

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4D09 Biorrefinerías avanzadas

Análisis en bacterias y levaduras sobre su capacidad biocontroladora

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Licenciatura en ingeniería en biotecnología. Marisol Domínguez Alcayde

Licenciatura en ingeniería en biotecnología. Luis Alberto Caballero Tirado

Profesores PAP: Luis Eduardo Segura García y Alejandro Arana Sánchez

Tlaquepaque, Jalisco, a 7 de Mayo de 2022

ÍNDICE

Contenido

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional.....	2
Resumen.....	5
Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	5
Entendimiento del ámbito y del contexto.....	5
Caracterización de la organización o comunidad.....	7
Identificación de la(s) problemática(s).....	9
Planeación de alternativa(s).....	9
Desarrollo de la propuesta de mejora.....	10
Valoración de productos, resultados e impactos.....	13
Bibliografía y otros recursos.....	18
Productos.....	19
Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	19
Sensibilización ante las realidades.....	20

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

En caso de requerirse alguna adecuación al nombre de las fases propuestas para este componente, se puede realizar siempre y cuando sea complementario a lo ya establecido.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación de la actividad de Biocontrol, incluyendo la concentración mínima inhibitoria, de 8 cepas distintas, 4 bacterias y 4 levaduras, sobre 3 hongos fitopatógenos: *Fusarium sp.*, *Penicilium sp.* y *Alternaria sp.*, además de la evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno e hidrólisis de fosfatos de las 8 cepas y su capacidad de hidrólisis de quitina. Se observaron 17 instancias distintas donde alguna de las 8 cepas presento actividad de Biocontrol sobre alguno de los 3 hongos, dónde se observó que todas las cepas mostraron capacidad de inhibir a *Alternaria sp.*, 5 a *Penicilium sp.*, y 4 a *Fusarium sp.* Además, se observaron 6 instancias de cepas presentando la capacidad de hidrolizar fosfatos, alcanzado halos desde 0.04 hasta 0.15 cm en placas Petri, según la cepa que fuera evaluada.

No se observó en ninguna de las cepas la capacidad de fijar nitrógeno ni de hidrolizar quitina, aunque esto último podría deberse a errores de metodología y no a la capacidad de las cepas.

Las concentraciones mínimas de cepa para observar la inhibición variaron dependiendo de la cepa; la menor observada en las pruebas en sólido fue $5.00E+04$ UFC/mL en el caso de la inhibición de *Alternaria sp.* por *Bacillus amyloliquefaciens*, mientras que en líquido se observó una inhibición de *Fusarium sp.* por *Enterobacter bugandensis* a una concentración mínima de $2.73E+03$ UFC/mL.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

En el mundo moderno, donde la demanda alimentaria esta en aumento y se espera que se llegue a necesitar un incremento de hasta el 110% a la producción agrícola, la búsqueda de técnicas, alternativas y métodos para la mejora de la capacidad de

producción de alimentos es fundamental para asegurar el desarrollo sostenible y condiciones adecuadas para la creciente población humana (Raymaekers, 2020).

Uno de los factores que tienen un mayor impacto en la capacidad de producción agrícola son las plagas, las cuáles se estiman que causan entre el 20 a 40% de la pérdida total de alimentos en la industria agrícola. Desde el año 2000, se ha observado un incremento dramático en la cantidad y severidad de infecciones fúngicas en campo, las cuales han desarrollado mayor virulencia por la práctica del monocultivo y resistencia a fungicidas químicos tradicionales por su uso en exceso (Syed Ab Rahman, 2018).

El uso de los pesticidas químicos, los cuales ciertamente han permitido obtener los rendimientos agrícolas sin precedentes en la historia, conlleva distintas complicaciones; Su uso constante por décadas ha llevado al desarrollo de patógenos resistentes a ellos, como los hongos resistentes a la estrobilurina y el azole, así como a preocupaciones sobre su impacto ecológico en la tierra que se utiliza y acuíferos cercanos; Además, legislación reciente, como la directiva 91/414/EEC del parlamento europeo ha limitado la introducción de nuevos pesticidas químicos al mercado (Raymaekers, 2020).

La microbiota vegetal ha sido el objetivo de incrementada atención en los últimos años, donde las ciencias ómicas han ayudado a revelar las complejas relaciones simbióticas entre los microorganismos presentes en el tejido vegetal y la planta misma; estas relaciones han traído atención a la importancia y posible aplicación de estas relaciones para su uso en Biocontrol, donde se aprovecha la misma microbiota presente y se incrementa su diversidad para la mejora de la salud y desarrollo de la planta, así como para la prevención y el tratamiento de plagas (Berg, 2017).

La presencia de microorganismos nativos y/o benéficos a la microbiota vegetal han demostrado crear una red en las zonas de la planta donde habitan, donde, por medio de la acción de mecanismos como quorum sensing o la simple competencia por metabolitos secundarios de la planta, evitan o afectan el desarrollo de organismos patógenos, como hongos (Berg, 2017).

En general, existen 4 tipos de mecanismos reconocidos en la acción de los organismos de Biocontrol: El primero es el parasitismo, donde la cepa biocontroladora toma como huésped a un organismo patógeno; el segundo es la secreción de compuestos como enzimas que degradan paredes celulares, así como metabolitos antibióticos como los terpenos; El tercero es la secreción de enzimas que interfieren con la virulencia patogénica, como las pectinasas, mientras que el cuarto es la previamente mencionada competencia por metabolitos y nutrientes (Raymaekers, 2020).

Aún con su enorme potencial como alternativas a pesticidas químicos, los agentes de Biocontrol solo representan menos el 10% del mercado de productos de protección de cultivos (Raymaekers, 2020). Comercialmente, se encuentran en distintas presentaciones, entre las que se encuentran polvos, líquidos y gránulos para su aplicación en rociados, tratamientos de semillas e incorporación en mezcla de tierra, entre otros (Keswani, 2016).

En México existe el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, el cual desarrolla y lleva a cabo estrategias de Biocontrol para plagas, proporcionando tecnologías alternativas a los pesticidas químicos (SENASICA, 2020); Entre 2008 y 2009, fueron tratadas con agentes de Biocontrol en México 557,664 hectáreas de tierra de cultivo, con la mayoría de éstas perteneciendo a la región central del país. En estas campañas se utilizaron 18 agentes de Biocontrol distintos, entre ellos 9 insectos entomófagos, 6 hongos y 2 bacterias (García de León, 2010).

En nuestro país, además de productos recibidos de importación, existe una industria de producción de agentes de Biocontrol; para el año 2010 existían 68 plantas de producción, en su mayoría pequeñas y medianas localizadas en la zona del pacífico norte, utilizando 37 agentes de control biológicos distintos, entre los cuales se encuentran 14 hongos, 6 bacterias, 15 insectos y 2 nemátodos (García de León, 2010).

1.2 Caracterización de la organización o comunidad

La investigación en el ITESO se estructura a través de Programas Formales de

Investigación (PFI). El PFI articula el conjunto de líneas y proyectos de investigación del departamento, así como su relación con las labores educativas y de vinculación de la propia dependencia. Procura, al mismo tiempo, la coordinación con las líneas y proyectos de investigación de otras dependencias de la universidad desde la perspectiva de la interdisciplinariedad.

El Programa Formal de Investigación del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales tiene como objetivo general el desarrollo de conocimiento teórico y práctico para la intelección y solución de problemas en torno al aprovechamiento de los recursos naturales y su impacto sobre el medio ambiente y las comunidades, particularmente en el occidente de México.

Sus líneas de investigación con respectivos objetivos son las siguientes:

1. Energía:

Desarrollar tecnología para el ahorro y uso eficiente de la energía en procesos productivos que se desarrollan en el occidente de México, empleando enfoques que van desde la organización y administración de procesos hasta el desarrollo de prototipos de equipos eficientes y ahorradores de energía.

Desarrollar conocimiento aplicado y tecnología para el aprovechamiento de energías renovables en procesos donde puedan resultar económicas y oportunas y resolver problemas específicos de índole doméstica o productiva, rural o urbana en el occidente de México.

2. Alimentos:

Estudiar productos agropecuarios del occidente de México que potencialmente contengan sustancias bioactivas subutilizadas con el objeto de aprovecharlos integralmente.

Diseñar y desarrollar alimentos funcionales que ayuden a prevenir enfermedades agudas y crónicas empleando microorganismos probióticos y sustancias nutraceuticas.

Desarrollar procesos para el aprovechamiento secundario de materiales que actualmente son residuos de industrias alimentarias con el objeto de producir un mejor rendimiento económico y un menor impacto ambiental.

Estudiar las cadenas de abastecimiento de los productos agropecuarios del occidente de México, desde su origen hasta su consumo final, y proponer alternativas factibles que ayuden a mejorar su rendimiento económico y disminuir su impacto ambiental.

3. Medio ambiente:

Mejorar el conocimiento sobre los servicios de ecosistemas en la región occidente de México y su relación con el bienestar y la salud humana.

Desarrollar y aplicar metodologías que permitan entender, cuantificar y prever cambios ambientales acumulativos resultantes de proyectos (planes o programas)

hídricos, urbanos y energéticos.

Desarrollar conocimiento aplicado, tecnología y herramientas de gestión para evitar, mitigar o compensar cambios en ecosistemas y sus impactos en comunidades vulnerables y generaciones futuras.

La presente investigación se desarrolla bajo el proyecto:

Aislamiento e identificación de microorganismos con potencial para bio-control.

Cuyo titular es el Dr. Alejandro Arana Sánchez y tiene como objetivo general obtener levaduras de procesos fermentativos artesanales y cultivos de la región, cuyos metabolismos estén orientados a la producción de metabolitos con potencial para el bio-control.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

En PAP anteriores del presente proyecto, se identificaron cepas por la técnica de MALDI-TOF a partir de distintas muestras obtenidas en campo como el suelo y lixivado de lombriz y también de bebidas como el tepache; de todas las cepas identificadas, se hizo una revisión de la literatura para identificar aquellas cepas con potencial biocontrolador, para su posterior evaluación.

Cepas extraídas:

Muestras de tepache

Saccharomyces cerevisiae **Ch (3)**

Muestras de suelo

Enterobacter bugandensis **Hb (10)**

Bacillus amyloliquefaciens **Mb (8)**

Lixivado de lombriz

Candida tropicalis **Con (19)**

Klebsiella pneumoniae **CrWLSC (22)**

Candida utilis **Cr WLCC (17)**

Candida krusei **Gr (21)**

Acetobacter indonesiensis **PuM (20)**

1.4. Planeación de alternativa(s)

Durante esta etapa del proyecto se planeó evaluar la actividad de Biocontrol reportada de algunas de las cepas identificadas previamente, enfrentándolas a distintas cepas de hongos causantes de plagas en cultivos (*Alternaria sp*, *Penicillium spp* y *Fasarium sp*).

Además de su capacidad de Biocontrol concluyendo la concentración mínima inhibitoria, se planeó evaluar su capacidad de fijación de nitrógeno, de hidrólisis de fosfatos e hidrólisis de quitina.

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Reactivación inicial de cepas

Para la reactivación de las cepas previamente criopreservadas en PAP anterior, se tomaron los contenidos de los crioviales guardados a -16°C, se pasaron 1h a refrigeración a 4°C y se depositaron en matraces con 75 mL de medio YPD para su incubación a 150 rpm durante 24 h a 35°C.

Las cepas reactivadas fueron sembradas en cajas Petri 60x15, donde se conservaron para su posterior uso.

Resembrado de cepas

Previó a los enfrentamientos con las cepas patógenas, las cepas de Biocontrol fueron resembradas en tubos de ensayo con caldo nutritivo 24 h antes de los enfrentamientos, haciendo distinción con la temperatura de incubación entre las levaduras (30°C) y las bacterias (37°C).

Enfrentamientos

En cajas Petri, se inóculo con una muestra de uno de 3 hongos patógenos en el centro de la caja y con alguna de las cepas con potencial Biocontrol, fuera una de 4 levaduras o 4 bacterias, en una línea vertical en uno de los lados de la caja Petri (Figura 1.); este proceso se hizo con una combinación de Hongo + Cepa Biocontroladora en 3 medios de cultivos distintos, para así tomar en cuenta la posible deficiencia de nutrientes necesarios

para los distintos microorganismos en cada medio de cultivo. Los medios utilizados fueron Agar Nutritivo, YPD y PDA.



Figura 1. Imagen tomada tras 9 días de incubación donde se distingue el crecimiento de la línea de la levadura y el hongo en el centro

Tras haber completado el diseño de experimentos con las 8 cepas (bacterias y levaduras) con posible control de plagas vegetales (hongos) en los respectivos medios de cultivo favorecientes para todas las variedades (bacterias, AN; levaduras, YPD; hongos, PDA) se compararon con un control (hongo) para poder evaluar la capacidad de inhibición de las cepas contra las plagas.

Fijación de nitrógeno

Se prepararon soluciones de sacarosa a 10 g/L, las cuales fueron esterilizadas y se inocularon con sus respectivas cepas (en duplicado), se incubaron por 24h y se prosiguió con la medición del nitrógeno amoniacal.

Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante en otro tubo para desechar la biomasa, se tomó una muestra de sobrenadante de 20 uL, se la añadió 1mL de una solución de coloreado de fenol y agitó en vortex por 5 s, se añadió 1mL de una solución de hipoclorito alcalino y de nuevo agitación en vortex por 5s. Se dejó durante 10 min para reaccionar a temperatura ambiente y se añadieron 8mL de agua destilada y de nuevo se agitó en vortex.

Junto con una curva de calibración de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L de sulfato de amonio se midieron las absorbancias a 630 nm.

Hidrólisis de fosfatos

Se prepararon cajas Petri con medio Pikovskaya, se inocularon con un punto de muestra al centro y se incubaron durante 7 días a las temperaturas correspondientes según bacteria (37°C) o levadura (30°C). Pasado los días se midió el halo traslucido formado alrededor de la muestra.

Hidrólisis de quitina

Se realizó una experimentación basada en el artículo de Howard et al (2003), en donde se mezcla al 8% quitina extraída de camarón en medio LB, en esta ocasión la quitina utilizada fue vegetal y se molió en un mortero hasta conseguir una consistencia polvosa a continuación se mezcló con LB (Figura 2.) y se analizaron las 8 cepas utilizadas.

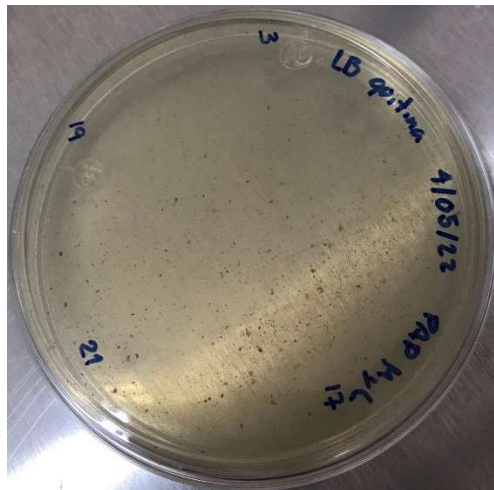


Figura 2. Medio agar LB adicionado con quitina al 8% después de gelificar.

Concentración mínima inhibitoria

Se preparó medio YPD para cada combinación bacteria o levadura y hongo que tuvo respuesta inhibitoria en el enfrentamiento, el medio fue esterilizado y al llegar aproximadamente a los 40°C se adicionó con *Alternaria* a una concentración de 8.25×10^4 esporas/mL, el medio con *Fusarium* con 1.56×10^4 esporas/mL y el de *Penicillium* con 3.22×10^4 esporas/mL (cada caja Petri se sirvió con aproximadamente 20mL).

Se hicieron diluciones hasta 10^{-7} de las bacterias y levaduras pasadas 24h de reactivación para el conteo de la concentración. Se sembraron las cajas Petri con pequeños círculos de papel filtro donde cada uno representa una concentración diferente de la cepa biocontroladora, va de 10 a 50 uL en aumentos de 10uL (Figura 3.) y pasados 5 días se revisaron los resultados.



Figura 3. Ejemplo de distribución de discos papel filtro de 10-50uL

Además, se realizaron diluciones decimales de los cultivos de las 8 cepas, las cuales fueron sembradas en cajas Petri por extensión para el cálculo de las unidades formadoras de colonias presentes.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Enfrentamientos

Se obtuvieron 17 resultados: *Saccharomyces cerevisiae* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Fusarium sp*, *Candida krusei* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Fasarium sp*, *Candida tropicalis* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Penicillium spp*, *Candida utilis* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Fasarium sp*, *Bacillus amyloliquefaciens* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Penicillium spp*, *Enterobacter bugandensis* tiene efecto en los tres hongos, *Acetobacter indonesiensis* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Penicillium spp*, *Klebsiella pneumoniae* tiene efecto en *Alternaria sp* y *Penicillium spp* (Tabla 1). Estos resultados se evaluaron de forma objetiva considerando el tamaño de crecimiento del hongo en el enfrentamiento comparado con el control.

Tabla 1. Actividad de Biocontrol observada en cada cepa.

Cepa	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Penicilium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inhibición		Inhibición
<i>Candida utilis</i>	Inhibición		Inhibición
<i>Candida tropicalis</i>	Inhibición	Inhibición	
<i>Candida Krusei</i>	Inhibición		Inhibición
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Inhibición	Inhibición	
<i>Enterobacter bugandensis</i>	Inhibición	Inhibición	Inhibición
<i>Acetobacter indonesiensis</i>	Inhibición	Inhibición	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inhibición	Inhibición	

En la Figura 4 se muestra a *Bacillus amyloliquefaciens* enfrentándose con *Penicillium spp.*, en las cajas inferiores se encuentran los controles y en las superiores las cajas de enfrentamiento en distinto medio de cultivo (AN, YPD y PDA respectivamente).

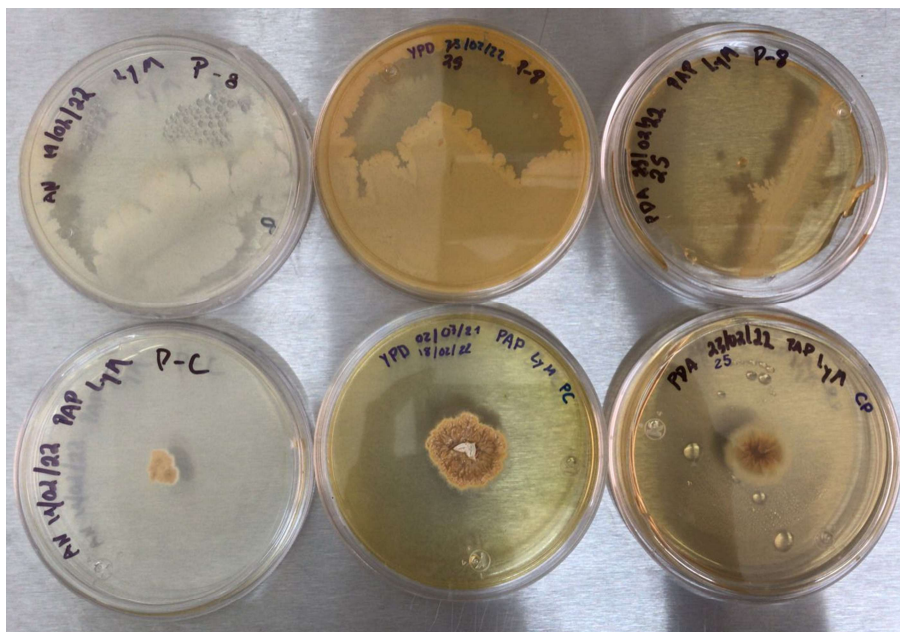


Figura 4. El crecimiento del hongo fue inhibido por la bacteria.

Fijación de Nitrógeno

La fijación de nitrógeno la realizan algunos microorganismos que tiene la capacidad metabólica de tomar el nitrógeno del ambiente (N₂) y lo convierten en ion amonio para su posterior uso en la formación de aminoácidos y demás compuestos nitrogenados que requieren las células. La medición realizada determina la concentración de nitrógeno amoniacal en el medio después de 24 horas de incubación en donde no se logró detectar la presencia del ion amonio en los medios de cultivo, por lo que las cepas no realizan la fijación de nitrógeno.

Hidrólisis de fosfatos

Pasado el tiempo de incubación, se midió el halo de hidrólisis en las cajas (Tabla 2). Los resultados muestran que la gran mayoría de las cepas tienen, en distintas medidas, capacidad de hidrolizar fosfatos, lo cual indica que podrían ayudar al desarrollo de la planta además de controlar plagas.

Tabla 2. Resultados obtenidos de la medición de halo en las cepas.

Cepa	Nombre	Halo [cm]
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.07
17	<i>Candida utilis</i>	0.15
19	<i>Candida tropicalis</i>	0
21	<i>Candida krusei</i>	0.07
8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0
10	<i>Enterobacter bugandensis</i>	0.05
20	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	0.08
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.04

Los halos de hidrólisis fueron medidos de donde “termina” la zona de crecimiento de la cepa siendo evaluada a donde termina la zona particularmente clara alrededor de la misma (Fig. 5).

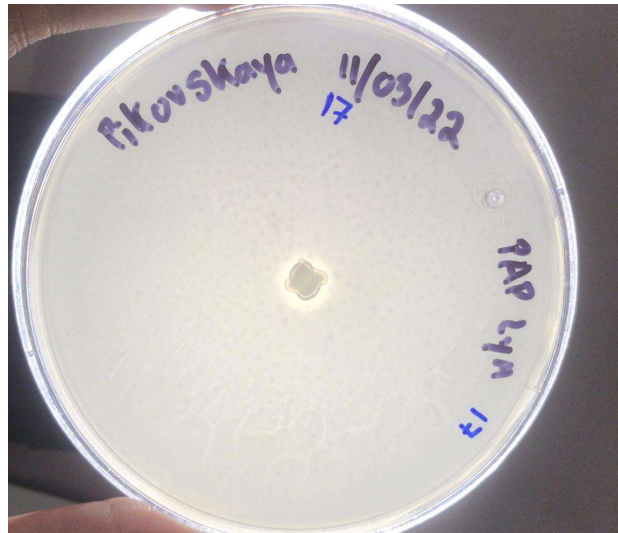


Figura 5. *Candida utilis* en medio Pikovskaya tras 7 días a 30°C

Hidrólisis de quitina

Los resultados indican que ninguna de las cepas cuenta con enzimas quitinasas para hidrolizar la quitina, pero no se descarta la opción de considerar usar quitina vegetal y otro método de mezcla en el medio para una mejor conclusión.

Concentración mínima inhibitoria

Pasados los 5 días, se observó el crecimiento en las cajas Petri, tomando las zonas donde no hubiera desarrollo del hongo y de menor volumen de bacteria o levadura en su placa como las que contaban con la concentración mínima inhibitoria (Fig. 6).

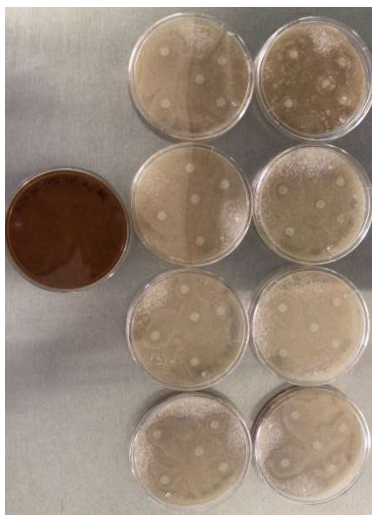


Figura 6. Evaluación de concentración mínima inhibitoria de *Alternaria sp.* tras 5 días.

Con estos volúmenes y los resultados obtenidos en las extensiones en placa de diluciones decimales de las cepas de Biocontrol, se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias

para cada instancia donde se encontró una inhibición (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos para concentración mínima inhibitoria en sólido.

Hongo	Cepa	Concentración mínima inhibitoria [UFC/mL]	
<i>Alternaria</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mayor a	3.25E+07
	<i>Candida krusei</i>	Mayor a	4.33E+07
	<i>Candida tropicalis</i>	Mayor a	4.50E+07
	<i>Candida utilis</i>	Mayor a	3.40E+07
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Mayor a	5.00E+04
	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Mayor a	7.75E+06
	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	Mayor a	2.40E+07
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mayor a	1.43E+07
<i>Fusarium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mayor a	3.25E+07
	<i>Candida krusei</i>	Mayor a	4.33E+07
	<i>Candida utilis</i>	Mayor a	3.40E+07
	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Menor a	1.55E+06
<i>Penicillium</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Menor a	7.05E+06
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Menor a	1.00E+04
	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Menor a	1.55E+06
	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	Menor a	4.80E+06
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Menor a	2.85E+06

Se realizó la prueba de concentración mínima inhibitoria ahora en líquido únicamente para *Enterobacter bugandensis* y *Fusarium*, para ello se prepararon 8 tubos de 3mL con medio Mueller-Hinton y se realizaron 8 diluciones de la bacteria hasta llegar a la concentración de 2.37×10^3 UFC/mL, y se añadió a cada tubo 2mL de esporas de *Fusarium* a una concentración de 4.4×10^3 esporas/mL. Tras 24h de incubación se sembraron 100uL de cada tubo en una caja Petri de Agar Nutritivo para revisar los resultados pasadas otras 24h, en los resultados se obtuvieron que la concentración de 2.37×10^3 UFC/mL se puede inhibir el crecimiento total de *Fusarium* a una concentración de 4.4×10^3 esporas/mL (Fig. 6.).



Figura 6. Dilución 10^{-5} de *Enterobacter bugandensis* inoculado con *Fusarium* en AN durante 24 h (no se aprecia crecimiento de hongo).

Se espera que los resultados obtenidos puedan ser de ayuda para las comunidades agrícolas de bayas, donde la aplicación de alguna de las cepas biocontroladoras funciones como método fungicida y sea un método más barato que además perdure. Considerando que algunas de las cepas fueron extraídas de bebidas fermentadas consumidas por la población se espera que no genere ningún daño en la microbiota intestinal humana al ingerir los alimentos que las plantas generen y estén impregnadas de dichas bacterias o levaduras en su defecto. Todavía deben trabajarse estos resultados ya que el proceso de continuación consta de enfrentamientos en simbiosis y de pruebas directas en plantas, corroborando los datos de nivel laboratorio a condiciones ambientales.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- Berg, G., Koberl, M., et al. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 1-9. 07/05/2022, De Silverchair Base de datos.
- García de León, S. & Mier, T. (2010). Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades rurales producción y medio ambiente*, 10, 38-61. 07/05/2022, De UNAM Base de datos.
- Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M., & Hutcheson, S. W. (2003). *Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 627-635. doi:10.1007/s10295-003-0096-3
- Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Formulation Technology of Biocontrol Agents: Present Status and Future Prospects. *Bioformulations: For Sustainable Agriculture*, 35-52. doi:10.1007/978-81-322-2779-3_2
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020). Screening for

- novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control*, 144, 104240. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104240
- SENASICA. (2020). Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. 07/05/2022, de Gobierno de México Sitio web: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111. doi:10.1016/j.plantsci.2017.11.012

2. Productos

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	4D09 Biorrefinerías avanzadas
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Análisis en batecrias y levaduras sobre suu capacidad biocontroladora
Nombre del producto:	Reporte
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Es un documento donde se describen los resultados obtenidos dentro de un laboratorio, se realiza para el Dr Luis Eduardo Segura de la Universidad de Guadalajara para el uso de esta información como aplicación en campos de cultivos.
Autores:	Marisol Domínguez Alcayde Luis Alberto Caballero Tirado

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

Marisol Domínguez: el trabajo en cualquier laboratorio comparte reglas y condiciones de esterilidad en prácticas tomando en cuenta el área de aplicación biotecnológica, en esta ocasión trabajé en un laboratorio ajeno a los que había acostumbrado y creo que esto es de gran ayuda ya que aunque el trabajo en laboratorio siempre comparte un común, los instrumentos y equipos varían mucho además de que las prácticas o metodologías pueden depender mucho del maestro a cargo ya que hay muchas técnicas para replicar las mismas actividades y creo que esta

experiencia fue de gran aporte profesional para mi carrera, convivir con compañeros de laboratorio y conocer otro tipo de aplicaciones resultó interesante y de mi agrado.

Luis Caballero: El trabajar en un espacio distinto al que tengo años acostumbrándome, con equipos, personas y reglas distintas, me permitió enriquecer mi versatilidad como ingeniero, permitiéndome darme cuenta de que puedo obtener buenos resultados, desenvolverme bien con personas con quienes no había tenido contacto previamente y comunicarme con ellas efectivamente aún al encontrarme en espacios ajenos a los conocidos. Además, el contenido temático de nuestro trabajo de PAP fue muy interesante para mí, ya que me permitió realizar actividades que nunca había realizado y reforzar conocimientos que tenía años sin aplicar.

3.2 Aprendizajes logrados

Marisol Domínguez: Se presentaron nuevos retos durante este PAP ya que nunca había realizado ninguna de las actividades mencionadas y realizar nuevas metodologías siempre trae consigo aprendizajes nuevos, a pesar de ser un factor importante para la realización de prácticas con cepas bacterianas y levaduras el hecho de experimentar con cepas reactivadas a menos de 24h, la verdad es que en últimas ocasiones anteriores al inicio al PAP yo había olvidado esta práctica tan importante a considerar y que creo ya tengo bien cimentada. Otros retos presentados fueron la organización, planeación y diseño de experimentos con anterioridad ya que la mayoría de las veces asistimos al laboratorio esperando generar todo eso el mismo día y en algunas ocasiones omitimos consideraciones importantes, de igual manera siempre traté de aprender de los errores e ir previendo ese tipo de omisiones, pero siempre se puede mejorar más.

Luis Caballero: Durante el desarrollo de este PAP logré practicar y aprender distintas técnicas y métodos con los que no había tenido contacto durante la carrera, ampliando así mis horizontes en lo que se soy capaz de entender, plantear y llevar a cabo; considero de gran importancia el desarrollo de mi habilidad para comunicarme con personas con quienes no tengo previo contacto en el ámbito profesional, donde la falta de conocimiento personal no representa un obstáculo para la comunicación profesional. Además, como en el anterior PAP, reforcé el sentido de organización y autoadministración del tiempo y recursos necesarios para lograr los objetivos a cumplir y completar un proyecto.