.

Ryan LAM, Zannini E, Dal Bello F, Pawlowska A, Koehler P, Arendt EK. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Int J Food Microbiology* 146, 2011, 276–283.

Salmerón I, Thomas K, Pandiella S. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 55, 2014, 240-247.

Sangmanee P, Hongpattarakere T. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*. 40, 2014, 224-233.

Sathe SJ, Nawani NN, Dhakephalkar PK, Kapadnis BP. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 2007, 2622-2628.

Schillinger U, Geisen R, Holzapfel WH. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 1996, 58–64

Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*. 16, 2005, 70–78.

Schütz H, Radler F. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1, 3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology*. 5, 1984, 169-178.

Serna Cock L, Valencia Hernández LJ, Campos Gaona R. Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of *Weissella confusa* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*. 55, 2010, 55-65.

Serna-Cock L, Valencia-Hernández LJ, Gómez-Lopez ED, López-López K. Effect of Plating Procedures on the Fungistatic Properties of *Weissella confusa*. *Manuscrito en preparación*.

Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnürer J, Kenne L. Antifungal 3- hydroxyl fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB14. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2003, 7554–7557.

Soler JJ, Martín-Vivaldi M, Ruiz-Rodríguez M, Valdivia E, Martín-Platero AM, Martínez-Bueno M, Peralta-Sánchez JM, Méndez M. Symbiotic association between hoopes and antibioticproducing bacteria that live in their uropygial gland. *Functional Ecology*. 2008, 22, 864–871.

Spicher G. Baked goods. In G. Reed (Ed.), *Biotechnology. Foodand feed productions with microorganisms*, vol. 5 (pp. 1–80). Weinheim, Germany: Verlag Chemie. 1983.

Spicher G. Die erreger der Schimmelbildung bei backwaren. 1. Mitt: die aufverpackten schnittbrotten auftretenden schimmelpilze. *Getreide Mehl Brot*. 38, 77–80. 1984.

Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 2002, 4322-4327.

Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Lebos AP, Habjanic K. Antimicrobial Activity - The Most Important Propertyof Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria.Food Technology and Biotechnology*. 48, 2010, 296–307.

Sutton JC. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 4, 1982, 195–209.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *American Society for Microbiology*. 40, 1976, 722-756.

Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32, 1988, 1854-1858.

Tang H, Ren J, Yuan J, Zang B, Wei H. An in vitro assessment of inhibitory effect of 16 strains of probiotics on the germination of *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*. 4, 2010, 1251-1256.

Tafur R, Toro J, Perfetti J, Ruiz D, Morales J. Plan Frutícola Nacional (PFN). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola Asohofrucol, SAG. 43 p.2006.

Tekauz A, McCallum B, Gilbert J. Review: *Fusarium* head blight of barley in western Canada. Canadian Journal of Plant Pathology. 22, 2000, 9–16.

Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 112, 2006, 230–235.

Toruño G. 1999. Control de *Fusarium oxysporum* en semilleros de repollo en la localidad de Mirafior, Estelí, Nicaragua, mediante el uso de solarización y enclamiento como tratamientos alternativos al uso de agroquímicos. Tesis, Zamorano, Honduras. 35p.

Tropcheva R, Nikolova D, Evstatieva Y, Danova S. Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product “katak”. Anaerobe. 28, 2014, 78-84.

Trias R, Bañeras L, Montesinos E, Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. International Microbiology, 2008, 11, 231-236.

Uzair B, Ahmed N, Mohammad V, Ahmad UV. Detection, Isolation and partial characterization of antifungal compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* CMG1055. Journal of the Chemical Society of Pakistan. 30, 2008, 649-653.

Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, De Candia S, Lavermicocca P. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. Systematic and Applied Microbiology. 32, 2009, 438-448.

Van Hylckama, Vlieg JE, Hugenholtz J. Review Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal*. 17, 2007, 1290–1297.

Varón F. 2004. Manejo integrado de las enfermedades de la pitahaya. En memorias: Taller y gira técnica sobre el cultivo de la pitaya amarilla. Comité Hortofrutícola del Valle del Cauca. *Asohofrucol*, 19-26.

Varón F. Enfermedades de la pitahaya y su manejo. *Revista Asiava*. 73, 2006, 19-21.

Velluti A, Marín S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V. The effect of fungal competition on colonisation of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology*. 59, 2000, 59–66.

Venturini ME, Blanco D, Oria R. In vitro antifungal activity of several compounds against *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*. 65, 2002, 934–939.

Verluyten J, Messens W, De Vuyst L. Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 2004, 2271–2278.

Vermeulen N, Ganzle MG y Vogel RF. Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 2006, 3832–3839.

Voulgari K, Hatzikamari M, Delepoglou A, Georgakopoulos P, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control* 21, 2010, 136–142.

Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. In *The Firmicutes*. 3, 2011.

Vigier B, Reid LM, Seifert KA, Stewart DW, Hamilton RI. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 19, 1997, 60–65.

Wang H, Yan H. Activity against plant pathogenic fungi of *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 isolated from Xinjiang koumiss in China. *Annals of Microbiology*. 61, 2011, 879–885.

Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE* 7, 2012, e29452, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029452>.

Wright ER, Rivera MC, Ghirlanda A. Basal rot of *Hylocereus undatus* caused by *Fusarium oxysporum* in Buenos Aires, Argentina. *Plant Dis*. 91, 2007, 323.

Yang EJ, Chang HC. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*. 139, 2010, 56–63.

Zhang Y, Liu Y, Bao Y, Zhang HP. Influence of pH, Heat and Enzymatic Treatments on the Activity of Antibacterial Substance in MRS and Milk Media Produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Sciences in China*. 9, 2010, 911-920.

Zhang C, Brandt MJ, Schwab C, Ganzle MG. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology*. 27, 2010a, 390–395.

Zhang X, Liu G, Zhao B, Li P. New insight into the regulation of class II bacteriocin production by quorum sensing in *Lactobacillus pentosus* 31-1. *African Journal of Microbiology Research*. 6, 2012b, 3582-3588.

Zalán Z, Hudáček J, Stetina J, Chumchalova J, Halász A. Production of organic acids by Lactobacillus strains in three different media. European Food Research and Technology. 230, 2010, 395–404.