

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“EVALUACIÓN *in vitro* DE ESPECIES BACTERIANAS NATIVAS DEL
GENERO *BACILLUS* AISLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE CEBOLLA
(*Allium cepa*) COMO BIOCONTROLADORES DE *FUSARIUM SP.* EN LA
IRRIGACION DE SANTA RITA DE SIGUAS – AREQUIPA”**

Tesis presentada por el Bachiller:

García López Kevin Eduardo

Para optar por el título profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Dr. Roque Rodriguez, Javier

Arequipa - Perú

2020

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20190000033671

N° Trámite en Fac. 445-2019
Fecha Recep. Fac. 13-09-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **GARCIA LOPEZ, Kevin Eduardo**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION in vitro DE ESPECIES NATIVAS BACTERIANAS AISLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE CEBOLLA (*Allium cepa*) COMO BIOCONTROLADORES DE *Fusarium sp.* EN LA IRRIGACION DE SANTA RITA DE SIGUAS-AREQUIPA"

DICTAMINADORES: **Dra. Milagro Terán Dianderas** 2) **Mgter. José Carpio Carpio**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"EVALUACION in vitro DE ESPECIES BACTERIANAS NATIVAS DEL GENERO BACILLUS AISLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE CEBOLLA (*Allium cepa*) COMO BIOCONTROLADORES DE *Fusarium sp.* EN LA IRRIGACION DE SANTA RITA DE SIHUAS - AREQUIPA"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMAS: FECHA **09.10.2019**

ASESOR: **Dr. Francisco Roque Rodríguez**

DICTAMEN ASESORÍA:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación **"EVALUACION in vitro DE ESPECIES BACTERIANAS NATIVAS DEL GENERO BACILLUS AISLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE CEBOLLA (*Allium cepa*) COMO BIOCONTROLADORES DE *Fusarium sp.* EN LA IRRIGACION DE SANTA RITA DE SIHUAS - AREQUIPA"**, me place informar que, absueltas mis observaciones y subsanadas las correcciones, considero se encuentra APTO para continuar con su debido trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y títulos de la Facultad.

FIRMA FECHA **16-03-2020**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Mgter. Cinthia Córdova Barrios**
- 2) **Mgter. Milagro Terán Dianderas**
- 3) **Mgter. José Carpio Carpio**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMA FECHA **10.10.2020**

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA HORA LOCAL

FIRMA DEL DECANO FECHA

Dedicatoria

A mi madre y hermana, por nunca haberme perdido la Fé y haberme brindado su amor y apoyo incondicional sin importar las circunstancias.

A Lizardo, que gracias a él tuve una carrera universitaria.

A Sofía, que con su ejemplo y más que palabras me ayudaba a reaccionar cuando más lo necesité.

A ellos que a pesar de mis errores y el tiempo que perdí siempre estuvieron orgullosos de mí y a toda mi familia, porque siempre hicieron una pausa para escucharme, algo que valoro más de lo que ellos mismos creen...

Agradecimientos

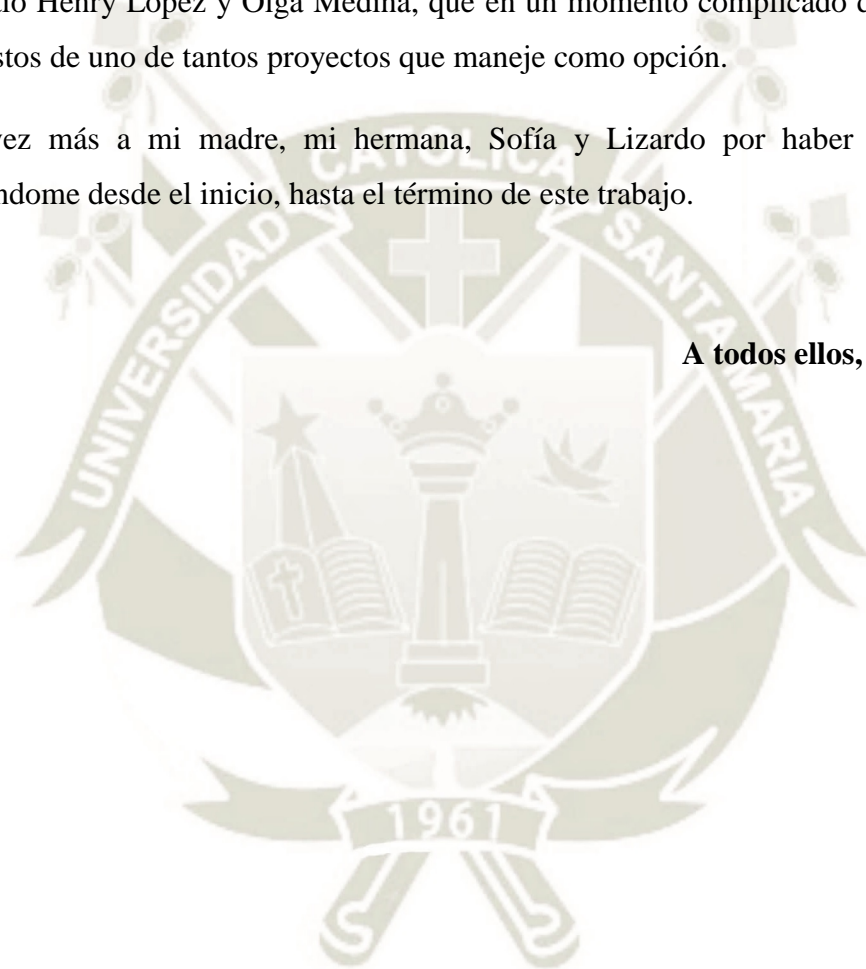
Al Dr. Julio Cesar Bernabé por su apoyo con la secuenciación de cepas, a Eric Llerena y Percy Llamocah por sus ideas y experiencia, tanto en el laboratorio como en el campo.

A mis jurados el Ing. José Carpio, la Dra. Milagros Terán, la Ing. Cinthia Córdova y a mi asesor el Dr. Javier Roque, por el tiempo y sus recomendaciones.

A mi tío Henry López y Olga Medina, que en un momento complicado decidieron asumir los gastos de uno de tantos proyectos que maneje como opción.

Una vez más a mi madre, mi hermana, Sofía y Lizardo por haber estado presentes ayudándome desde el inicio, hasta el término de este trabajo.

A todos ellos, muchas gracias.



Resumen

En el presente trabajo de investigación, se aisló, caracterizó y evaluó microorganismos del género *Bacillus* a partir de cultivares de cebolla en la irrigación de Santa Rita de Siguan. Esta investigación se originó a partir del seguimiento continuo de los campos durante la temporada de cultivo que inicia en el mes de mayo y termina en el mes de septiembre. Durante este periodo, se observó que, dentro del mismo terreno, había secciones que presentaban síntomas de fusariosis (enfermedad causada por el hongo patógeno *Fusarium sp*) sin embargo, otras se encontraban en buen estado, por lo que surgió la hipótesis de que existía en el campo algún microorganismo que protegía a estas plantas, actuando como antagonista de la plaga.

Bajo esta hipótesis se procedió a tomar muestras tanto de tierra alrededor de la raíz y del mismo bulbo, incluidas sus raíces; estas fueron tomadas de cebollas en buen y mal estado y preservadas por separado. Tras realizar los pre tratamientos respectivos eliminando así las partículas más grandes y por su parte, lavando las raíces en una solución de lejía al 1% y etanol al 70% (con 3 enjuagues para cada lavado respectivamente), se realizó el aislamiento de los diferentes microorganismos. Para la obtención de los microorganismos que posteriormente fueron identificados como *Bacillus sp*, se utilizó la tierra proveniente de cebollas en buen estado, esta fue tamizada y sometida a un tratamiento térmico, tras lo cual se sembraron diluciones en agar nutritivo. Para la obtención de *Fusarium sp*, se utilizaron las raíces provenientes de cebollas en mal estado realizando lavados con lejía y etanol y posteriormente sembradas en agar Sabouraud.

Una vez los microorganismos fueron repicados e identificados micro y macroscópicamente, se obtuvieron tres cepas de *Bacillus sp* y dos de *Fusarium sp*. Las cuales fueron enfrentadas (cada uno de los *Bacillus* contra cada uno de los *Fusarium*) mediante 3 distintos métodos los cuales consistían en sobreposición, enfrentamiento dual y difusión de metabolitos. Tras los ensayos de antagonismo se determinó que la cepa #1 de *Bacillus* presentó mayor actividad antagonista frente a los hongos patógenos de *Fusarium* por lo cual fue seleccionada para ser secuenciada molecularmente. El ADN fue obtenido mediante el método de fenol cloroformo, la amplificación mediante PCR y la posterior secuenciación utilizando la técnica de Sanger, pudiéndose determinar que se trataba de "*Bacillus velezensis*". Adicionalmente se observó que cuando se evalúan solo los

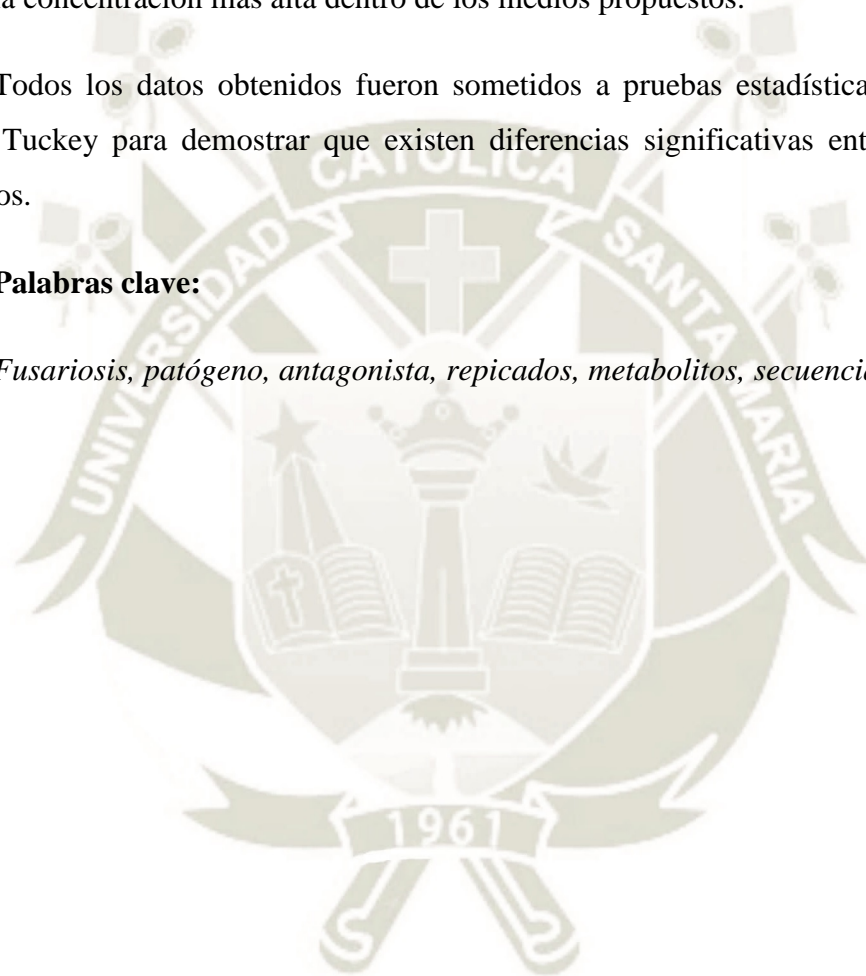
metabolitos sin la presencia de las bacterias que los producen, estos tienen un tiempo de vida entre los 4 y 5 días, siendo totalmente inefectivos al cabo de 6 días.

Posteriormente se elaboraron 4 medios de producción artesanales basados en los mismos compuestos (azúcar, fosfato monoamónico, sal y aminoácidos) variando las concentraciones de la base carbonada para determinar la concentración máxima alcanzada por los microorganismos, tiempo y pH, determinándose de esta forma que el medio #2 logro la concentración más alta dentro de los medios propuestos.

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas estadísticas tanto ANOVA como Tuckey para demostrar que existen diferencias significativas entre los resultados hallados.

Palabras clave:

Fusariosis, patógeno, antagonista, repicados, metabolitos, secuenciada, PCR.



Abstract

In the recent work, microorganism from the bacillus genre were aisled, evaluated and caraterizedated coming from onion fields in Santa Rita de Sihuas –Arequipa.

This investigation was formulated from the continuous observation of the fields in the season of production which starts in the month of May and ends in the month of September.

During this period of time it was observed that some sections of the field showed symptoms of Fusariosis (sickness caused by the infection of the pathogen fungi *Fusarium* sp.), nevertheless, there were some sections showing a good development and healthy plants, that was the main reason why the hypothesis arose that maybe some sort of microorganism was protecting this plants, antagonizing the effects from the plague.

Under this hypothesis we proceeded to take samples of both soil around the root and the also bulb, including its roots; these were taken from onions in good and bad condition and preserved separately. After performing the respective pretreatments thus eliminating the largest particles and, in turn, washing the roots using a solution of bleach at 1% and ethanol at 70% (performing 3 washes per each solution), the isolation of the different microorganisms was performed. To obtain the microorganisms that were later identified as *Bacillus* sp, the soil from onions in good condition was used, it was screened and subjected to heat treatment, after which dilutions were seeded in nutrient agar. To obtain *Fusarium* sp, the roots from onions in poor condition were used by washing with bleach and ethanol and subsequently planted in Sabouraud agar.

Once the microorganisms were replicated and identified micro and macroscopically, three strains of *Bacillus* sp and two of *Fusarium* sp. were confronted (each of the *Bacillus* against each of the *Fusarium*) by 3 different methods which consisted of overlap, dual confrontation and diffusion of metabolites.

After the confrontation tests, it was determined that *Bacillus* #1 strain showed greater antagonistic activity against the pathogenic *Fusarium* fungi, for with it was selected to be sequenced. The DNA was obtained by the phenol chloroform method, amplification by PCR and subsequent sequencing using the Sanger technique, so the strain selected was determined as “*Bacillus velezensis*”.

It was observed that when only metabolites are evaluated without the presence of the bacteria that produce them, they have a life time between 4 and 5 days, being totally ineffective after 6 days.

Subsequently, 4 handcrafted broths of production based on the same compounds (sugar, monoammonium phosphate, salt and amino acids) were prepared by varying the concentrations of the carbon base to determine the maximum concentration reached by the microorganisms, time and pH, finding out that #2 broth reached the higher concentration among the ones proposed.

All data obtained were subjected to both ANOVA and Tuckey statistical tests to demonstrate that there are significant differences between the results found.

Key words:

Fusariosis, pathogen, antagonist, chime, metabolites, sequenced, PCR.

Índice de Contenido

Resumen	v
Abstract.....	viv
Indice de contenido.....	ix
Introducción.....	xvii
Objetivos.....	xx
General.....	xx
Específicos.....	xx
Hipótesis	21
Capítulo I: Marco Teórico	22
1.1. Cebolla.....	22
1.1.1 Origen:.....	22
1.1.2. Cultivo y estadios de crecimiento:.....	23
1.1.3. Criterios de calidad:.....	25
1.2. Producción:.....	26
1.2.1. Producción de cebolla en el Perú:.....	26
1.2.2. Exportación de cebolla fresca peruana:.....	27
1.3. Enfermedades de la cebolla:.....	28
1.3.1. Enfermedades bacterianas:.....	31
1.3.2. Principios de manejo:.....	32
1.3.3. Herramientas disponibles:.....	32
1.4. Fusarium.....	33
1.4.1. Género fusarium:.....	33
1.4.2. Aislamiento e identificación:.....	35
1.4.3. Manejo de fusarium en cebolla:.....	37
1.5. Uso de pesticidas:.....	39
1.5.1. Antecedentes históricos:.....	39
1.5.2. Clasificación de los pesticidas:.....	40
1.5.3. Problemática en el Perú:.....	41
1.5.4. Ventajas e inconvenientes:.....	42
1.5.5. Resistencia a los fungicidas:.....	43
1.6. Mecanismos de antagonismo:.....	45
1.6.1. Interacciones ecológicas:.....	45
1.6.2. Mecanismos antagónicos:.....	46

1.7. Control biológico.....	47
1.7.1. Antecedentes:.....	47
1.7.2. Microorganismos antagonistas:	48
1.7.3. Ventajas e inconvenientes:	49
1.7.4. Consideraciones:.....	50
1.7.5. Alcance y futuro del control biológico:	51
1.8. Bacillus como controlador biológico:	52
1.8.1. El género Bacillus:.....	52
1.8.2. Mecanismo de acción antagónico:.....	52
1.8.3. Bacillus spp como controlador biológico:	53
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	56
2.1. Ambientes de Ejecución.....	56
2.2. Muestras Biológicas	56
2.3. Materiales	56
2.3.1. Equipos	56
2.3.2. Materiales	56
2.3.3. Reactivos.....	57
2.4. Métodos	58
2.4.1. Obtención de la muestras.....	58
2.4.2. Pretratamiento de las muestras	58
2.4.3. Tratamiento y sembrado de las muestras.....	59
2.4.4. Aislamiento de microorganismos	60
2.4.5. Identificación de los microorganismos	61
2.4.6. Reactivación de las cepas aisladas.....	62
2.4.7. Pruebas de enfrentamiento.....	62
2.4.8. Evaluación de la durabilidad de los metabolitos respecto a fungicidas sintéticos comerciales	64
2.4.9. Identificación molecular de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista.	65
2.4.10. Elaboración de cepario en caldo glicerol.....	67
2.4.11. Elaboración de medios de producción, cinética bacteriana y viabilidad	68
Capítulo III: Resultados y Discusión.....	69
3.1. Identificación de los microorganismos.....	69
3.1.1. Observación macroscópica de cepas bacterianas	69
3.1.2. Observación microscópica de cepas bacterianas mediante Tinción Gram.....	70
3.1.3. Observación macroscópica de cepas fúngicas.....	71

3.1.4. Observación microscópica mediante tinción con azul de lactofenol.....	72
3.2. Reactivación de las cepas aisladas	73
3.3. Pruebas de antagonismo	74
3.3.1. Sobreposición	74
3.3.2. Enfrentamiento dual.....	80
3.3.3. Difusión de metabolitos en agar	92
3.4. Evaluación de la durabilidad de los metabolitos respecto a fungicidas sintéticos comerciales	92
3.4.1. Persistencia sobre “ <i>Fusarium a</i> ”	92
3.4.2. Persistencia sobre “ <i>Fusarium b</i> ”	92
3.5. Identificación molecular de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista.....	93
3.6. Elaboración de medios de producción, curva de crecimiento y cinética bacteriana. ...	93
Capitulo IV: Conclusiones y Recomendaciones al investigador.....	100
Conclusiones:	100
Recomendaciones al investigador	102
Referencias Bibliograficas	103
ANEXOS	112

Índice de Figuras

Figura N° 1:	Composición química de la cebolla (<i>Allium cepa</i>) por cada 100g de producto, describiendo su contenido de minerales, vitaminas, así como su aporte de carbohidratos, grasa, proteínas. Fuente: 123RF – kulyk 2019.....	23
Figura N° 2:	Estadios de desarrollo de la cebolla. Nota: Fuente: SENAMHI-DA.....	24
Figura N° 3:	Porcentaje de producción de cebolla a nivel nacional dividido por regiones, siendo Arequipa el máximo productor de esta hortaliza en nuestro territorio. Fuente: Producción integrada de la cebolla, boletín de divulgación 2013. .	28
Figura N° 4:	Morfología de las colonias de diferentes especies de <i>Fusarium</i> en medio de cultivo agar papa dextrosa. La placa superior de cada par es la superficie superior y la placa inferior es la superficie inferior. A, <i>F. poae</i> ; B, <i>F. oxysporum</i> ; C, <i>F. acuminatum</i> ; D, <i>F. nelsonii</i> ; E, <i>F. subglutinans</i> ; F, <i>F. nygamal</i> ; G, <i>F. pseudonygamal</i> ; H, <i>F. lateritium</i> ; I, <i>F. thapsinum</i> ; J, <i>F. decemcellulare</i> ; K, <i>F. verticillioides</i> ; L, <i>F. culmorum</i> . Nota. Fuente: Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. A utilitarian approach to <i>Fusarium</i> identification. <i>Plant disease</i> . 2003;87(2):117-28. ⁽²⁷⁾	34
Figura N° 5:	Imagen microscópica de <i>Fusarium</i> spp. observándose una estructura ramificada con cuerpos fusiformes. Fuente: Mediagraphic, artículo de revisión Infecciones por fusarium 2014.....	36
Figura N° 6:	Imagen microscópica de <i>Bacillus</i> spp. observándose su forma de bacilo. Fuente: Indiamart, Generic Bio – tech private Limited, Telangana 2019 ...	52
Figura N° 7:	Efecto inhibitorio de cuatro cepas de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>F. solani</i> . (A) Cultivo de <i>F. solani</i> ras 10 días, (B) doble cultivo de <i>F. solani</i> con <i>Bacillus</i> A, (C) doble cultivo de <i>F. solani</i> con <i>Bacillus</i> C, (D) doble cultivo de <i>F. solani</i> con <i>Bacillus</i> S, (E) doble cultivo de <i>F. solani</i> con <i>Bacillus</i> P. Nota. Fuente: Ajilogba CF, Babalola OO, Ahmad F. Antagonistic effects of <i>Bacillus</i> species in biocontrol of tomato <i>Fusarium</i> wilt. <i>Studies on Ethno-Medicine</i> . 2013;7(3):205-16	54
Figura N° 8:	Ubicación del terreno de cultivo para cebolla, Fuente: Imágenes © 2020 CNES / Airbus, Maxar Technologies	58
Figura N° 9:	Siembra de las raíces en agar Sabouraud.....	59
Figura N° 10:	Sembrado de fungicidas en placa de agar Sabouraud con micelio sembrado en la parte central.	66
Figura N° 11:	Parámetros del programa para la amplificación del gen 16s.	66
Figura N° 12:	Colonias aisladas a partir de la rizósfera de cebollas en buen estado, ligeramente perladas de 2 a 4mm.....	68
Figura N° 13:	Diferencias macroscópicas visibles en los bordes de las colonias aisladas. 13A crecimiento con bordes orbiculares de aspecto seco, 13B crecimiento de bordes lineares de aspecto seco, 13C bordes irregulares de aspecto ligeramente húmedo.....	70
Figura N° 14:	De izquierda a derecha, cepa aisladas 1, 2 y 3 a 100x de aumento en microscopio óptico tras realizarles tinción Gram.	71

Figura N° 15: Medición del crecimiento miceliar en la cepa F.a. 15A crecimiento medido a las 48h del sembrado, 15B crecimiento medido a las 72 horas del sembrado.....	72
Figura N° 16: Medición del crecimiento miceliar en la cepa F.b. 16 crecimiento medido a las 48h del sembrado, 16B crecimiento medido a las 72 horas del sembrado.	72
Figura N° 17: 17A (cepa a) y 17B (cepa b) en ambas se observan la presencia de conidios característicos del genero Fusarium.....	72
Figura N° 18: Colonias bacterianas obtenidas directamente del matraz tras incubación a 28°C durante 48 horas, no se observaron colonias fungales.....	73
Figura N° 19: Crecimiento en placa de Fusarium A frente a bacterias aisladas de Bacillus1,2 y3 mediante la técnica de sobreposición.....	75
Figura N° 20: Crecimiento e inhibición del patógeno “Fusarium A” frente a las distintas cepas aisladas a las 72 horas del sembrado. 20A Fusarium a vs Bacillus 1, 20B Fusarium a vs Bacillus 2, 20C Fusarium a vs Bacillus 3.	76
Figura N° 21: Crecimiento en placa de Fusarium B frente a bacterias aisladas de Bacillus1,2 y3 mediante la técnica de sobreposición.....	75
Figura N° 22: Crecimiento e inhibición del patógeno “Fusarium B” frente a las distintas cepas aisladas a las 72 horas del sembrado. 22A Fusarium B vs Bacillus 1, 22B Fusarium B vs Bacillus 2, 21C Fusarium B vs Bacillus 3.	78
Figura N° 23: Porcentaje de inhibición de Fusarium sp con la técnica de sobreposición ..	78
Figura N° 24: Crecimiento en placa de Fusarium A frente a bacterias aisladas de Bacillus 1,2 y 3, mediante la técnica de enfrentamiento dual.....	81
Figura N° 25: Crecimiento e inhibición del patógeno “Fusarium A” frente a las distintas cepas aisladas mediante la prueba de enfrentamiento dual a las 72 horas del sembrado. 25A Fusarium a vs Bacillus1, 25B Fusarium A vs Bacillus2, 25C Fusarium A vs Bacillus3.....	82
Figura N° 26: Crecimiento en placa de Fusarium B frente a bacterias aisladas de Bacillus 1,2 y 3, mediante la técnica de enfrentamiento dual.....	83
Figura N° 27: Crecimiento e inhibición del patógeno “Fusarium B” frente a las distintas cepas aisladas mediante la prueba de enfrentamiento dual a las 72 horas del sembrado. 27A Fusarium b vs Bacillus1, 27B Fusarium A vs Bacillus2, 27C Fusarium B vs Bacillus3.....	84
Figura N° 28: Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. con la técnica de enfrentamiento dual.....	85
Figura N° 29: Crecimiento de microorganismos mediante difusión de metabolitos.....	88
Figura N° 30: Micelio inhibido ante la presencia de metabolitos provenientes de B1 a las 96 horas de evaluación. 30A inhibición sobre el patógeno “Fusarium A”. 30B inhibición sobre el patógeno “Fusarium B”.	89
Figura N° 31: Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. con la Bacteria 1 mediante la técnica de difusión de metabolitos en agar.	90
Figura N° 32: Crecimiento bacteriano en el medio 1.	94

Figura N° 33: Crecimiento bacteriano en el medio 2	95
Figura N° 34: Crecimiento bacteriano en el medio 3	95
Figura N° 35: Crecimiento bacteriano en el medio 4	96
Figura N° 36: Comparacion del crecimiento bacteriano entre los 4 medios propuestos....	97
Figura N° 37: Gráfica de medias para el crecimiento de Bacillus velenzis en distintos medios de cultivo	97



Índice de Tablas

Tabla N° 1:	Lista de las enfermedades más frecuentes e importantes en cultivos de cebolla, considerando su origen, agente patógeno y la relevancia en el medio.....	29
Tabla N° 2:	Taxonomía de Fusarium, un conjunto de hongos filamentosos ampliamente distribuidos.....	35
Tabla N° 3:	Clasificación toxicológica de pesticidas (OMS). LD ₅₀ agudo (ratas), mg/kg de plaguicida	41
Tabla N° 4:	Metabolitos producidos por diversos organismos antagonistas contra agentes patógenos	47
Tabla N° 5:	Distribución de los hongos fitopatógenos contra cada una de las cepas de Bacillus aisladas.....	62
Tabla N° 6:	Preparación de los distintos fungicidas según especificación del fabricante.....	64
Tabla N° 7:	Porcentajes de nutrientes para la preparación de los diferentes medios.	68
Tabla N° 8:	Crecimiento en mm de “Fusarium A” enfrentado a las distintas cepas aisladas de Bacillus sp por triplicado.....	74
Tabla N° 9:	Crecimiento en mm de “Fusarium B” enfrentado a las distintas cepas aisladas de Bacillus sp por triplicado.....	76
Tabla N° 10:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición	79
Tabla N° 11:	Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición	79
Tabla N° 12:	Crecimiento en mm de “Fusarium A” enfrentado a las distintas cepas aisladas de Bacillus sp por triplicado.....	81
Tabla N° 13:	Crecimiento en mm de “Fusarium B” enfrentado a las distintas cepas aisladas de Bacillus sp por triplicado.....	83
Tabla N° 14:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición	85
Tabla N° 15:	Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición.	86
Tabla N° 16:	Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición de Fusarium	86
Tabla N° 17:	Crecimiento en mm de los patógenos enfrentados a los metabolitos extraídos de las distintas cepas aisladas de Bacillus sp.	87
Tabla N° 18:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición con la técnica de difusión de metabolito.....	890
Tabla N° 19:	Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición con la técnica de difusión de metabolito.....	91
Tabla N° 20:	Análisis de varianza para el crecimiento bacteriano entre los diferentes medios propuestos.....	98

Tabla N° 21: Comparaciones múltiples entre los distintos medios de producción respecto al control utilizado. 98



Índice de Anexos

1. Secado de las muestras en bandejas plásticas de 40 x 25cm.	113
2. Método cruz, muestra dividida en 4 secciones.	113
3. Matraz y muestra diluida en agua estéril; baño María con termómetro.	113
4. Filtro PVDF 0.2µm y su acoplamiento a jeringa de 5ml para extraer medio libre de microorganismos y partículas.	114
5. Preparación de los fungicidas sintéticos.	114
6. Análisis electroforético del ADN extraído de la muestra “Bacillus 1” tras 10 minutos a 110v y 300mA.	116
7. Control de “Fusarium A” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de sobreposición.	116
8. Control de “Fusarium B” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de sobreposición.	116
9. Control de “Fusarium A” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de enfrentamiento dual.	117
10. Control de “Fusarium B” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de enfrentamiento dual.	117
11. Crecimiento del “Fusarium A” enfrentado a los diferentes fungicidas comerciales, agua y metabolitos provenientes de Bacillus 1.	117
12. Crecimiento del “Fusarium B” enfrentado a los diferentes fungicidas comerciales, agua y metabolitos provenientes de Bacillus 1.	118
13. Secuencia en formato fasta obtenida mediante el método Sanger en un secuenciador ABI3730X1.	118
14. Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 1.	119
15. Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 2.	120
16. Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 3.	121
17. Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 4.	122

Introducción

El uso continuo de pesticidas artificiales en la agricultura es una de las principales causas de los desbalances en las comunidades microbianas en los suelos, lo cual conlleva a la aparición de muchas enfermedades en distintos tipos de cultivos, como la cebolla, el maíz, la soya etc. Esto implica una reducción en el rendimiento de las cosechas, incrementado aun debido a que la mayoría de estas enfermedades son transmitidas por semilla o el mismo suelo se encuentra ya contaminado por una cosecha anterior¹.

A parte de los efectos negativos causados en el ambiente y en la salud humana, uno de los más grandes problemas causado por los fungicidas es la reducción drástica en la viabilidad de bacterias pertenecientes al orden de las Rhizobiales, responsables directas de la aparición de nódulos y fijación de nitrógeno. Por lo tanto, utilizar microorganismos como biocontroladores representan una gran alternativa como método para evitar las enfermedades fitopatogénicas causadas por hongos².

Algunas de las enfermedades más comunes en cultivos son atribuidas a las especies del genero *Fusarium*, siendo las más frecuentemente reportadas: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani*^{3,4}.

Las enfermedades causadas por estos hongos pueden presentarse en cualquier etapa del desarrollo de la planta siendo los síntomas más comunes el amarillamiento del tallo, clorosis, marchitez, retardo en el crecimiento, muy bajo rendimiento de la cosecha, decoloración de la corona, rizoma y raíces; en muchos casos se llega a una completa pudrición de la raíz, conllevando a la muerte de la planta⁵.

El aislamiento y uso de biocontroladores, en especial antagonistas a plagas, ha incrementado su desarrollo en los últimos años, ya que estos microorganismos son potenciales sustituyentes a los pesticidas sintéticos. Los agentes de control biológico suelen tener efectos letales o inhibidores de manera fisiológica o bioquímica en el patógeno, deteniendo su crecimiento y/o desarrollo de diversas maneras, sea antagonismo, parasitismo o alelopatía⁶.

Desde hace más de 25 años la cebolla es uno de los principales productos agrícolas en ser exportados, siendo nuestro principal cliente Estados Unidos, pero a partir del año

1996 es que logra posicionarse como producto bandera, siendo Arequipa la región con mayor aporte en este campo.

Los cultivos de cebolla han enfrentado diversos problemas debido a la presencia de enfermedades causando daños irreparables en las plantas; de esta manera disminuye la calidad y la cantidad del producto generando grandes pérdidas en la industria a nivel nacional. Entre los principales agentes causantes de enfermedades en cultivos de cebolla se encuentra el género *Fusarium spp*, hongo fitopatógeno cuyo crecimiento se ve exacerbado debido a la humedad presente en las zonas costeras entre los meses de junio y julio.

Teniendo en cuenta las grandes pérdidas generadas en este proceso y el riguroso control de calidad al que son sometidos los productos agrícolas antes de ingresar a otros países, surge la necesidad de aplicar nuevos métodos para el manejo de plagas, evitando el uso de pesticidas sintéticos y buscando soluciones en el control biológico, utilizando productos naturales que no dejen residuos tóxicos en las cebollas ni en los suelos en los cuales estas son cultivadas. De esta forma se garantiza la calidad del producto, el fácil acceso a países con alta demanda de cebolla y la apertura a nuevos mercados internacionales.

Objetivos

General

Evaluación *in vitro* especies bacterianas nativas del genero *Bacillus* aisladas a partir de cultivares de cebolla (*Allium cepa*) como biocontroladores de *Fusarium sp.* en la irrigación de Santa Rita de Sihuas – Arequipa.

Específicos

1. Aislar especies bacterianas nativas del genero *Bacillus* presentes en la rizósfera de cebolla (*Allium Cepa*) que se encuentren biológicamente activas dentro de una zona de cultivo contaminada por patógenos fungales.
2. Evaluar si el antagonismo ante el patógeno se da por amensalismo, competencia o por una combinación de ambos y su persistencia respecto a fungicidas sintéticos comerciales.
3. Seleccionar e identificar mediante secuenciación molecular la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista frente al patógeno aislado.
4. Elaborar cuatro medios de producción artesanales a diferentes concentraciones de nutrientes para evaluar su efecto en la cinética microbiana y la viabilidad del microorganismo.

Hipótesis

“Debido a que si un campo de cultivo se encuentra contaminado por *Fusarium sp.* y que algunas plantas muestran menor grado de daño es posible que estén siendo protegidas por algún microorganismo benéfico que combata la invasión del patógeno y que se puedan aislar para su uso como biocontroladores.”



Capítulo I: Marco Teórico

1.1. Cebolla

1.1.1 Origen:

Allium cepa o comúnmente conocida como cebolla, es una planta hortaliza perteneciente a la familia *Liliaceae*. Es un tipo de cultivo que ha evolucionado con el paso de las generaciones de la mano de grandes migraciones poblacionales, pero cuyo origen se remonta a las regiones montañosas de Asia Central, teniendo gran difusión en el mundo y siendo la segunda hortaliza en importancia económica detrás de la papa^{7,8}. Resaltaba por ser una fuente importante en la alimentación, pero también por sus aplicaciones medicinales⁹. El género *Allium* presenta más de 500 miembros, que difieren en color, apariencia y sabor pero están estrechamente relacionadas por su contenido fitoquímico, bioquímico y nutraceutico¹⁰.

La cebolla posee un bulbo formado por numerosas capas que difieren en grosor y carnosidad al interior y que tienen por función la conservación de sustancias nutritivas necesarias para la alimentación de los brotes; así también, presenta un sistema radicular poco profundo que no supera los 30cm, un tallo en forma de disco subsónico que es la base de la inflorescencia y se encuentra situado en la base del bulbo; y unas hojas alargadas, envainadoras que se disponen de forma opuesta¹¹.

De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), la cebolla está compuesta mayormente de agua siendo entre 85-90g/100g de su peso fresco; presenta una alta capacidad de preservación y portabilidad, pudiendo ser disecada y preservada por varios meses¹⁰. Su composición química es variada, presenta una variedad de vitaminas y minerales, y también una cantidad no menospreciable de carbohidratos, proteínas y grasas (**ver Figura 1**).

Se asocia su consumo o ingesta a la reducción del colesterol y lípidos en sangre, así como, a factores que disminuyen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares; esto debido a su alto contenido de compuestos fenólicos; su alto contenido en azufre brindan además propiedades antibacteriales, antifúngicas, etc^{9,10}. Dentro de los compuestos fenólicos que presenta esta hortaliza, resaltan los flavonoides quercetina y kaempferol por su estabilidad física y química que actualmente son ampliamente estudiados, evocando sus

propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antiinflamatorias, cardioprotectoras, vasodilatadoras, antioxidantes y anticancerígenas.^{9,12}



Figura N° 1: Composición química de la cebolla (Allium cepa) por cada 100g de producto, describiendo su contenido de minerales, vitaminas, así como su aporte de carbohidratos, grasa, proteínas.

1.1.2. Cultivo y estadios de crecimiento:

En nuestro país, encontramos diversas variedades de cebolla entre las principales tenemos: Sivan, Noam, pantera rosa, roja arequipeña, amarilla dulce y blanca¹¹. La pigmentación del bulbo depende de las catáfilas de protección pudiendo ser: roja, blanca, morada, verde, marrón o cobrizo¹². En el mercado internacional, la comercialización de cebolla amarilla es la de mayor relevancia seguida de la cebolla roja arequipeña¹³.

Para el cultivo de cebollas, existen tres alternativas: hacer uso de semillas que requieren un proceso previo de cultivo, siembra de almácigo y trasplante, y por último realizar un trasplante de bulbos inmaduros^{8,14}.

Una vez cultivada la cebolla, su proceso de desarrollo y maduración está dividido en cuatro estadios o etapas de crecimiento (**ver Figura 2**):

- Aparición de hojas: Dependiendo de la variedad puede presentarse un brote de 12 a 16 hojas de forma tubular.
- Formación del bulbo: Al cese de la aparición de nuevas hojas, comienza la formación del bulbo y engrosamiento de las catáfilas al acumular reservas en este.
- Maduración inicial o primaria: Inicia un plegamiento de las hojas y el cultivo comienza a amarillear.
- Maduración completa: Los bulbos ya están listos para su consumo o comercialización al estar totalmente desprovistos de sus hojas.

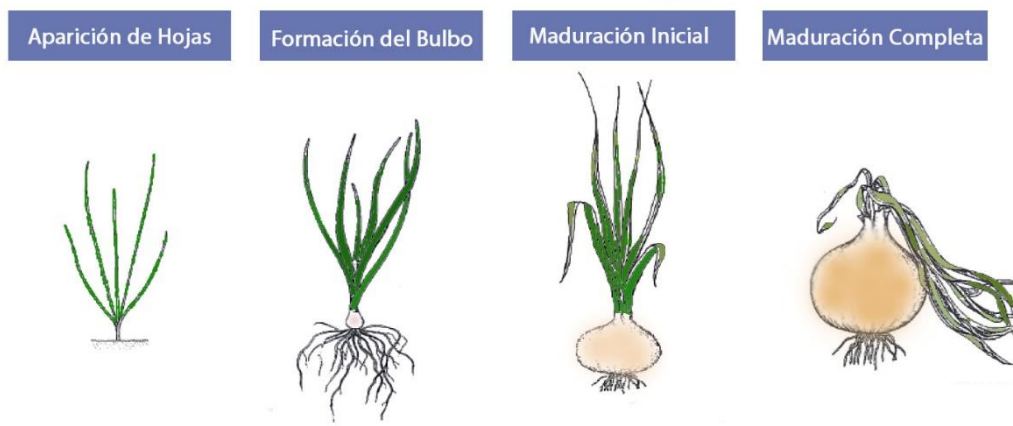


Figura N° 2: Estadios de desarrollo de la cebolla.

La etapa de formación del bulbo es la que ha concentrado la mayor cantidad de estudios para optimizar el producto, se ha demostrado que existe una estrecha relación en el proceso de bulbificación y varios factores como:

- Fotoperiodo: Entre 12-16 horas de luz.
- Temperatura: El rango de temperatura óptima se encuentra entre 18-24°C.
- Suelos: De buena textura, fértil, con alta capacidad de drenaje, pH cercano al neutro, además de suelos de bajo contenido salino.

- Riego: Dependerá de la evapotranspiración, de la capacidad del suelo para retener el agua y la variedad de cebolla, estimándose volúmenes de 4500-5000 y 7000-7500 m³/ha para riego por goteo y para riego por gravedad respectivamente.

En efecto, a mayor temperatura y ante un fotoperiodo más prolongado, el proceso de bulbificación será más rápido al favorecerse el crecimiento y desarrollo del bulbo¹⁵. La disponibilidad de nutrientes, requieren de la presencia de nitrógeno, fósforo y potasio y azufre como materia orgánica¹⁶.

La disponibilidad de nutrientes es de alta importancia para el desarrollo de la cebolla, pero también, está directamente relacionada con el sabor del bulbo el cual está dado por compuestos azufrados volátiles y no volátiles, además, en menor cantidad azúcares solubles. El picor o pungencia, este sabor intrínseco de la cebolla, se da por la reacción entre una enzima denominada allinasa, la cual se libera de las vacuolas tras el corte del bulbo y/o rompimiento de los tejidos, con los sulfóxidos de cisteína que contiene obteniendo así tiosulfatos, estos compuestos son reactivos, volátiles, y brindan su efecto lacrimógeno^{9,10}. En caso de las cebollas amarillas dulces, se recomienda evitar el uso de estiércol, ya que éste incrementa notoriamente la pungencia de la cebolla por su alto contenido de azufre¹⁷.

1.1.3. Criterios de calidad:

Para la venta, comercialización y en algunos casos exportación y/o importación de este producto, son varios los factores de calidad a tomar en cuenta entre los cuales tenemos: color, forma, tamaño, contenido de sólidos y pungencia. Los bulbos han de estar cubiertos de catáfilas secas y firmemente adheridas, entretanto sus capas internas no han de ser visibles exteriormente, deben tener una consistencia bastante firme y no han de ceder a una fuerte presión, no obstante, en algunos casos la presencia de raíces no es deseable.

- Bulbos de primera calidad: Han de estar sanos y bastante compactos, presentar una coloración uniforme y además presentar un diámetro superior a los 6cm.
- Bulbos de segunda calidad: Son todos aquellos que en su desarrollo formen 2 bulbos en una sola planta, que se encuentren partidos y que presenten un tamaño menor a los 6cm de diámetro.

Según Carvalho y Nakagawa, entre los factores más limitantes en la producción de cebollas esta la carencia de investigación, desarrollo y aplicación de tecnologías para el mejoramiento genético para poder adaptar cultivos a determinadas condiciones, tanto ambientales como de disponibilidad de nutrientes, dependiendo de la región y la calidad de cultivo deseada^{7,18}.

Con una alta tecnificación en el proceso, el rendimiento puede alcanzar unos 40000 kg por hectárea. Dentro de las necesidades del cultivo, los puntos a considerar son propiciar una mayor eficiencia en la utilización de fertilizantes, del agua, de la mano de obra y minimizar las pérdidas por nutrientes por erosión, volatilización, lixiviación o contaminación con patógenos⁷.

1.2. Producción:

Asia se eleva como el continente con mayor producción de cebollas a nivel mundial con más del 60% de ésta. China es el país dominante, ya que su producción representa el 50% de la del mercado asiático y 31% de la del mercado mundial, con una tasa anual de crecimiento superior al 10%. Son India, Países Bajos, China y Estados Unidos los principales países exportadores; mientras que Rusia, Malasia, Japón y Bangladesh son los principales importadores, seguidos de Reino Unido, Estados Unidos, Arabia Saudita y Alemania^{11, 13}.

1.2.1. Producción de cebolla en el Perú:

La cebolla presenta elevada importancia en nuestro contexto geográfico y económico, por el número de agricultores involucrados en su cultivo, su distribución geográfica en diversas partes de nuestro territorio y la superficie ocupada para su producción¹⁴. En el Perú, en el año 2012, la producción de cebolla estuvo destinada en más del 80% a abastecer el consumo interno, dado el gran arraigo de la población peruana al consumo de este producto, especialmente la cebolla roja que es comercializada como producto fresco, teniendo un consumo de 11kg per cápita al año o 900 g al mes, estando registrado su mayor consumo en zonas urbanas a diferencia de las zonas rurales^{13,19}. La mayor parte de la producción es distribuida mediante venta a mayoristas, empresas independientes, mercados de la misma región, o en algunos casos en las mismas chacras donde se da la producción. Por otra parte, en los últimos años ha destacado el incremento en la producción de cebolla amarilla, estando ésta destinada al mercado exterior casi en su

totalidad, sin embargo, a pesar de esto las exportaciones de cebolla representan no más del 1% del total de exportaciones agrarias en nuestro país^{11, 13}.

En general, los productores de cebolla en su mayoría son productores de pequeñas parcelas que se orientan a la venta en el mercado local, y un total de 154 empresas registradas al 2018 que tienen participación más activa en mercados internacionales.

1.2.2. Exportación de cebolla fresca peruana:

A partir de los años 90, la exportación de cebollas adquirió relevancia por la creciente demanda de cebollas amarillas dulces por parte del mercado estadounidense, siendo este un punto de inflexión para el crecimiento de la producción y exportación de esta variedad.

En el año 2011, el volumen de exportación tanto de la cebolla amarilla como de la cebolla roja eran similares, pero para el año 2016, el volumen de exportación de cebolla blanca se duplicó, a diferencia de la roja cuyo aumento no fue tan significativo^{11, 19}.

En el año 2017, la producción total a nivel nacional reportada fue de 722436 toneladas de cebolla, siendo Arequipa la región de mayor producción, seguida de Ica, La Libertad y Lima respectivamente; concentrando estas cuatro regiones el 90.1% de la producción nacional (**ver Figura 3**). Respecto al rendimiento, la región con mejor promedio fue Ica con 57743 Kg/ha seguido de Arequipa con 42280 kg/ha, seguidas inmediatamente de La Libertad, Lambayeque y Tacna, alcanzando un promedio de rendimiento de 39576 kg/ha a nivel nacional¹⁴.

En este rubro de la agroexportación, las tres empresas más grandes a nivel nacional concentran cerca del 30% del mercado de exportaciones, teniendo un gran porcentaje de participación, siendo esas empresas tanto acopiadoras como productoras, especialmente en la región de Arequipa.

El canal principal de exportación es vía marítima, siendo el puerto del Callao el que en términos de volumen de exportación resulta ser el más importante, saliendo de este punto alrededor del 66% del total y siendo uno de los principales destinos los Estados Unidos; mientras que por vía terrestre destaca Colombia como destino de exportación transfronteriza, habiendo registrado un total de 40.5 mil toneladas durante el año 2016; sin

embargo, gran parte de este comercio terrestre se realiza en un contexto de informalidad por lo que existe escasa información veraz y disponible.¹³

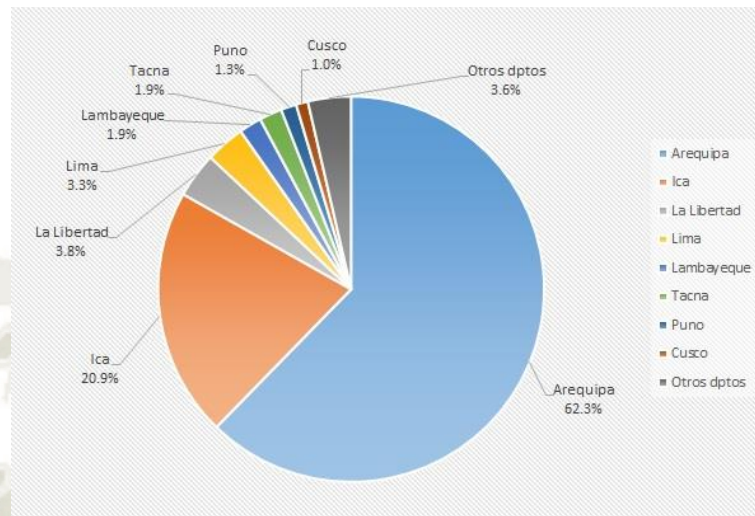


Figura N° 3: Porcentaje de producción de cebolla a nivel nacional dividido por regiones, siendo Arequipa el máximo productor de esta hortaliza en nuestro territorio.

1.3. Enfermedades de la cebolla:

Generalmente, las enfermedades juegan un rol importante como limitante de la producción y comercialización de la cebolla, pueden reducir drásticamente el rendimiento, afectar el valor comercial y aumentar los costos de producción de esta hortaliza. A largo plazo, son causantes de problemas aún más graves, uno de ellos son las enfermedades de post-cosecha que generan complicaciones al momento del almacenamiento y de la comercialización; otro problema e incluso uno más grave es la pérdida de productividad en los suelos por una alta acumulación de patógenos a causa de una siembra continua del mismo cultivo, comprometiendo el potencial productivo del suelo, debiéndose diseñar estrategias de manejo y medidas de control para los cultivos tomando en cuenta la importancia, la distribución y la epidemiología de las enfermedades recurrentes en estos cultivos. También se requiere un control de enfermedades de manera continua y racional para poder conservar la productividad de la zona y poder así asegurar los cultivos y consolidar tratos comerciales.

En los últimos años, se han intensificado los estudios y caracterización de una gran cantidad de enfermedades que afectan al cultivo de cebollas, pero solo unas cuantas son las que representan un grave riesgo (**ver Tabla 1**): podredumbre basal (*Fusarium oxysporum*), raíz rosada (*Phoma terrestris*), mildiu (*Peronospora destructor*), moho negro (*Aspergillus niger*), nematodos (*Ditylenchus dipsaci*), trips (*Thrips tabaco*) y otras enfermedades bacterianas²⁰.

Tabla N° 1: Lista de las enfermedades más frecuentes e importantes en cultivos de cebolla, considerando su origen, agente patógeno y la relevancia en el medio.

Enfermedad	Agente Patógeno	Relevancia
Enfermedades foliares		
Mildiu	<i>Peronospora destructor</i>	+++
Mancha blanca	<i>Cladosporium allii-cepae</i>	+
Mancha púrpura	<i>Alternaria porri</i>	+
Enfermedades provenientes del suelo		
Raíz rosada	<i>Phoma terrestris</i>	+++
Podredumbre basal	<i>Fusarium oxysporum</i>	+++
Podredumbre blanca	<i>Sclerotium cepivorum</i>	+
Enfermedades de post-cosecha		
Carbonilla	<i>Aspergillus niger</i>	+++
Moho azul	<i>Penicillium spp.</i>	+
Podredumbre blanda	<i>Bacterias no identificadas</i>	++

- **Podredumbre basal (*Fusarium oxysporum*):**

Es un hongo procedente del suelo, se suele presentar durante los veranos cálidos, suele manifestarse con la aparición de hojas amarillentas y retorcidas en cualquier etapa de desarrollo de la planta, llegando incluso a marchitarse; las raíces toman una coloración marrón y se pudren, la base del bulbo presenta por su parte desarrollo fúngico blanco.

En campos que presenten esa infección, se recomienda una rotación de cultivos de tres años a más, ya que los hongos pueden sobrevivir por medio de clamidosporas.

- ***Raíz rosada (Phoma terrestris):***

La infección inicia al entrar en contacto las raíces de la planta con el hongo, esta enfermedad no ataca al bulbo solo a las raíces, las cuales adquieren un color rosa claro pasando luego a un tono más intenso y pudiendo llegar a tornarse rojo o púrpura oscuro. En estadios avanzados de la infección, las plantas pierden sus raíces provocando una disminución considerable de crecimiento y rendimiento. Esta enfermedad se ve interrumpida en la etapa de almacenamiento y se recomienda un plan de rotación de cultivos de aproximadamente 5 años ya que el terreno mantiene los hongos en forma de esporas latentes.

- ***Peronospora o Mildiu (Peronospora destructor):***

Se presenta mayormente en cultivos trasplantados y en casi la totalidad de regiones donde se cultiva la cebolla, inicia con una mancha aceitosa, alargada y sin brillo, las hojas se secan rápidamente y sobre estas pueden crecer otros hongos como *Stemphyllium* o *Alternaria spp.*; ocasionando en la mayoría de los casos la muerte prematura del cultivo. Se recomienda el uso de fungicidas protectores previo al cultivo y en casos donde las condiciones sean favorables al crecimiento de estos patógenos, teniendo en cuenta que son patógenos que poseen un alto riesgo de generar resistencia.

- ***Moho negro o carbonilla (Aspergillus niger):***

Es una enfermedad que se manifiesta sobre todo durante el almacenamiento y/o transporte al desarrollarse una coloración negra debajo de la piel seca debido a las esporas desarrolladas por el hongo, llegando a marchitarse el bulbo. En campo no suele distinguirse ninguna señal como indicio de esta infección, a lo mucho una ligera decoloración oscura en el cuello del bulbo. Se recomienda evitar que las plantas enfermen o sufran lesiones ya que estos se vuelven en puntos de entrada para este patógeno, asimismo, evitar dañar los bulbos durante la recolección, almacenamiento y transporte, siendo deseable un ambiente con baja humedad y una temperatura menor a 15°C.

- ***Nemátodos (Ditylenchus dipsaci):***

Es un problema sanitario altamente contagioso para cultivos de cebolla y ajo, donde en etapas iniciales ya hay pérdida de plantas jóvenes y descartes por deformaciones. Puede transmitirse mediante la semilla de cebolla, por lo cual se recomienda el análisis de estas. Entre sus síntomas tenemos una producción anormal de raíces, una base deformada y las hojas presentan un crecimiento reducido y en algunos casos deformaciones. Se recomienda evitar plantar cultivos similares por un periodo mínimo de 3 años y realizar la rotación de cultivos con otros con resistencia a este mal.

- ***Trips (Thrips tabaci):***

Es un insecto de color oscuro muy pequeño que alcanza a medir 1-1.2 mm de largo, posee unas largas alas, crecen a temperatura ambiente llegando a la madurez en 3 semanas aproximadamente.

Se encuentran frecuentemente en la epidermis de las hojas de donde succionan la savia de la planta, generando una coloración verde-grisácea. En casos más severos, las hojas se pueden marchitar y secarse mientras que los bulbos se ven reducidos en tamaño y presentan marcas superficiales como un raspado que perjudica gravemente su apariencia. Se ha de tomar en cuenta que otras plantas como el tomate, el morrón, la papa son también hospederos de estos insectos. Se recomienda un buen control de la maleza, y en caso de un control químico, al utilizar insecticidas se debe tomar en cuenta el número promedio total de trips por planta y debe realizarse la aplicación mediante pulverización.

1.3.1. Enfermedades bacterianas:

Las denominadas bacteriosis afectan tanto a los cultivos de cebolla (follaje, tallo y bulbo) como a aquellas que están en almacenamiento, generando una degradación húmeda, viscosa y con olor putrefacto en los tejidos del follaje. En los bulbos, causan la pérdida de consistencia en el cuello y al hacer un corte se observa unas cuantas catáfilas afectadas. Las bacterias avanzan a través de las capas infectadas hasta la base del bulbo. Los casos más graves es cuando los bulbos se ven afectados y no solo el follaje, generando cuantiosas y constantes pérdidas.

Durante el cultivo las cepas más comunes son *Pseudomona viridiflava* y *P. syringae*; mientras que aquellas que atacan a estas plantas en almacenamiento son *Burkholderia cepacia*, *B. gladioli* y *Erwinia carotovora*. Se recomienda la aplicación de un tratamiento químico en caso de notar indicios de inicio de la enfermedad, si las condiciones climáticas son muy adversas presentando lluvias intensas, viento, granizo y también en caso exista algún tipo de daño mecánico en alguna parte de la planta¹⁴.

1.3.2. Principios de manejo:

Se han establecido tres normativas para el manejo de enfermedades tanto para su prevención como su manejo en campo, en caso la enfermedad este dada como resultado de la interacción entre el patógeno y el cultivo, debe de seguirse lo siguiente:

- La exclusión, se basa en impedir el ingreso y establecimiento de algún patógeno en una zona libre del mismo.
- La erradicación, es el paso a tomar en caso un patógeno logre establecerse. Mientras se inicie este proceso con mayor antelación, habrá una mayor probabilidad de éxito, ha de llevarse un sistema de vigilancia para el monitoreo de plagas lo cual nos facilitaría aumentar nuestras probabilidades de detección al tener conocimiento detallado de los focos infecciosos, así como de su distribución en un área concreta²⁰.
- La evasión, intenta prevenir una coincidencia espacio-temporal entre cultivo y patógeno. Los principios aplicados para esto son: hacer uso de campos de cultivos libres de patógenos que afecten a este cultivo y evitar las épocas del año en las que las condiciones climáticas sean factores desencadenantes de su desarrollo.

1.3.3. Herramientas disponibles:

El uso de semillas híbridas que presenten resistencia genética ante patógenos es uno de los medios más eficientes de control, aunque sus costos elevados descartan su expansión en esta industria. Otra herramienta disponible y más popular, es el control químico, con alta eficiencia en manejo de enfermedades foliares, pero de baja eficacia ante aquellas provenientes del suelo y las de post-cosecha. Entre sus deficiencias encontramos que

existen perjuicios económicos por sus costos, dificultades técnicas para su aplicación, daños ecológicos por sus efectos colaterales ante cualquier otro componente beneficioso presente en el ecosistema el suelo.

Además, están presentes los tratamientos de solarización del suelo que, a pesar de tener un gran potencial ante enfermedades como la raíz rosada, por motivos económicos y prácticos se limita su aplicación a superficies pequeñas. El manejo de cultivo es otra forma de control de enfermedades, es bastante utilizado, siendo una técnica ancestral, que se basa en la rotación de los cultivos por temporada de cosechas para evitar la acumulación y desarrollo continuo de patógenos presentes en el suelo, afectando así su supervivencia. En efecto, se recomienda una rotación de tres o más años por cultivos que no sean susceptibles a hongos como *F. oxysporum*, *P. terrestris*, etc²⁰.

A pesar que la cebolla no es un tipo de cultivo muy exigente y de con alta adaptabilidad, son ciertas situaciones las cuales incrementan la presencia desarrollo de patógenos, así como la predisposición de las plantas a ser infectadas. En este contexto, el sistema de riego juega un rol importante y decisivo, siendo el riego por aspersión el que incrementa las probabilidades de desarrollo de macha blanca, podredumbre bacteriana entre otras, mientras que el sistema por goteo resulta ser el más efectivo.

1.4. Fusarium

1.4.1. Género fusarium:

Fusarium spp. son hongos filamentosos que en su mayoría actúan como patógenos de una gran variedad de plantas como flores, gramíneas, hortalizas y ornamentales, ocasionando pudrición de la raíz, tallo y bulbo; asimismo algunas especies son patógenos oportunistas en humanos debido a su producción de micotoxinas²¹ causantes de infecciones sistémicas que presentan una alta tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos siendo los agentes de enfermedades como queratitis micótica, onicomicosis y hialohifomicosis, desarrollándose esta última en pacientes víctimas de quemaduras o con un sistema inmune debilitado debido a un trasplante de médula ósea²²⁻²⁴. De hecho, fue en el año 1973 cuando se documenta el primer caso de infección con este patógeno en un paciente con leucemia aguda, luego de ello, son muchos los casos que describen contaminación por *Fusarium*. Por otra parte, en sujetos sanos, se han encontrado niveles elevados de anticuerpos frente a polisacáridos extracelulares, surgiendo la hipótesis que

hay un contacto frecuente con este patógeno mediante inhalación de las esporas en el aire²⁴.
25.

En la actualidad, se ha identificado que el género *Fusarium* spp. comprende alrededor de 300 especies filogenéticamente distintas, organizadas en 20 complejos y 9 linajes monotípicos.²⁶ Los complejos que suelen mencionarse con menor frecuencia son: *F. dimerum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. sporotrichioides* y *F. chlamydosporum*, mientras que, el complejo *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. oxysporum*, son aquellos que contiene la mayor parte de los patógenos oportunistas identificados hasta el momento del género *Fusarium* (ver **Figura 4**). Un ejemplo es *Fusarium solani*, complejo que presenta más de 45 especies diferentes de las cuales son 20 las asociadas a infecciones humanas.

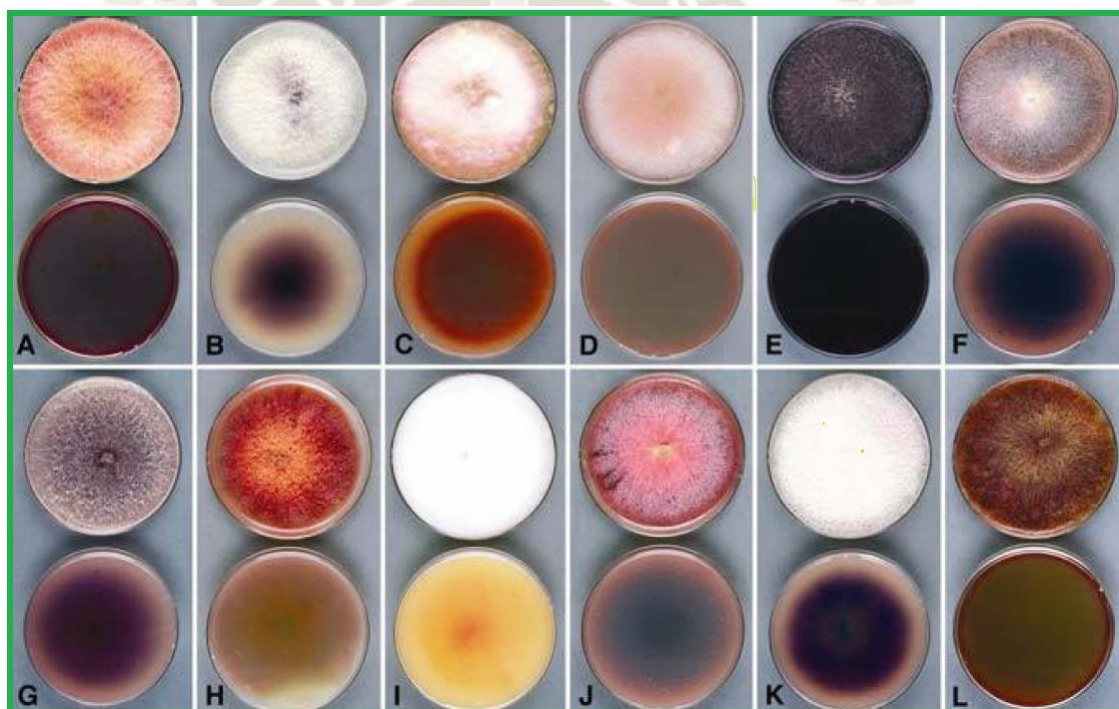


Figura N° 4: Morfología de las colonias de diferentes especies de *Fusarium* en medio de cultivo agar papa dextrosa. La placa superior de cada par es la superficie superior y la placa inferior es la superficie inferior. A, *F. poae*; B, *F. oxysporum*; C, *F. acuminatum*; D, *F. nelsonii*; E, *F. subglutinans*; F, *F. nygamal*; G, *F. pseudonygamal*; H, *F. lateritium*; I, *F. thapsinum*; J, *F. decemcellulare*; K, *F. verticillioides*; L, *F. culmorum*.⁽²⁷⁾

1.4.2. Aislamiento e identificación:

Las especies de *Fusarium*, suelen ser estudiadas taxonómicamente dependiendo de sus características morfológicas y moleculares. Son capaces de producir tres tipos de esporas denominadas: macroconidios, microconidios y clamidosporas; aunque algunas especies solo son capaces de producir macroconidios.

Los macroconidios se producen en una estructura reproductiva asexual especializada denominada esporodoquio o conidioma esporodoquial pero también en el micelio aéreo; los microconidios son producidos solamente en el micelio aéreo en estructuras denominadas conidióforos; finalmente las clamidosporas son producidas mediante conidios llamados clamidoconidios, mediante reproducción asexual²⁸.

Tabla N° 2: Taxonomía de *Fusarium*, un conjunto de hongos filamentosos ampliamente distribuidos

Taxonomía de <i>Fusarium</i>	
División	Ascomycota
Clase	Euascomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especies	<i>Oxysporum</i> , <i>solani</i> , <i>chlamydosporum</i> , , <i>dimerium</i> , , <i>fujikuroi</i> , etc

- **Descripción morfológica:**

Presenta colonias de rápido crecimiento, dependiendo de la especie pueden presentar desarrollo de micelio aéreo algodonoso y/o clamidosporas, pueden presentar colores pálidos desde un blanquecino o amarillento hasta colores brillantes como rosado, rojo o púrpura. Además, el género *Fusarium* spp. produce macro y microconidios, los macroconidios están conformados por células piriformes, fusiformes a ovoides, tienen una forma de medialuna,

hialinos y septados siendo variables en largo, ancho y curvatura; mientras que, los microconidios pueden estar agrupados en cadenas largas o cortas con formas variadas, siendo principalmente: células apicales alargadas, fusiformes a falciformes, y ovales; suelen estar ausentes en algunas especies de *Fusarium*, tal cual como las clamidosporas, las cuales presentan una doble pared de gran grosor, una textura lisa y que se encuentra formando pareja o grupo^{22, 29}.

Los agares más utilizados para su cultivo y crecimiento son: agar clavel (CLA), agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabouraud, estos dos últimos nos permiten observar el tamaño, pigmento y morfología de las colonias, y por su parte el agar CLA nos permite observar la morfología de los macroconidios y el desarrollo de cadenas de los microconidios²².

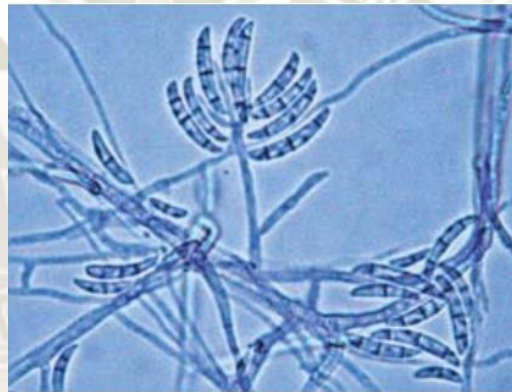


Figura N° 5: Imagen microscópica de *Fusarium* spp. observándose una estructura ramificada con cuerpos fusiformes.

Debido a la alta dificultad presente en la identificación de diferentes especies de este género, en ciertas ocasiones, es necesario inducir la esporulación en algunos aislamientos y tomar en cuenta los siguientes factores:

- Morfología microscópica: Ha de observarse la presencia o ausencia de macro y microconidios, así como su forma; de igual manera, la presencia o ausencia de clamidosporas.
- Diámetros de crecimiento: Ha de medirse el diámetro de las colonias formadas en agar papa dextrosa y/o agar sacarosa, siendo cultivados durante 96 horas a 25°C en total oscuridad.

- Cultivar la pigmentación: Después de la incubación inicial, ha de someter los cultivos a una segunda incubación por un periodo de 10 a 14 días, pero con exposición diaria a la luz, haciendo uso de los mismos tipos de medios de cultivo.

- **Identificación molecular:**

Para la identificación taxonómica de estos microorganismos, se hace uso de la tipificación multi-locus de secuencias. Se basa en la amplificación mediante PCR seguido del secuenciamiento de ADN de siete fragmentos internos de genes de mantenimiento, cada uno de los cuales contiene entre 450 a 500 pares de bases, obteniendo secuencias únicas a las cuáles les son asignadas un número particular de alelo. Entonces, cada muestra es caracterizada según las secuencias únicas de alelos en cada uno de los siete loci, formando así un perfil alélico único o tipo de secuencia (ST)³⁰.

Las secuencias del factor de elongación de traducción EF-1 α y los genes de ARN ribosómico de la subunidad mitocondrial (mtSSU) han sido esenciales para dilucidar la filogenia molecular del género *Fusarium*^{31, 32}.

Existen bases de datos validadas enfocadas a la identificación de las diferentes especies del género *Fusarium*: FUSARIUM-ID (Universidad Estatal de Pensilvania) y *Fusarium* MLST (Centro de Biodiversidad Fúngica CBS-KNAW)^{33, 34}.

1.4.3. Manejo de *Fusarium* en cebolla:

La fusariosis o comúnmente conocida como podredumbre blanca, es una enfermedad causada por *Fusarium spp.* la cual afecta gravemente a cultivos de cebolla y otras especies similares desde el momento en que se planta en el suelo, pasando por el momento de la cosecha e incluso en almacenaje. Ocasiona grandes pérdidas económicas y se caracteriza por varios síntomas, siendo los principales: las hojas suelen tornarse amarillas y empiezan a marchitarse secándose desde un extremo hacia la base, el bulbo presenta inicios de putrefacción, así como el tallo, falta de desarrollo radicular, necrosis y otros síntomas asociados a exceso de riego en el campo.

Los cultivos más jóvenes o almácigos son aquellos más propensos a contaminarse ante condiciones que predisponen el desarrollo de este patógeno, como los daños mecánicos u otros causados por insectos e incluso por las condiciones climáticas; por ende, es recomendable mantener una evaluación constante de las plántulas más pequeñas para reconocer esta infección tempranamente.

Las cepas de *Fusarium* presentan un eficaz mecanismo de dispersión, facultado por sus estructuras reproductivas como lo son el micelio y las esporas, su diseminación se ve asistida indirectamente por el viento y la lluvia e incluso por la propia contaminación de la maquinaria, habiéndose demostrado que puede esparcirse hasta 400km de distancia a través del aire desde su punto de origen^{25, 33}.

Para el control de este tipo de plagas, se recomienda el uso de semillas que presenten resistencia a este patógeno ya que este hongo tiene una alta capacidad de supervivencia gracias a sus clamidosporas o esporas de resistencia³¹, las cuáles pueden permanecer de manera indefinida en los suelos, y al mismo tiempo, pueden propagarse a través de la corteza de la raíz hasta llegar al xilema de la planta, dentro de la cual el hongo se ramifica e inicia la producción de microconidios, los cuales son transportados hacia la parte superior de la planta e infectando el tallo y el ápice. Terminado este proceso ascendente, el micelio avanza lateralmente al penetrar las paredes superiores de los vasos y produciendo más microconidios que siguen este proceso. No existe un control químico adecuado para enfrentar estos patógenos en suelo, pero suele optarse por la utilización de fungicidas sintéticos que previenen la formación de micelio en el interior de la planta. También suele recomendarse medidas de control preventivas como²⁹:

- Manejo eficiente del riego
- Desarrollo y maduración completas para poder ser cosechadas
- Eliminación adecuada de bulbos enfermos
- Solarización de suelos y bulbos infectados
- Limpieza de lugares de almacenaje
- Rotación de cultivos

Otra alternativa preventiva que ha surgido mediante la investigación, ha sido el uso de biofungicidas que hacen uso de otro hongo antagonista como, por ejemplo, *Trichoderma spp*; este hongo denominado como benéfico se encuentra de manera natural en casi todo tipo de suelo, forma colonias en la zona radicular de las plantas, estimulando su producción, mejorando la absorción y biodisponibilidad de nutrientes y sobre todo evitando la reproducción de *Fusarium*; comercialmente se aislaron varias cepas de este hongo que presentan una potencial como agentes de control biológico, existiendo nueve formulaciones como productos comerciales : Bio-Fungus, Root Pro and Trichoderma, Trochoject, Trichopel, Trichodowels, Trichoseal, TUSAL, Trieco, Trichodex, vendiéndose como formulaciones líquidas y en polvo para su aplicación en campo contra diversas especies patogénicas de *Fusarium*^{35, 36}.

1.5. Uso de pesticidas:

1.5.1. Antecedentes históricos:

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), define en su artículo 2º del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas: “Un plaguicida o pesticida es cualquier tipo de sustancia o mezcla que está destinada a prevenir, controlar o destruir cualquier plaga, especies de plantas no deseadas o animales que interfieran o causen perjuicio a cualquier forma de producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de productos agrícolas”.

Según A. Smith y Diane M. Secoy³⁷, los orígenes de estos métodos para combatir plagas se remonta a la antigua Grecia y al imperio romano hace dos mil años, siendo una problemática que hasta la época moderna se ha tenido la necesidad de combatir, ya que afectan a los cultivos y productos agrícolas, optando por el uso de sustancias con la capacidad de eliminarlas o agentes biocidas, y que han ido evolucionando en tecnificación a través de tres etapas³⁸:

- Era de los productos naturales: desde épocas indocumentadas hasta mediados del siglo XIX, pasando por Homero quien hizo uso del azufre para contrarrestar hongos; y por los chinos usando el arsenito contra plagas de roedores.

- Era de los fumigantes y derivados del petróleo: comienza a partir de la revolución industrial hasta principios del siglo XX, incorporando la producción de sustancias químicas para el sostenimiento del desarrollo y producción, descubriendo la acción plaguicida de elementos como azufre, cobre, arsénico y fósforo; y el uso de derivados del petróleo como el sulfato de cobre con cal, ácido carbónico, bromuro de metilo, entre otros.
- Era de los productos sintéticos: desde el siglo XX en adelante, se inicia con la síntesis y utilización de productos dinitroderivados; el descubrimiento del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT); la síntesis de productos organoclorados los cuales poseen átomos de carbono, hidrógeno, cloro y oxígeno teniendo una alta estabilidad en el ambiente; y la síntesis de productos organofosforados que son derivados del ácido fosfórico siendo menos estables en el ambiente comparados con los organoclorados.

1.5.2. Clasificación de los pesticidas:

Los plaguicidas o pesticidas, son compuestos químicos de naturaleza tanto orgánica como inorgánica, que se clasifican en fungicidas, insecticidas, herbicidas y rodenticidas. El principio activo de cada pesticida es el que determina la actividad de éste, son producidos en la industria con un alto grado de pureza (75-90%), y van en pequeñas cantidades dentro de la formulación de cada producto³⁹.

Los plaguicidas de naturaleza química o inorgánica presentan alrededor de 1000 principios activos, mientras que los de naturaleza biológica u orgánica presentan 195 principios activos, pudiendo producirse más de 30000 formulados. Estas formulaciones integran mayormente coadyuvantes como adherentes, fluidificantes, estabilizantes y emulgentes, los cuales ayudan a aumentar la eficacia del principio activo, pero presentan frecuentemente efectos nocivos, haciendo que el manejo del producto sea más complicado, y de allí que existan diferentes clasificaciones para estos productos³⁸.

Dentro de las múltiples clasificaciones de los plaguicidas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación que se basa en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, registrando el valor de DL₅₀ o dosis letal media en términos de mg/kg del peso del cuerpo del animal (ratas); según la vía de ingreso al cuerpo y el tiempo de exposición (**ver Tabla 3**).

Tabla N° 3: Clasificación toxicológica de pesticidas (OMS). LD₅₀ agudo (ratas), mg/kg de plaguicida

Clasificación	Por vía oral		Por vía dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
(A) Sumamente tóxico	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
(1B) Muy tóxico	6 - 50	21 - 200	11 - 100	41 - 400
(2) Moderadamente tóxico	51 - 500	201 - 2000	101 - 1000	401 - 4000
(3) Ligeramente tóxico	501 - 2000	2001 - 3000	> 1000	> 4000
(4) No suelen ser tóxicos	> 2000	> 3000		

Otra de las clasificaciones más comunes de los plaguicidas, según la literatura internacional, es según su grupo o familia química, clasificándose en compuestos organofosforados, organoclorados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de las triazinas, compuestos inorgánicos, y compuestos de origen botánico³⁸.

1.5.3. Problemática en el Perú:

El continuo avance en el agotamiento de los recursos naturales causado en parte por el uso de prácticas agrícolas inadecuadas sigue siendo uno de los problemas más resaltantes a nivel mundial y especialmente en países tercermundistas⁴⁰. Es necesario la existencia de metodologías, técnicas analíticas y normativas para la regulación y control de contaminantes en el ambiente: agua, suelo, aire y en alimentos. En nuestro país, contamos con normativas referidas al agua: los parámetros físico-químicos, elementos y sustancias orgánicas e inorgánicas; referidas al aire: contaminantes primarios (gases); sin embargo, para normativas referidas a suelos ha de consultarse normas internacionales y para alimentos se consultan las normas establecidas por la FDA (Food and Drug Administration)⁴¹.

A partir del año 1991, mediante las resoluciones ministeriales N° 09-91 y N° 014-99, quedó prohibida la importación, uso y comercialización en nuestro territorio nacional de los siguientes plaguicidas: DDT, aldrin, mirex, dieldrin, clordano, toxafeno, endrin y hexaclorobenceno; estos plaguicidas del grupo de los organoclorados presentan efectos

severos que tiene sobre la salud y son catalogados como contaminantes orgánicos persistentes (COP) ^{41, 42}.

A pesar de esto, en muchas regiones del Perú, especialmente en aquellos valles o zonas rurales donde se practica la agricultura, existe una práctica muy común que es el uso indiscriminado de agroquímicos, generando gran contaminación tanto en el suelo como en el agua y posiblemente en el aire. Este problema tiene grandes consecuencias a nivel de conservación de la biodiversidad, alterando ecosistemas lo cual atenta contra la vida de animales silvestres. La agricultura en estas zonas, suele ser intensa por tanto optan por sistemas de producción monocultivistas que priman el uso extendido de plaguicidas, incrementando la dependencia tecnológica, la resistencia de patógenos, el deterioro de los suelos, la reducción de agentes de control biológico y por último un incremento en los costos de producción ⁴².

Asimismo, según SENASA, la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) y el Consejo Nacional del Ambiente (CONAM), aún se sigue comercializando este tipo de productos como Aldrin y Mirex, de manera ilegal en tiendas de agroquímicos de diversas provincias del país, siendo necesario la fiscalización y decomiso de éstos.

1.5.4. Ventajas e inconvenientes:

Según la FAO, dos tercios de la población mundial presentan un déficit alimenticio, ya que, conforme al paso de los años, el tamaño de la población mundial ha aumentado notablemente, así como la demanda de alimentos y del mismo modo la necesidad de producción de nuestros suelos. Para mantener este equilibrio, los agricultores se han visto en la premisa de hacer uso de fertilizantes, pero también de plaguicidas, generando a medio y largo plazo problemas de contaminación.

Los plaguicidas son compuestos químicos que presentan estructuras moleculares de alta complejidad y que son biológicamente activos; su producción y comercialización demandan de un proceso largo y costoso. Han de estudiarse y analizarse sus efectos en el organismo *target*, así como en la planta y/o animal hospedador, siendo primordial verificar que cumplan con las siguientes normativas ³⁹:

- Estabilidad: debe mantener su efecto durante un tiempo mínimo determinado.

- **Economía:** Su utilización debe generar un mayor beneficio que compense su gasto.
- **Selectividad:** Ha de combatir solamente a los organismos deseados sin afectar a las flora y fauna adyacente.
- **Seguridad:** No deben constituir un peligro de toxicidad para la planta, para los animales, ni para el hombre.
- **Efectividad:** Cumplir el efecto deseado en bajas dosis.

Sin embargo, debido a todos los procesos, interacciones y condiciones climáticas por los que atraviesan estos compuestos en suelo además de su persistencia y bioactividad, es difícil hacer un balance entre sus beneficios y perjuicios. Ante ello, se postulan dos hipótesis contradictorias sobre este tema las cuales son: la reducción y/o prohibición del uso de plaguicidas en la agricultura será bastante favorable, ya que estos tienen alta probabilidad de retención en suelos y cultivos; mientras que otros argumentan que su uso constante a dosis elevadas maximiza la producción y es esencial para tener rentabilidad.

Se calcula que se perdería al menos un tercio de la producción alimentaria total en caso de no usar compuestos químicos para contrarrestar el efecto de las plagas en los cultivos y de las enfermedades propias de las plantas. Resaltan igualmente otras ventajas del uso de plaguicidas como son: disminución de la fluctuación de cultivos debido a plagas, ahorro de la mano de obra y aumento del rendimiento. Sin embargo, son igualmente resaltantes los inconvenientes que el uso de plaguicidas presenta: alteración del balance natural de los sistemas ecológicos, desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de insectos o microorganismos, la toxicidad que presenta para el hombre al momento de su manipulación o toxicidad residual en alimentos³⁹.

1.5.5. Resistencia a los fungicidas:

Los fungicidas son todos aquellos productos químicos con la capacidad de prevenir, curar y erradicar enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. En el mercado actual, existe un catálogo muy amplio de compuestos fungicidas los cuales pueden adaptarse a formulaciones específicas para su utilización en pequeños terrenos de cultivo o en terrenos de miles de hectáreas. Las características más resaltantes de todo fungicida son⁴³:

- Aspectos de formulación: Debe tener una concentración precisa, los excipientes han de aumentar la eficacia del fungicida, así como dar estabilidad a la formulación durante su transporte y almacenamiento.
- Aspectos toxicológicos: Idealmente no deben presentar toxicidad residual, lo deseable es que los residuos no generen problemas al consumidor. Además, no deben representar un peligro en su aplicación.
- Aspectos biológicos: No debe afectar el equilibrio ecológico del hábitat del terreno de cultivo, asimismo debe ser eficaz y consistente a la concentración recomendada.

Los mecanismos de acción más importantes de los fungicidas son: la inhibición del crecimiento micelial, la inhibición de la germinación de esporas, y también retardan el crecimiento del hongo al aplicarse en estadios ya avanzadas de infección. Sin embargo, la evaluación de la interacción entre suelo y compuesto fungicida es bastante compleja, teniendo que evaluar diversas propiedades físicas, químicas y biológicas en ambos debido a la gran diversidad de suelos como de plaguicidas el mercado, pudiendo surgir problemas graves a partir de un mal manejo de este producto, como la reducción de sensibilidad a ciertos productos por parte de agentes patógenos, perdiendo dichos productos su eficacia para un correcto control de la plaga y requiriendo aumentos sustanciales en las dosis administradas. Los mecanismos por los que se desarrolla esta resistencia son^{39, 43}:

- Detoxificación del fungicida: Los patógenos que presentan resistencia tiene la capacidad de metabolizar el producto y los metabolitos secundarios producidos no presentan fitotoxicidad.
- Falta de activación del fungicida: En algunas formulaciones, el compuesto químico o principio activo ha de ser metabolizado o activado dentro del patógeno para adquirir su carácter fungicida, siendo un proceso que no ocurre en microorganismos resistentes.
- Alteración del sitio activo: Una ligera modificación del sitio activo de un patógeno puede ser la causa de la falta de acoplamiento entre éste y un fungicida con acción específica, conllevando a la resistencia.

- Disminución de la permeabilidad de las membranas celulares: Evitar el pase del producto al interior del patógeno evita su metabolización y por ende su efecto fungicida.

1.6. Mecanismos de antagonismo:

1.6.1. Interacciones ecológicas:

Las comunidades microbianas interactúan entre ellas constantemente, y el resultado de estas relaciones dependen de varios factores tanto bióticos como abióticos, pudiendo ser beneficiosos, perjudiciales o en algunos casos indiferentes para una especie, pudiendo clasificar las interacciones de la siguiente manera⁴⁴:

- Interacciones positivas o benéficas: suelen presentar bastante sinergia, los miembros cooperan y comparten los nutrientes
 - Mutualismo: se benefician ambas especies de la asociación.
 - Comensalismo: se beneficia solamente una especie, mientras que la otra no suele ser afectada.
 - Neutralismo: ambas especies conviven, pero no tiene efecto sobre la otra.
 - Protocooperación: dos especies se benefician de su interacción, pero no esta no es esencial para su supervivencia
- Interacciones negativas o perjudiciales: algunos miembros inhiben o destruyen a otros, se les denomina también como interacciones antagónicas.
 - Depredación: La especie dominante, el depredador, se beneficia de la otra especie o presa que sale perjudicada.
 - Parasitismo: Se da igual que la depredación, solo que el depredador es denominado parásito, su hospedador sale perjudicado.
 - Amensalismo: Una especie secreta sustancias tóxicas que inhiben o aniquilan a la otra especie.

- Competencia: Ambas especies compiten por nutrientes, resultando ambas perjudicadas

1.6.2. Mecanismos antagónicos:

El antagonismo microbiano se basa en la inhibición, deterioro o muerte de una especie de microorganismo o población microbiana por la acción de su similar. Se han reportado un gran número de microorganismos saprófitos de la rizósfera, filósfera y epiflora que protegen a las plantas de la acción de los patógenos, debido a su efecto antagónico.⁴⁵ Asimismo, se han descrito varios mecanismos de acción de estos microorganismos para el control del desarrollo de agentes patógenos, usando en ocasiones más de un mecanismo de acción, reduciendo el riesgo de resistencia. Entre los más conocidos tenemos:

- **Competencia:**

En suelo, se le define como la demanda activa de nutrientes o sustratos para un abastecimiento inmediato por parte de uno o más microorganismos reduciendo la cantidad disponible de estos para los demás. Asimismo, la competencia también puede estar relacionada con la ocupación de sitios potenciales de infección por parte de los agentes de control biológico⁴⁶.

Se basa en el principio de que el patógeno ha de ser privado de nutrientes básicos y necesarios (carbono, nitrógeno y hierro) para su proceso de infección y colonización. Un ejemplo muy conocido es el control biológico de *Fusarium solani*, un hongo fitopatógeno, el cual es el causante de la pudrición de la raíz del frejol y sobrevive mediante un mecanismo de producción de clamidosporas, siendo el carbono y nitrógeno primordiales para su germinación y penetración de estos hongos en el cultivo; por ende, al suministrar celulosa o hacer uso del tamo de trigo o cebada, requiriendo ambos de nitrógeno, inicia una alta demanda por su disponibilidad, teniendo como resultado la desaparición de síntomas de pudrición o contaminación por *F. solani*.

- **Amensalismo:**

En medio de la interacción biológica en suelo, un organismo produce sustancias tóxicas o genera un medio con condiciones intolerables para otras poblaciones de microorganismos retrasando su desarrollo y disminuyendo la actividad metabólica de otros organismos, pudiendo llegar a impedir su crecimiento y desarrollo^{46, 47}. (ver **Tabla 4**).

Tabla N° 4: Metabolitos producidos por diversos organismos antagonistas contra agentes patógenos

Microorganismo Antagonista	Antibiótico Producido	Patógeno Blanco	Enfermedad a Combatir
<i>Pseudomona fluorescens</i> F113	2,4-diacetilfluoroglucinol	<i>Pythium spp.</i>	Marchitamiento
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Agrocin 84	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tumoraciones
<i>Trichoderma virens</i>	Gliotoxina	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición de raíz
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilomycina D	<i>Aspergillus flavus</i>	Contaminación por aflotoxinas
<i>Burkholderia cepacia</i>	Pirrolnitrina, pseudano	<i>R. solani, Pyricularia oryzae</i>	Marchitamiento y manchas en arroz
<i>Pseudomona fluorescens</i> F113	Fenazinas	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Necrosis

Un claro ejemplo es el crecimiento de hongos del genero *Penicillium*, el cual, al producir penicilina, inhibe el crecimiento de bacterias. Otro ejemplo resaltante es la producción de gliotoxinas y viridina por parte de *Trichoderma viride*, metabolitos con propiedades antibióticas frente a ciertos hongos^{47, 48}.

1.7. Control biológico

1.7.1. Antecedentes:

Los inicios del control biológico se remontan a principios del siglo XIX, momento en el cual se reseña el rol de organismos entomófagos en la naturaleza, intentando restaurar un equilibrio ecológico mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos. Sin embargo, es recién a finales del siglo XIX que el control biológico nace como método

científico, cuando en 1988, mediante la introducción de *Rolodia cardinalis* se combatió exitosamente la escama algodonosa de cítricos *Icerya purchasi*, habiendo importado la *Rodolia* desde Australia a los Estados Unidos⁴⁹.

Existen varios conceptos de control biológico, P. DeBach⁵⁰, lo define como la acción de parásitos depredadores o patógenos que mantienen a poblaciones de organismos target a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia. Según Pérez, N.⁵¹ el control biológico es el uso de patógenos, depredadores, parasitoides, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciéndola menos abundante y por ende menos dañina que en ausencia de estos. Esta última, es una definición que incluye a todo organismo con capacidad de regular poblaciones de organismos patógenos a un bajo nivel. Otro concepto de bastante aceptación es: el control biológico es un método agrícola que hace uso de organismos vivos como depredadores, parásitos, herbívoros, e inclusive microorganismos para atenuar o erradicar plagas de insectos, ácaros, malezas y otros patógenos que afectan a cultivos de plantas, este hecho puede ocurrir de forma natural o por manejos del hospedador y/o antagonista.

1.7.2. Microorganismos antagonistas:

Son todos aquellos microorganismos que presentan propiedades antagonistas y un potencial para el control biológico de fitopatógenos; se van asentando como una solución bastante viable para sustituir el uso de productos químicos contra las plagas, teniendo relativo éxito en algunos países europeos, Estados Unidos y Brasil; habiendo gran cantidad de estudios y comercialización de estos productos para controlar enfermedades bióticas en los cultivos, pero una falta de estos en muchos otros países, resultando evidente la necesidad de inversión en la investigación de control de fitopatógenos mediante el uso de microorganismos antagonistas o agentes de control biológico, dando especial relevancia al escalamiento de estas investigaciones para determinar su verdadero potencial en campo, ya que, es allí donde se requieren cantidades considerables de inóculo, además de depender directamente de factores como el pH, la temperatura, condiciones fisicoquímicas del suelo, tiempo de introducción del antagonista en el suelo y el tipo de inóculo a utilizar, pudiendo ser bacterias (células vegetativas o esporulas) o hongos (conidios, micelios o clamidosporas)⁵².

La mayoría de los agentes de control biológico son organismos saprofitos, es decir, aquellos organismos que se alimentan de materia orgánica muerta y también de los residuos procedentes de otros organismos. Esto se debe a que los organismos saprofitos tienen una gran capacidad de adaptabilidad al medio y a la competencia por la obtención de nutrientes frente a otros organismos⁴³.

Son varios los tipos de organismos que tienen la capacidad de convertirse en agentes de control biológico como: protozoos, virus, nematodos, bacterias y hongos. Dentro del grupo de los hongos destaca el género *Trichoderma sp.* el cual ha sido ampliamente estudiado y se utiliza como antagonista de otros hongos fitopatógenos debido a su alta versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación; *Trichoderma sp.* produce de tres tipos de propágulos (hifas, clamidosporas y conidios), los cuales están presentes y tienen actividad antagonista desde la germinación hasta la esporulación. Por otra parte, dentro del grupo de las bacterias resaltan *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus*, por su alta eficiencia para el control de enfermedades foliares y de las raíces. Según Korsten, I.⁽⁵³⁾ las bacterias *Bacillus subtilis*, han sido evaluadas para el control de enfermedades de origen fúngico, determinándose que sus aplicaciones pre y post-cosecha en aguate tuvieron un efecto similar al de los fungicidas comerciales⁵⁴.

1.7.3. Ventajas e inconvenientes:

Ventajas:

- El desarrollo de resistencia al control biológico por parte de alguna plaga es poco común, dejando de lado los controles químicos paulatinamente.
- La relación costo-beneficio es muy favorable, pudiendo llegar a ser un factor económico muy importante en la agricultura.
- Suele ser un tratamiento a largo plazo, pero permanente.
- No se reportan efectos colaterales nocivos de los organismos usados hacia otros incluido el hombre, no existiendo reportes de intoxicación.

Inconvenientes:

- Es necesario un amplio planteamiento del problema para el manejo adecuado de éste, requiriendo un mayor seguimiento y control.
- El éxito deseado requiere gran conocimiento de la biología de los organismos implicados (agente patógeno y agente remediador).
- Los organismos utilizados para el control biológico suelen presentar alta selectividad sobre los organismos sobre los que actúan, siendo este un problema en casos donde la severidad y complejidad de la plaga sea muy elevada.
- Tienen menor eficiencia y eficacia que los controles químicos a corto plazo.

Beneficios:

- En términos económicos, está calculado un retorno aproximado por dólar invertido en una relación de 30:1 a comparación de la relación 5:1 para el control químico.

Limitaciones:

- Falta de personal especializado.
- Falta de apoyo económico para su implementación.

1.7.4. Consideraciones:

El control de enfermedades por medio de estrategias biológicas se basa en⁴³:

- Estimulación de la planta para generar resistencia, al operar de forma primaria en el tejido del hospedador y generar protección cruzada.
- Reducción del metabolismo del patógeno, afectando su actividad y reproducción.
- Protección de las raíces, frutos, hojas y semillas de la planta a la infección por el patógeno, esta protección puede extenderse a las heridas que pueda presentar.

Para el planeamiento y conducción de nuevos programas de control biológico, los organismos utilizados o enemigos naturales, deben de presentar ciertos atributos para tener una alta eficiencia siendo estos:

- Adaptabilidad a los cambios climáticos y físicos del medio.
- Gran capacidad de búsqueda, especialmente en entornos de baja densidad poblacional.
- Capacidad de sobrevivir en los periodos en los que el organismo patógeno esté ausente.

1.7.5. Alcance y futuro del control biológico:

Actualmente, el método más usado para el manejo de plagas viene siendo el control químico, pero debido a los problemas de contaminación y su impacto negativo a la biodiversidad, han conducido y fomentado el estudio, desarrollo y aplicación de alternativas más ecológicas como: la solarización, rotación de cultivos, utilización de plantas con propiedades antagonistas, la incorporación de materia orgánica al suelo con el fin de favorecer la actividad antagonista de la biota ya presente en el suelo, la aplicación de cubiertas epidermales o antitranspirantes la fitomineraloterapia y también la aplicación de microorganismos antagonistas⁵².

Las investigaciones al día de hoy permiten manejar exitosamente programas de control biológico como parte del manejo de plagas, existiendo una tendencia a su aumento debido a los severos problemas de incremento de resistencia de organismos patógenos a los insecticidas, contaminación ambiental y la emisión de leyes o normativas que van prohibiendo el uso y comercialización de algunos productos químicos biocidas.

En países en vías de desarrollo, el costo de plaguicidas es bastante elevado y también se vuelve recurrente la resistencia por parte de las plagas a estos; es por ello que, el control biológico constituye en Latinoamérica y otros países tercermundistas un método para el control de plagas más viable, recomendable y con un potencial aún no explotado⁴⁹.

1.8. Bacillus como controlador biológico:

1.8.1. El género Bacillus:

Las bacterias del grupo *Bacillus* han cumplido un rol principal en el desarrollo de la microbiología al ser una de las primeras en ser descritas, perteneciente a la familia Bacillaceae, y con más de 60 especies, es considerada dentro de las Gram positivas por la estructura de su pared celular, con forma bacilar y movilidad por la acción de flagelos peritricos, aerobios estrictos y con un tamaño entre 0,5 – 2,5 a 1,2 – 10 μm (ver Figura 6). La diferencia entre sus especies se centra en la fermentación de diferentes azúcares como: lactosa, sorbitol y manitol, así como hidrólisis de urea y descarboxilación de lisina⁵⁵.



Figura N° 6: Imagen microscópica de Bacillus spp. observándose su forma de bacilo.

Es uno de los principales microorganismos aislados del suelo con un papel determinante en el ciclo del carbono y nitrógeno, y que a pesar de las condiciones extremas de este hábitat, puede desarrollarse de manera ideal por la formación de endosporas, que la hacen resistente a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos añadiendo el potencial de algunas especies, *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis*, como antagonistas celulares contra fitopatógenos^{55, 56}.

1.8.2. Mecanismo de acción antagónico:

La actividad antagonista de *Bacillus spp.* contra los patógenos presentes en ciertos cultivos, es atribuida a la antibiosis, la competencia por los nutrientes y el espacio, el hiperparasitismo y la resistencia sistemática inducida a las enfermedades.

La antibiosis es el mecanismo de la mayoría de los *Bacillus spp.*, y en muchos casos, es el más preciso de la actividad de biocontrol, además que la capacidad de producir

endosporas y varios antibióticos (mediante diferentes mecanismos de biosíntesis muy complejos) permiten un amplio espectro de actividad sobre bacterias, hongos y virus patógenos en las plantas, haciéndolo un candidato atractivo para la formulación y comercialización de muchos productos destinados al área de control de plagas^{57, 58}.

Fira y col.⁵⁷ midieron la cinética de producción de sustancias antimicrobianas en estas bacterias, encontrando en su mayoría, la síntesis de estos compuestos en la fase de crecimiento exponencial alcanzando el máximo de actividad antimicrobiana durante la fase de crecimiento estacionario. Banerjee y col.⁵⁹ por su parte, realizaron una investigación con el objetivo de estudiar los efectos beneficios de *Bacillus cereus* IB311 en la producción de cultivos agrícolas y la optimización de biomasa a través del uso de la metodología de superficie de respuesta, la cual cumplió con el objetivo de optimización además de reducir el costo de producción. Esto mostró un impacto seguro, rentable y positivo para el campo agrícola. Estos datos permitieron abrir nuevas investigaciones para demostrar el efecto antagonico sobre organismos fitopatógenos de importancia en la agricultura.

1.8.3. *Bacillus* spp como controlador biológico:

El conjunto de reacciones metabólicas, bioquímicas, mecánicas y/o físicas que se desarrollan de manera natural, en conjunto o individualmente, y que desencadenan la inhibición de diferentes microorganismos patógenos constituyen la acción biocontroladora del *Bacillus* spp.⁶⁰, el cual ha sido demostrado a través de diferentes artículos de investigación.

Rojas y col.⁶¹ determinaron en su investigación el efecto antagonista de 14 cepas aisladas de *Bacillus* frente a dos hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium moniliforme*, los cuales afectan cultivos hortícolas. La actividad antagonista se evaluó durante siete y quince días de cultivo, obteniendo una inhibición del 80% frente a *F. oxysporum* gracias a la acción de nueve cepas, contrario al 50% de inhibición de solo dos cepas de *Bacillus* frente a *F. moniliforme*. De esta manera, la actividad antagonista fue probada de manera exitosa abriendo nuevas investigaciones hacia la selección de cepas eficientes de *Bacillus* como un controlador biológico en el género *Fusarium*.

Song y col.⁶² evaluaron por su parte, el desarrollo de un sistema de biocontrol para la pudrición de la raíz de ginseng causada por otra especie de *Fusarium*. Para esta investigación se aisló 392 bacterias de raíces de ginseng de varios suelos para poder

determinar la actividad antifúngica, seleccionando una sola cepa por su fuerte actividad antagonista sobre una suspensión de células bacterianas y un filtrado de cultivo contra el patógeno. A través de una microscopía electrónica de barrido, se pudo observar que las hifas patógenas fueron retorcidas y arrugadas por el tratamiento bacteriano, concluyendo que el aislado bacteriano actuaba como un potente agente antimicrobiano.

Los fitopatógenos del género *Fusarium*, causan marchitamiento en los tomates provocando grandes pérdidas a los agricultores, ya que, la falla del xilema por el crecimiento de microconidias intercelularmente bloquea el requerimiento de agua en la planta culminando en una muerte inevitable. Ante este problema, Fadeke y col.⁶³ dilucidaron las capacidades de biocontrol de cuatro cepas de *Bacillus* spp. tomando en cuenta la zona de inhibición, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como el porcentaje de control de enfermedad e incidencia de la misma, para hacer uso de estas habilidades en futuras intervenciones de controles biológicos (ver Figura 6). Los resultados fueron positivos al observarse que los diversos tratamientos no solo redujeron la incidencia de enfermedades, también fueron efectivos en el crecimiento de la planta.

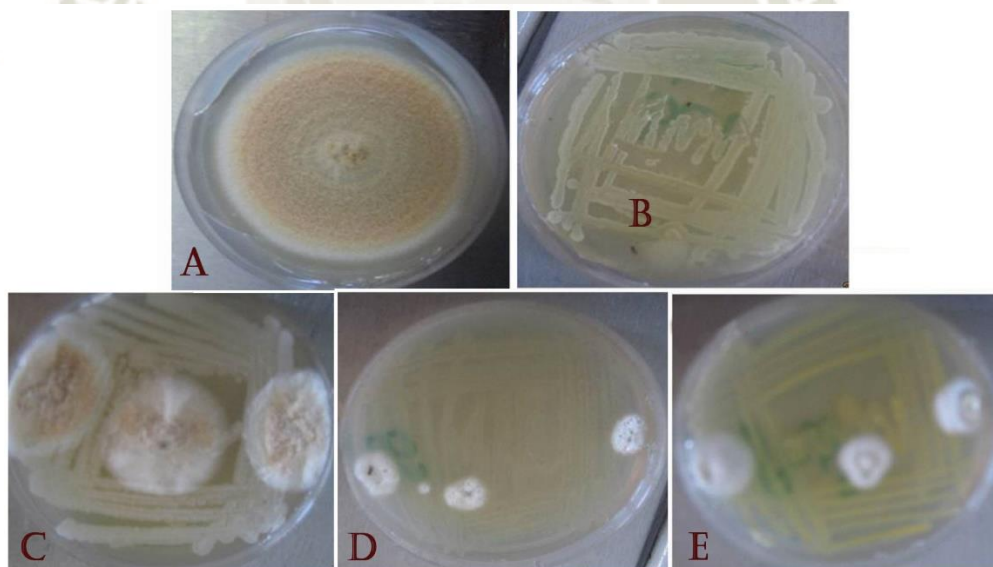


Figura N° 7: Efecto inhibitorio de cuatro cepas de *Bacillus* spp. contra *F. solani*. (A) Cultivo de *F. solani* ras 10 días, (B) doble cultivo de *F. solani* con *Bacillus* A, (C) doble cultivo de *F. solani* con *Bacillus* C, (D) doble cultivo de *F. solani* con *Bacillus* S, (E) doble cultivo de *F. solani* con *Bacillus* P.⁶³

Otro cultivo que es afectado por este patógeno al causarle podredumbre basal, es la cebolla. Manimaran y col.⁶⁴ analizaron diferentes especies de *Bacillus* para determinar el efecto antagonista de la misma sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae (Hans.), esto se debe a que los sistemas de gestión con controles biológicos son potencialmente sostenibles. Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* y *B. subtilis* mostraron una longitud mínima de raíz de 11.9 cm en comparación con las plantas inoculadas sólo con *F. oxysporum* y sólo *B. subtilis* que obtuvieron 7.3 cm y 13.5 cm respectivamente. La combinación del patógeno y el agente de biocontrol mostraron una mayor longitud de la hoja y la raíz. La investigación concluyó con el efecto positivo de la cepa de *Bacillus subtilis* al inhibir el crecimiento micelial del patógeno en el cultivo además de disminuir la incidencia de la enfermedad en plantas de macetas utilizando diferentes concentraciones de filtrado del cultivo.

En comparación con Jagtap y Suryawanshi⁶⁵ quienes evaluaron la capacidad de los agentes de biocontrol como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *Curvularia lunata*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Xanthomonas axonopodis*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* contra *Fusarium oxysporum*. Todos estos agentes de biocontrol mostraron una reducción significativa en el crecimiento de los patógenos, sin embargo, *Trichoderma viride* tuvo un valor más fructífero (78.88) de reducción del crecimiento radial; mediante la técnica de doble cultivo *in vitro*.

Por otro lado, Sultana N. y Ghaffar A.⁶⁶ utilizaron diferentes fungicidas, antagonistas microbianos y tortas oleaginosas *in vitro* e *in vivo* para controlar *Fusarium oxysporum*, quién causaba la pudrición de las semillas, las plántulas e infección de la raíz de la calabaza y el pepino. El tratamiento fungicida de las semillas de calabaza y pepino infestadas artificialmente con *F. oxysporum* redujo significativamente la mortalidad de las plántulas y la infección de las raíces, dentro del grupo de antagonistas microbianos se utilizó *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Gliocladium virens*, *Bacillus subtilis* y *Stachybotrys atra*, los cuales redujeron significativamente la mortalidad de las plántulas y la infección por pudrición de la raíz de *F. oxysporum* en la calabaza y el pepino *in vitro* e *in vivo*. Esta investigación abrió nuevas posibilidades con el *T. harzianum* por ser el más eficaz para reducir la mortalidad de las plántulas y la infección de las raíces en el pepino y la calabaza de botella.

Capítulo II: Materiales y Métodos

2.1. Ambientes de Ejecución

Laboratorios de la Universidad Católica de Santa María pabellón H.

2.2. Muestras Biológicas

- Bulbos de cebolla (*Allium cepa*) con su rizófora integra sanos y deteriorados microbiológicamente.
- Tierra recolectada del entorno de las muestras vegetales obtenidas.

2.3. Materiales

2.3.1. Equipos

- Incubadora MERMMET
- Cocinilla eléctrica MERMMET
- Autoclave HANCHEN 18 L
- Cámara de flujo laminar PURAIR HLF
- Balanza analítica BONVOISINA 0.001 g
- Microscopio óptico BRESSER RESEARCHER TRINO 40 -1000X
- Centrífuga 5702 HR
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis
- Termociclador BIORAD iCycler

2.3.2. Materiales

- Botellas para autoclavado 1 L (3)
- Placas Petri (30)
- Tubos de ensayo (8)
- Tubos Falcon estériles

- Matraces 200 mL (3)
- Mechero bunsen
- Micropipeta 20 y 200 uL
- Tubos eppendorf

2.3.3. Reactivos

- Etanol al 70% BAKER
- Agua destilada
- Hipoclorito de Sodio al 7% CLOROX
- Agar nutritivo HIMEDIA
- Agar Sabouraud HIMEDIA
- Cloruro de Sodio
- Cloranfenicol 500 mg
- Azul de lactofenol HYCEL
- Buffer TAE 1X ph7,4
- Agarosa grado biología molecular
- SYBR® Safe 10000x
- Fenol – cloroformo MERK
- Agua ultrapura
- Alcohol isopropílico MERK

2.4. Métodos

2.4.1. Obtención de las muestras

Las muestras de tierra fueron recolectadas de un terreno cultivado con cebolla blanca cercano al lateral 9, ubicado en la irrigación de Santa Rita de Siguan – Arequipa durante el periodo de Agosto – Diciembre del año 2019 (**Figura 8**).



Figura N° 8: Ubicación del terreno de cultivo para cebolla, Fuente: Imágenes © 2020 CNES / Airbus, Maxar Technologies

El terreno se dividió en 10 secciones de igual tamaño. Dentro de cada sección se recolectó en total 200 gramos de tierra; 100 gramos provenientes de la rizósfera de una planta que presentaba la sintomatología clásica de la fusariosis y 100 gramos de una planta en buen estado, en ambos casos también se recolectó el bulbo y sus raíces. Las muestras recolectadas fueron almacenadas por separado en bolsas Zip – lock.

2.4.2. Pretratamiento de las muestras

Los dos kilogramos de tierra obtenidos del campo fueron tratados por separado pero de la misma manera. Cada muestra fue colocada al sol durante 15 minutos en una bandeja para eliminar el exceso de humedad y obtener tierra seca (**Anexo 1**).

Una vez la tierra se encontraba libre de humedad, esta fue cernida para poder eliminar piedras y demás partículas de mayor tamaño al deseado. Posteriormente se utilizó el método de cruz (**ver Anexo 2**), recolectando 2.5 gramos de cada sección, obteniéndose así 10 gramos de tierra que fueron almacenados en tubos Falcon estériles.

La muestra recolectada de las secciones en mal estado fueron destinadas a la obtención del patógeno perteneciente al género *Fusarium*.

La muestra recolectada de las secciones en buen estado fueron destinadas a la obtención de las bacterias del género *Bacillus*.

2.4.3. Tratamiento y sembrado de las muestras

- ***Para obtención de Bacillus sp.***

En un matraz con 90 mL de una solución estéril de Cloruro de Sodio al 0.8% y 2 gotas de Tween 80 se agregaron 10 gramos de tierra proveniente de la rizósfera de las plantas que no presentaban síntomas de la enfermedad y se agitó hasta que la mezcla sea totalmente homogénea (**ver Anexo 3**). El matraz fue colocado en baño maría durante 15 minutos en un rango de 70° a 75°C, siendo agitado constantemente. Transcurrido el tiempo se realizaron 2 diluciones en tubos de ensayo utilizando una muestra de 1 mL del matraz en 9 mL de solución estéril al 0.8% de Cloruro de Sodio; la segunda dilución fue utilizada para el sembrado en agar nutritivo.

Una vez las placas fueron sembradas, se les llevo a la incubadora a una temperatura de 28°C.

- ***Para obtención de Fusarium sp.***

En un matraz con 90 mL de una solución de Hipoclorito de sodio al 1% y 2 gotas de Tween 80 se agregaron 10 gramos de tierra proveniente de las plantas en mal estado. Tras homogenizar durante 1 minuto se realizaron 2 diluciones en tubos de ensayo utilizando una muestra de 1 mL del matraz en 9 mL de agua pura; la segunda dilución fue utilizada para el sembrado en medio Sabouraud.

Las raíces provenientes de las cebollas en mal estado fueron cortadas en secciones de 1 cm aproximadamente y sometidas a lavado en una solución al 1% de Hipoclorito de sodio durante 5 minutos, posteriormente fueron enjuagadas con agua estéril 3 veces. Posteriormente se realizó un lavado con Etanol al 70% y de igual manera se les enjuago 3 veces con agua estéril. Las raíces fueron colocadas en la cámara de flujo laminar hasta que el excedente de

agua se evapore por completo. Posteriormente los cortes fueron sembrados de manera simétrica en agar Sabouraud + cloranfenicol al 0.5% a razón de 7 cortes por placa como se observa en la **Figura 9**.

Una vez las placas fueron sembradas, se les llevo a la incubadora a una temperatura de 28°C.

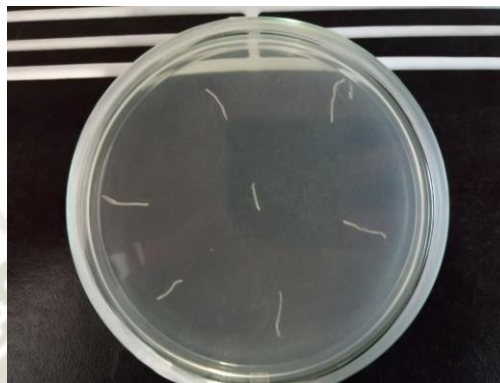


Figura N° 9: Siembra de las raíces en agar Sabouraud

2.4.4. Aislamiento de microorganismos

- En el caso de los patógenos se procedió a repicar el micelio crecido a partir de los trozos de raíz sembrados en agar Sabouraud. Para tal fin, utilizando un bisturí se realizaron cortes de aproximadamente 4x4mm del micelio y este fue sembrado en otra placa de agar Sabouraud.
- Para el caso de los microorganismos benéficos se procedió a repicar las colonias morfológicamente características del genero *Bacillus* (blanquecinas perladas, planas y de aspecto opaco, con bordes asimétricos)

2.4.5. Identificación de los microorganismos

- **Observación macroscópica**

Aislados los diferentes microorganismos en placas por separado (un solo tipo de microorganismo por placa) se procedió a escoger aquellos que bajo observación directa coincidían con la descripción clásica de los microorganismos de interés (hongos del genero *Fusarium* y bacterias del genero *Bacillus*)

- ***Observación al fresco con azul de lactofenol (para el caso de los hongos)***

Una vez las cepas fungales se encontraban desarrolladas en toda la placa, utilizando una cinta adhesiva se procedió a tocar delicadamente la parte superior del micelio, y esta se colocó sobre una gota de azul de lactofenol contenida en una lámina porta objetos, se retiró la cinta y se colocó un cubreobjetos. El proceso se repitió para cada cepa obtenida.

- ***Tinción Gram (para el caso de las bacterias)***

Una vez las colonias obtenidas se encontraban bien diferenciadas, se les realizó la tinción de Gram, para tal fin en una lámina cubreobjetos se colocó una gota de agua ultrapura y con el asa de cole se tomó una pequeña muestra de una de las colonias de interés, esta muestra fue esparcida sobre la gota de agua en la lámina y fijada al calor con un mechero. Posteriormente se aplicó el cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina en el orden y durante el tiempo que sugiere el método.

2.4.6. Reactivación de las cepas aisladas

Tras completar los aislamientos se procedió a reactivar las cepas bacterianas aisladas, para lo cual se prepararon matraces de 500 mL cada uno, los cuales contenían 20 gramos de tierra, 200 mL de una solución al 0.8% de Cloruro de sodio y 1.4 gramos de medio nutritivo, cada uno de estos matraces fue autoclavado a 121°C y 1.3 kP durante 30 minutos. Una vez retirados del autoclave y su temperatura reducida hasta aproximadamente los 30°C, a cada uno de los matraces se les agregó una placa entera cortada con una hoja de bisturí que contenía *Fusarium sp* y adicionalmente 40 mL de medio nutritivo previamente inoculado con *Bacillus sp* durante 24 horas. Los matraces fueron incubados a 28°C durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo se repitió el aislamiento de las cepas bacterianas, para lo cual se tomó 1ml de muestra de cada uno de los matraces, y cada una de estas muestras fue diluida en 10ml de una solución al 0.8% de Cloruro de sodio contenida en tubos de ensayo, estas diluciones fueron sometidas a baño María durante 15 minutos a 70°C. Posteriormente se tomó 100 uL de cada uno de los tubos y fueron sembrados en placas de agar nutritivo por separado.

2.4.7. Pruebas de enfrentamiento

Una vez aisladas e identificadas las distintas cepas benéficas, se realizaron las pruebas contra los hongos patógenos aislados, para lo cual se ejecutaron pruebas de enfrentamiento dual y por sobreposición, ambas pruebas en agar nutritivo y Sabouraud por separado y por triplicado. Cada una de las cepas del genero bacillus fueron enfrentadas a cada uno de los hongos patógenos aislados.

En este punto de la investigación se habían logrado seleccionar 2 hongos fitopatógenos (F.A y F.B) 3 microorganismos presuntamente benéficos (B1, B2 y B3), por lo cual se diseñaron los enfrentamientos como se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla N° 5: Distribución de los hongos fitopatógenos contra cada una de las cepas de *Bacillus* aisladas.

<i>Fusarium A vs. Bacillus</i> 1	<i>Fusarium A vs. Bacillus</i> 2	<i>Fusarium A vs. Bacillus</i> 3
<i>Fusarium B vs. Bacillus</i> 1	<i>Fusarium B vs. Bacillus</i> 2	<i>Fusarium B vs. Bacillus</i> 3

Se prepararon 50ml de medio nutritivo para cada una de las cepas bacterianas, una vez inoculados los medios estos fueron colocados en un shaker a 130rpm durante 30 horas a temperatura ambiente, logrando concentraciones de 6×10^8 en el caso de “*Bacillus 1*”, y de 1×10^8 para “*Bacillus 2 y 3*”.

- **Sobreposición**

A partir de una placa pura del patógeno aislado utilizando un bisturí se realizaron cortes de aproximadamente 4x4mm de micelio colocando 1 corte en el centro de una placa con agar Sabouraud. Utilizando un hisopo estéril se sembró sobre toda la superficie el microorganismo benéfico el cual se encontraba en el medio nutritivo líquido previamente inoculado. Se hicieron las repeticiones necesarias de modo que cada microorganismo presuntamente benéfico sea enfrentado a cada uno de los patógenos aislados. A la par se sembró un corte de micelio sin presencia de bacterias, a modo de control para comparar el porcentaje de crecimiento del hongo. Las placas fueron incubadas a 28°C y evaluadas cada 24 horas durante 3 días.

- ***Enfrentamiento dual***

A partir de una placa pura del patógeno aislado utilizando un bisturí se realizaron cortes de aproximadamente 4x4 mm de micelio y a razón de 1 corte por placa fueron colocados en el extremo de una placa con agar Sabouraud.

En el otro extremo de las placas se sembraron los diferentes microorganismos presuntamente benéficos utilizando un hisopo estéril a partir del medio líquido previamente inoculado. Se realizaron las repeticiones necesarias de modo que cada microorganismo presuntamente benéfico sea enfrentado a cada uno de los patógenos aislados. A la par se sembró un corte de micelio sin presencia de bacterias, a modo de control para comparar el porcentaje de crecimiento del hongo. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 72 horas hasta que se pudo observar el contacto o inhibición de un microorganismo por acción del otro.

- ***Difusión de metabolitos en agar***

En placas de agar Sabouraud se colocó un corte de aproximadamente 4x4mm del hongo patógeno aislado y a su alrededor con la ayuda de un tip para micropipeta de 1000 µL, se realizaron 3 horadaciones de 5 mm de diámetro c/u.

Previamente se prepararon 100 mL de medio nutritivo para cada uno de las cepas bacterianas aisladas, estas fueron inoculadas en el medio y colocadas en agitación a 130 rpm durante 36 horas a temperatura ambiente. Una vez el medio nutritivo se encontraba a una concentración aproximada de 1×10^9 , se anexaron jeringas de 5 mL a filtros CHROMAFIL® XTRA (**Anexo 4**) con una porosidad de 0.2 µm y se tomaron muestras de los inóculos obteniéndose un líquido transparente, sin presencia de microorganismos, a cada uno de los pocillos en la placa de agar Sabouraud se agregaron 100 µl de cada una de estas muestras. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 25°C durante 96 horas.

2.4.8. Evaluación de la durabilidad de los metabolitos respecto a fungicidas sintéticos comerciales

Tras evaluar los metabolitos bacterianos respecto a las diferentes cepas fúngicas aisladas, se procedió a comprar la persistencia de estos respecto a 3 diferentes fungicidas sintéticos más usados por el sector agrícola, los cuales fueron: Homai, T-Rex y Botrimex. En placas de agar Sabouraud se colocó un corte de aproximadamente 4x4 mm del hongo patógeno aislado y a su alrededor con la ayuda de un tip para micropipeta de 1000 μ L, se perforaron en el agar 5 pocillos de 5mm de diámetro c/u (**Figura 10**). En cada pocillo se colocaron 100 μ l de fungicida sintético y adicionalmente se colocó agua como control negativo (p2) y filtrado de medio líquido proveniente de la cepa con mayor actividad antagonista (p5) tras la prueba de “difusión de metabolitos en agar”. Previamente se prepararon los fungicidas en la concentración sugerida por el fabricante (**ver Anexo 5**) como se muestra también en la **Tabla 6**.

Tabla N° 6: Preparación de los distintos fungicidas según especificación del fabricante.

Fungicida	Preparación recomendada para campo	Dilución equivalente para ensayo
Homai (p3) (Metil Tiofanato)	70g x cilindro 100L (por hectárea)	0.7g/L
T-Rex (p4) (Hymexazol)	500ml x cilindro 200L (por hectárea)	2.5ml/L
Botrimax (p1) (Carbendazim)	500ml x cilindro 200L (por hectárea)	2.5ml/L

Debido a que se busca evaluar la persistencia de los metabolitos a través del tiempo, las placas no fueron llevadas a incubadora, fueron colocadas a temperatura ambiente para evitar de esta forma acelerar el crecimiento miceliar del hongo fitopatógeno.

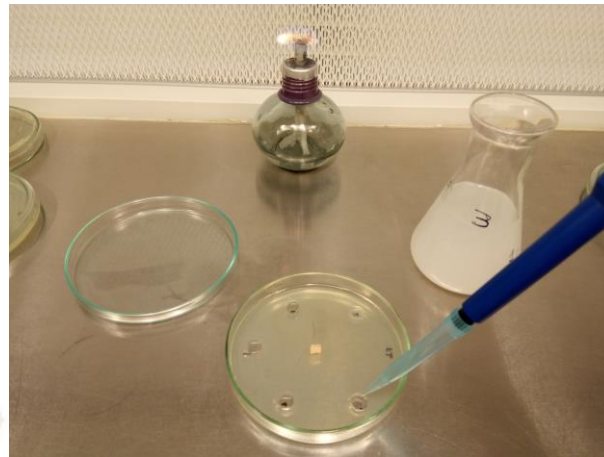


Figura N° 10: Sembrado de fungicidas en placa de agar Sabouraud con micelio sembrado en la parte central.

2.4.9. Identificación molecular de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista.

Tras determinarse la cepa que presentaba la mayor actividad antagonista, esta fue seleccionada para realizar su identificación molecular.

- ***Extracción de ADN***

En un tubo eppendorf estéril se cargó 500 μL de agua ultrapura, a continuación se tomó una pequeña muestra de la bacteria con un tip, esta fue colocado en el eppendorf y homogenizado hasta que las bacterias se desprendan del tip.

Se agregó un equivalente de 100 μL de microperlas de vidrio y el tubo fue llevado a un chancador para que las perlas puedan destruir las paredes celulares de los microorganismos.

Este proceso se repitió 3 veces en periodos de 1 minuto cada uno observando la integridad física del tubo eppendorf.

Se recuperó la fase acuosa en otro tubo y se aplicó un aproximado de 1.5 a 2 volúmenes de fenol cloroformo; se llevó a vórtex hasta observar una mezcla de aspecto lechosa y se centrifugo a 10k rpm durante 10 minutos hasta separar las fases.

La fase superior se recuperó cuidadosamente en otro tubo eppendorf, se mezcló con 1.5 a 2 volúmenes de alcohol isopropílico frío, se agito y se llevó al congelador (-20°C) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se llevó el tubo a centrifuga a 10k rpm x 10 minutos, una vez precipitado el ADN, se retiró el Isopropanol y se agregó etanol al 70%, se centrifugo durante 2 minutos, se eliminó el etanol y se colocó el tubo en un termoblock para que los residuos de etanol se evaporen, posteriormente se resuspendió el ADN en 100 µL de agua ultrapura.

- ***Análisis electroforético de la muestra***

En un matraz con 10 mL de buffer TAE se agregó 0.15 g de agarosa grado biología molecular y este fue llevado al microondas hasta hacerlo ebulir 3 veces, agitando entre cada una de estas hasta que no se observaron cristales de agarosa. Una vez que enfrió un poco se agregó 0.5 µL de **SYBR® Safe 10000x** homogenizando con delicadeza; utilizando un molde se vertió el contenido y se dejó en reposo hasta que solidificó.

En una tira de parafilm se colocaron 3 uL de loading Buffer 10x y se resuspendió con 5 µL del ADN previamente obtenido, la mezcla de estos componentes fue sembrada en el gel de agarosa sumergido en buffer TAE; la muestra fue corrida durante 10 minutos a 110 v y 300 mA. **Ver anexo 6.**

- ***Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Para la amplificación del gen ARNr 16S se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para tal fin se utilizaron los primers: **F27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3** y **R149 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3**, ambos primers son universales para la amplificación del gen 16s. La PCR fue diseñada bajo los siguientes parámetros: Un ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos, el cual consistía en desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos como se muestra en la **Figura 11**. Finalmente, para secuenciar la región de interés, el producto de PCR fue purificado utilizando el

kit Qiagen PCR purification, siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente secuenciados usando la técnica de Sanger y leídos en un equipo ABI 3730x1.

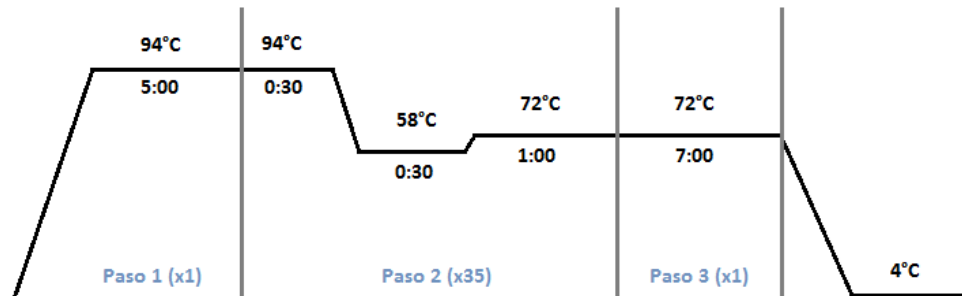


Figura N° 11: Parámetros del programa para la amplificación del gen 16s.

2.4.10. Elaboración de cepario en caldo glicerol

Se preparó 100 mL de caldo nutritivo, el cual una vez autoclavado, fue inoculado con una muestra tomada directamente de la placa Petri, el matraz fue colocado en un shaker a 120rpm y temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este periodo, los 100ml de medio fueron mezclados con una solución de glicerol al 40% previamente esterilizada; los 200ml finales fueron llevados a un shaker a 120 rpm durante 2 horas. Posteriormente el contenido del matraz fue vertido en tubos falcon de 50 mL y preservados a una temperatura de -20°C .

2.4.11. Elaboración de medios de producción, cinética bacteriana y viabilidad

- *Elaboración de los medios de producción.*

Se prepararon 150 mL de cada uno de los medios de producción planteados. Estos se elaboraron en las siguientes concentraciones como se muestra la **Tabla 7**:

Tabla N° 7: Porcentajes de nutrientes para la preparación de los diferentes medios.

Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
Azúcar 1%	Azúcar 1.5%	Azúcar 2%	Azúcar 2.5%
	Fosfato monoamónico 2%		
	Sal común (NaCl) 1%		
	Aminoácidos agrícolas 0.5%		

Una vez esterilizados, cada uno de los medios fue inoculado con 1 mL de pre inoculo a una concentración de 6×10^8 cel/ml, los matraces fueron colocados en un shaker a 120 rpm Se evaluó la cinética microbiana de cada uno de los medios durante un plazo de 58 horas, también se tomó registro del pH inicial y final, sin añadir ninguna solución durante el proceso de evaluación, los medios se mantuvieron en agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez que los microorganismos entraron a fase estacionaria, se procedió a formular los medios con carboximetil celulosa, a una concentración final al 0.2%.

Capítulo III: Resultados y Discusión

3.1. Identificación de los microorganismos

3.1.1. Observación macroscópica de cepas bacterianas

Tras realizar el tratamiento térmico mencionado en el punto 2.4.3 y los repiques necesarios se lograron aislar colonias de entre 2 a 4 mm de diámetro, de color blanco ligeramente perlado, bordes irregulares y superficie rugosa (**Figura 12**). Estas características son muy similares a las descritas para el género *Bacillus subtilis* según autores como Logan ⁶⁷ el cual logro aislar estos microorganismos no solo de muestras provenientes de campos de cultivo o campos con vegetación silvestre, también en aguas frescas y estancadas.

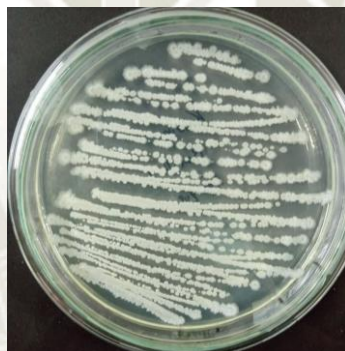


Figura N° 10: Colonias aisladas a partir de la rizósfera de cebollas en buen estado, ligeramente perladas de 2 a 4mm.

Para poder diferenciar a detalle la textura de estas colonias se procedió a realizar un sembrado en la zona central de la placa Petri, los cuales fueron observadas tras una incubación a 28°C durante 72 horas.

Fruto de este procedimiento se obtuvieron 3 cepas con velocidades de crecimiento similar al reportado por Logan ⁶⁷ que a su vez presentaban diferencias evidentes sobre todo en los bordes de las colonias, de las cuales en la placa 1 (**figura 13A**) se observaban bordes irregulares con formas “orbiculares”, la superficie tenía un aspecto seco y rugoso.

La cepa 2 (**figura 13B**) presentaba características muy similares tanto en color como la textura de la superficie, la única diferencia se observaba en los bordes, estos poseían terminaciones “lineares”.

La cepa 3 (**figura 13C**) era la más oscura, presentando un color totalmente perla, la superficie presentaba un aspecto más húmedo y los bordes irregulares no tenían ningún tipo de terminación particular.

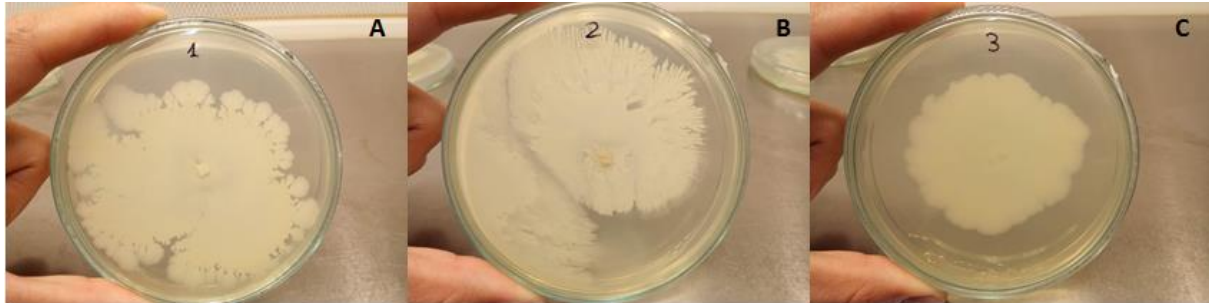


Figura N° 13: Diferencias macroscópicas visibles en los bordes de las colonias aisladas. 13A crecimiento con bordes orbiculares de aspecto seco, 13B crecimiento de bordes lineares de aspecto seco, 13C bordes irregulares de aspecto ligeramente húmedo.

Diversos autores reportaron que en la fase inicial de aislamiento del género *Bacillus*, las colonias, independientemente de la forma o distribución que tengan, mostraban aspectos diferentes, los cuales eran liso, rugoso o mucoso lo cual daba la impresión de haber aislado más de un microorganismo, solamente tras realizar pruebas bioquímicas y en algunos casos pruebas moleculares se pudo determinar que efectivamente se trataban de *Bacillus sp.* y no de cultivos mixtos.

3.1.2. Observación microscópica de cepas bacterianas mediante Tinción Gram

Las 3 cepas seleccionadas fueron observadas en un microscopio óptico a un aumento de 100x. Respecto a la muestra 1 (**figura 14A**) se observaron bacilos Gram positivos con bordes redondeados sin la presencia de esporas. En la muestra 2 (**figura 14B**) también se observaron bacilos Gram positivos, pero de un menor tamaño, muchos de ellos agrupados en parejas unidos por el extremo con bordes redondeados sin presencia de esporas. A diferencia de las muestras anteriores, la cepa 3 (**figura 14C**) eran bacilos pequeños Gram negativos sin presencia de esporas.

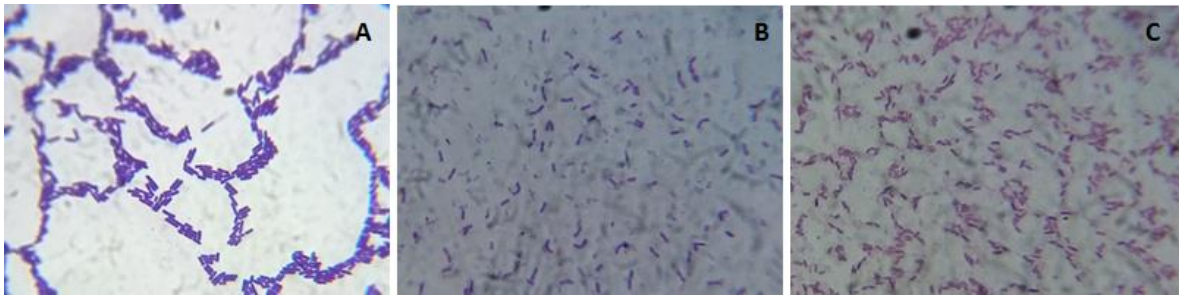


Figura N° 14: De izquierda a derecha, cepa aisladas 1, 2 y 3 a 100x de aumento en microscopio óptico tras realizarles tinción Gram.

Debido a que se tratan de cepas aisladas a partir de suelo agrícola era de esperarse la presencia del género *Bacillus sp.* como es el caso de la cepa 1 y 2, sin embargo la cepa 3 exhibía un color purpura claro dando la impresión de ser un microorganismo Gram negativo por lo cual podría tratarse de *Pseudomonas* o *Alcaligenes*, sin embargo no se observó la presencia de flagelos; Koneman (2001)⁶⁸ determinó que el género *Bacillus* posee un amplio rango de tamaños, los cuales varían desde 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm sin influir necesariamente la proveniencia de estos, por lo cual no se pudo utilizar el tamaño de los microorganismos observados al microscopio para determinar con precisión a que género pertenecía la cepa C, sin embargo se decidió continuar investigándola debido a la resistencia mostrada al tratamiento térmico y a la procedencia del tipo de suelo⁶⁷ de donde se obtuvo la muestra para su posterior aislamiento.

3.1.3. Observación macroscópica de cepas fúngicas.

Respecto a las cepas fúngicas encontradas en las muestras de suelo provenientes de áreas que mostraban cebollas enfermas, se hallaron diversos tipos de hongos de color verde y grises, probablemente pertenecientes al género *Trichoderma* y *Penicillium* comúnmente hallados en suelos agrícolas, pero fueron descartados por no ser considerados como fitopatógenos. Posteriormente haciendo uso de claves de identificación dicotómica, se pudo seleccionar dos colonias algodonosas planas y estrelladas de color blanco perlado, en ambos casos se controló la velocidad de crecimiento a partir de un corte de micelio de 2x2 mm a 28°C de temperatura.

Como se observa en la **Figura 15**, la cepa rotulada como “F.a” presento un crecimiento de 11mm de diámetro al cabo de 24 horas, pero al duplicarse este periodo de incubación logró alcanzar los 27 mm, y al completar las 72 horas alcanzo un diámetro de 36 mm aproximadamente.

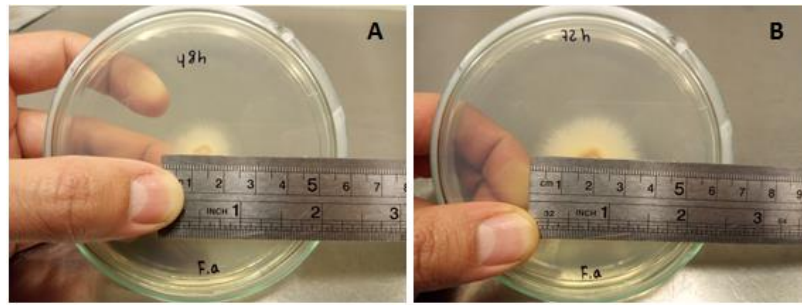


Figura N° 15: Medición del crecimiento micelar en la cepa F.a. 15A crecimiento medido a las 48h del sembrado, 15B crecimiento medido a las 72 horas del sembrado.

La cepa rotulada como “F.b” presento un crecimiento de 10mm de diámetro al cabo de 24 horas, pero al duplicarse este periodo de incubación logró alcanzar los 23 mm, y al completar las 72 horas alcanzo un diámetro de 33 mm aproximadamente (**Figura 16**).

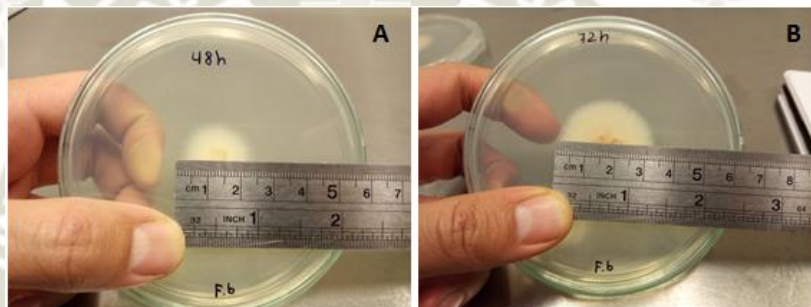


Figura N° 16: Medición del crecimiento micelar en la cepa F.b. 16A crecimiento medido a las 48h del sembrado, 16B crecimiento medido a las 72 horas del sembrado.

3.1.4. Observación microscópica mediante tinción con azul de lactofenol

Ambas cepas aisladas presentaban características similares, se observaron hifas hialinas septadas y conidios multicelulares en forma de media luna, en el caso de la cepa F.b, estas observaciones fueron comparadas con las claves descritas por Nelson et al⁶⁹.

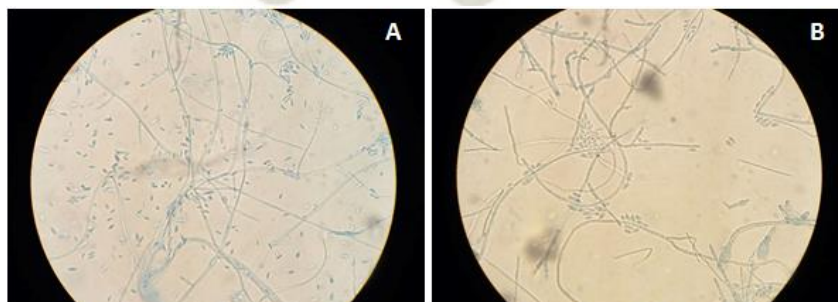


Figura N° 17: 17A (cepa a) y 17B (cepa b) en ambas se observan la presencia de conidios característicos del genero *Fusarium*

Dentro del género *Fusarium* las especies fitopatógenas más importantes en la industria agrícola son las especies *oxysporum*, *solani*, *moniliforme* y *graminearum*. La caracterización se redujo a una de las cuatro especies mencionadas, descartándose a *F. graminearum* debido que esta especie ataca por lo general solamente a cultivos de cebada, además de presentar conidios muy alargados y su micelio se torna de un color rosa oscuro. Por otro lado, también se descartó a *Fusarium solani*, a pesar de ser una plaga común de cebolla esta especie es de un color azul verdoso o marrón azulado, por lo tanto también se descartó a esta especie como agente presente en los cultivos de cebolla bajo evaluación. *Fusarium moniliforme* a pesar de su gran capacidad infectiva no ha sido reportado en cebolla a excepción de muy pocos autores como Orias y Lezama⁷⁰.

3.2. Reactivación de las cepas aisladas

Considerando que las cepas aisladas pertenecían al género *Bacillus sp* y son capaces de enfrentar a hongos fitopatógenos como el *Fusarium sp*, se procedió a realizar una reactivación de la cepa bacteriana enfrentándola directamente contra el patógeno en medio líquido contenido en un matraz, esto debido a que los constantes repiques de las colonias puede ocasionar inestabilidad genética en los aislados microbianos como ya lo comprobaron Malik⁷¹ y Velicier⁷².

Tras tomar muestras del medio líquido y sembrarlas en agar nutritivo se obtuvieron colonias bacterianas idénticas a los aislados iniciales, mas no se observó la aparición de ninguna colonia fungal (**Figura 19**), mostrando un adelanto de la capacidad antagonista por parte de las cepas bacterianas frente a los fitopatógenos.

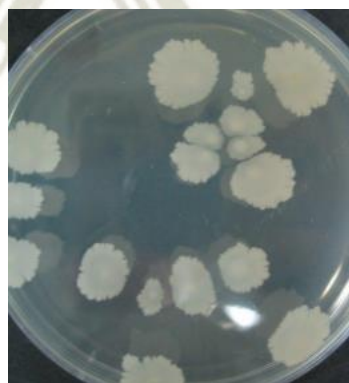


Figura N° 18: Colonias bacterianas obtenidas directamente del matraz, tras incubación a 28°C durante 48 horas, no se observaron colonias fungales.

3.3. Pruebas de antagonismo

Los datos a obtenidos de cada una de las pruebas de antagonismo fueron evaluados utilizando el paquete estadístico *Stat Graphics Centurión XVI*

3.3.1. Sobreposición

Todas las placas fueron evaluadas durante 3 días, cada 24 horas, se obtuvieron los siguientes resultados:

En un plazo de 24 horas se observó un mayor crecimiento de las bacterias, mientras que el crecimiento del hongo fue más lento. Los efectos inhibitorios fueron más evidentes al cabo de 48 horas. El crecimiento del hongo en cada uno de los tratamientos fue comparado con los controles sembrados en simultaneo, para el caso de “*Fusarium A*” este alcanzo un diámetro promedio de 36 mm (ver Anexo 7) al cabo de 72 horas y para “*Fusarium B*” este alcanzo un diámetro promedio de 33 mm (ver Anexo 8).

A continuación, se muestran los datos obtenidos de la evaluación realizada frente a Fusarium A:

Tabla N° 8: Crecimiento en mm de “Fusarium A” enfrentado a las distintas cepas aisladas de Bacillus por triplicado.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)	% de crecimiento	
FaB1.1	9	10	10	10	27.78
FaB1.2	9	10	10	11	30.56
FaB1.3	10	10	10	11	30.56
FaB2.1	13	18	21	21	58.33
FaB2.2	12	18	20	20	55.56
FaB2.3	13	17	21	21	58.33
FaB3.1	12	13	16	16	44.44
FaB3.2	11	14	17	17	47.22
FaB3.3	10	14	16	16	44.44

En el caso de *Fusarium A vs Bacillus 1*, en 24 horas el diámetro del hongo alcanzo en promedio los 9mm, a las 48 horas aumentó a 10 mm y alcanzo un máximo de 11mm en promedio al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 29.38% de su crecimiento (comparado con el control de 36 mm).

En el caso de *Fusarium A vs Bacillus 2*, en 24 horas el diámetro del hongo alcanzo en promedio los 13mm, a las 48 horas aumentó a 18mm y alcanzo un máximo de 21mm en promedio al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 56.36% de su crecimiento (comparado con el control de 36 mm).

En el caso de *Fusarium A vs Bacillus 3*, en 24 horas el diámetro del hongo alcanzo en promedio los 11mm, a las 48 horas aumentó a 14mm y alcanzo un máximo de 16mm en promedio al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 44.57% de su crecimiento (comparado con el control de 36 mm).

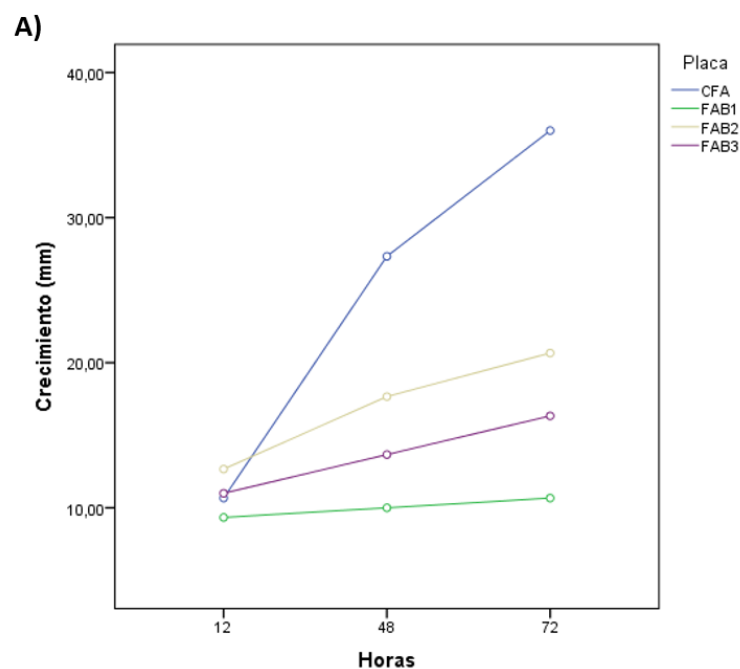


Figura N° 19: Crecimiento en placa de *Fusarium A* frente a bacterias aisladas de *Bacillus 1, 2 y 3* mediante la técnica de sobreposición.

En la **Figura 19**, se muestra los perfiles para el crecimiento de los microorganismos aislados, en el gráfico se muestra el crecimiento de *Fusarium A* como control (CFA), así como su crecimiento frente a las bacterias B1, B2 y B3; utilizando el control como referencia se puede observar la disminución drástica en el crecimiento del patógeno cuando este se encuentra en presencia del microorganismo benéfico, limitando su crecimiento en mayor medida cuando se le enfrente a *Bacillus 1*.

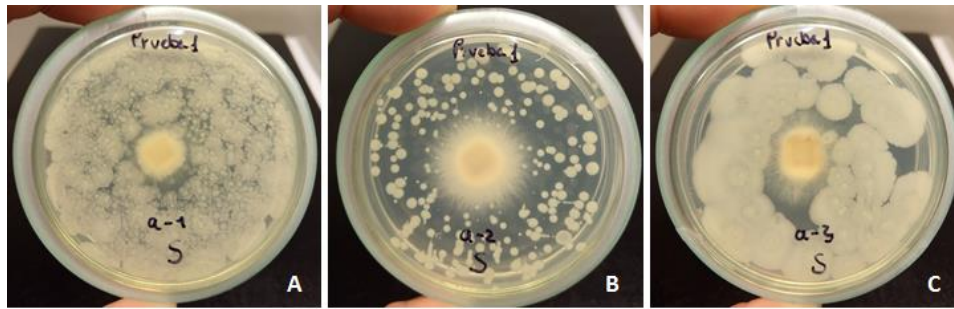


Figura N° 20: Crecimiento e inhibición del patógeno “*Fusarium A*” frente a las distintas cepas aisladas a las 72 horas del sembrado. 20A *Fusarium A* vs *Bacillus 1*, 20B *Fusarium A* vs *Bacillus 2*, 20C *Fusarium A* vs *Bacillus 3*.

A continuación, se muestran los datos obtenidos de la evaluación realizada frente a *Fusarium B*:

Tabla N° 9: Crecimiento en mm de “*Fusarium B*” enfrentado a las distintas cepas aisladas de *Bacillus* por triplicado.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)	% de crecimiento
FbB1.1	10	11	11	33.33
FbB1.2	10	11	13	39.39
FbB1.3	10	12	12	36.36
FbB2.1	7	13	17	51.52
FbB2.2	7	12	15	45.55
FbB2.3	8	13	16	48.48
FbB3.1	8	14	14	42.42
FbB3.2	9	13	14	42.42
FbB3.3	8	15	15	45.45

En el caso de *Fusarium B* vs *Bacillus 1*, en 24 horas el diámetro del hongo alcanzo en promedio los 10 mm, a las 48 horas aumentó a 11 mm y alcanzo un máximo de 12 mm en promedio al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 36.36% de su crecimiento (comparado con el control de 33 mm).

En el caso de *Fusarium B* vs *Bacillus 2*, en 24 horas el diámetro del hongo alcanzo en promedio los 7 mm, a las 48 horas aumentó a 13 mm y alcanzo un máximo de 16 mm en promedio al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 48.52% de su crecimiento (comparado con el control de 33 mm).

En el caso de *Fusarium B* vs *Bacillus 3*, en 24 horas el diámetro del hongo alcanzo en promedio los 8 mm, a las 48 horas aumentó a 14 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 43.43% de su crecimiento (comparado con el control de 33 mm).

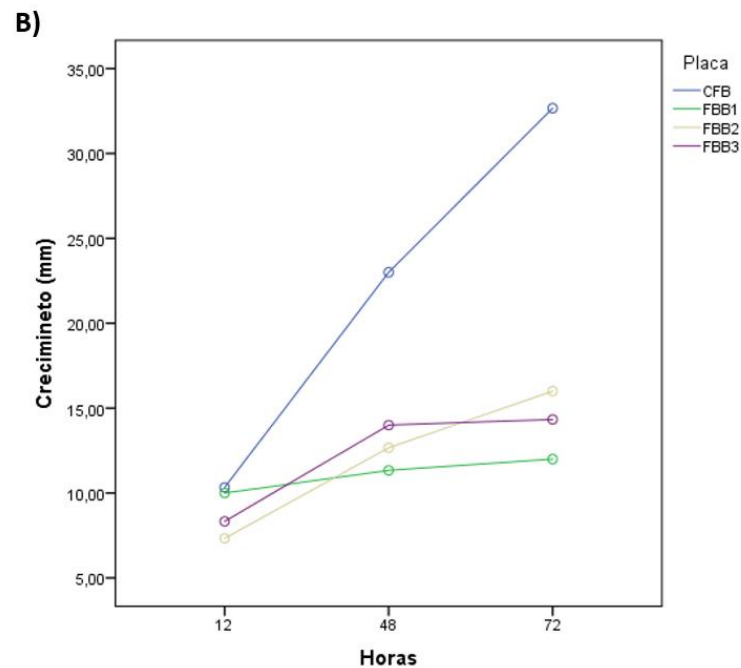


Figura N° 21: Crecimiento en placa de *Fusarium B* frente a bacterias aisladas de *Bacillus 1, 2 y 3* mediante la técnica de sobreposición.

En la **Figura 21**, se muestra los perfiles para el crecimiento de los microorganismos aislados, en el gráfico se muestra el crecimiento en mm de *Fusarium B* como control (CFB) y su desarrollo frente a las bacterias B1, B2 y B3, utilizando el control como referencia se puede observar la disminución drástica en el crecimiento del patógeno cuando se encuentra afectado por el microorganismo benéfico. La línea correspondiente a *Bacillus 1* es la que tiene menor pendiente, indicando una vez más como esta cepa benéfica es la que presenta mayor poder inhibitor hacia el patógeno.

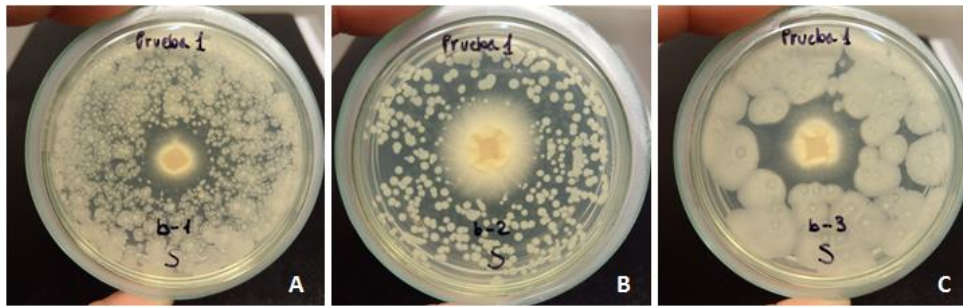


Figura N° 22: Crecimiento e inhibición del patógeno “*Fusarium b*” frente a las distintas cepas aisladas a las 72 horas del sembrado. 22A *Fusarium B* vs *Bacillus 1*, 22B *Fusarium B* vs *Bacillus 2*, 22C *Fusarium B* vs *Bacillus 3*.

La disminución de crecimiento por lo tanto fue expresada como porcentaje de inhibición respecto al grupo control, en la **Figura 23** se muestra el gráfico de barras correspondiente al porcentaje de inhibición a las 72 horas de fusarium a y b frente a las tres bacterias aisladas, se observa que el porcentaje de inhibición fue de 70.62% para FaB1, 63.64% para FbB1, 43.64% para FaB2, 51.48 para FbB2 y finalmente 55.43 % para FaB3 y 56.57% para FbB3.

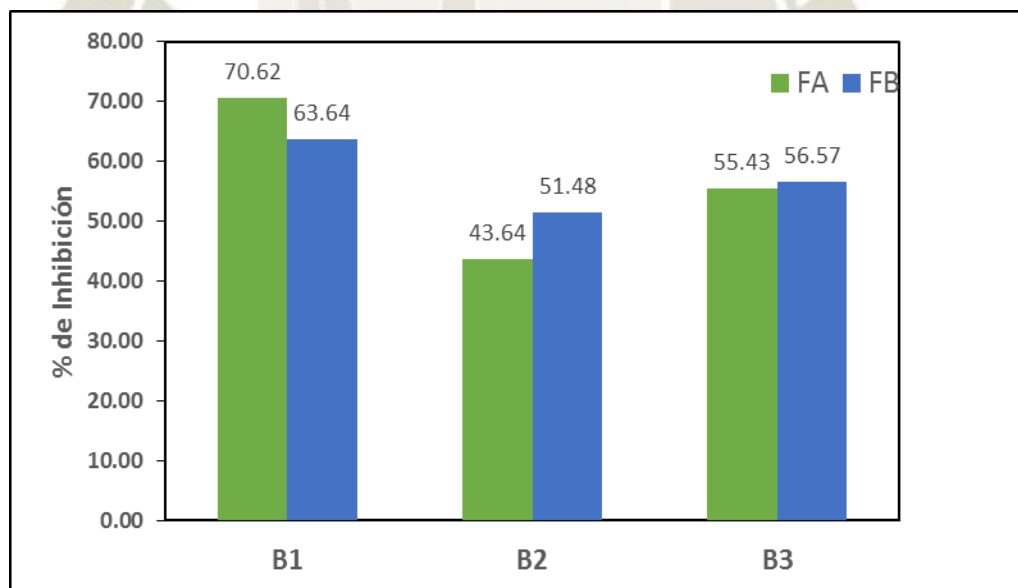


Figura N° 23: Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp* mediante la técnica de sobreposición

Las diferencias en el porcentaje de inhibición fueron confirmadas mediante pruebas estadísticas, así en la **Tabla 10**, se muestra el Análisis de Varianza realizado en el cual se observa que existen diferencias estadísticamente significativas a un 95% de confianza entre los porcentajes de inhibición de los 8 tratamientos (valor- $p < 0.05$).

Tabla N° 10: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	15890.8	7	2270.12	584.59	0.0000
Intra grupos	62.1324	16	3.88328		
Total (Corr.)	15953.0	23			

Se procedió a realizar las comparaciones múltiples según HSD Tuckey (**Tabla 11**) en la cual se muestran los promedios para cada ensayo.

Tabla N° 11: Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición

Sobre posición	% de Inhibición
control Fb	0.00±0.00 ^a
Control Fa	0.00±0.00 ^a
FaB2	43.64±0.69 ^b
FbB2	51.48±2.98 ^c
FaB3	55.43±2.29 ^c
FbB3	56.57±1.74 ^c
FbB1	63.64±3.03 ^d
FaB1	70.62±2.03 ^e

*Promedio ± DS. Comparaciones mediante HSD Tuckey

Tras observar los resultados obtenidos, se puede determinar una diferencia estadísticamente significativa en el tratamiento FaB2 respecto al resto de tratamientos, obteniéndose el menor porcentaje de inhibición en *Bacillus 2* frente a *Fusarium A* de solo 43.64±0.69%, así mismo se hace evidente que los tratamientos FbB2, FaB3 y FbB3 no presentan ninguna diferencia significativa entre ellos, puesto que el porcentaje de inhibición sufrido por los fitopatógenos es muy similar independientemente de que bacteria se utilice para controlarlos (a excepción de la Bacteria 1).

Se hace evidente la diferencia significativa en el poder antagonista de la *Bacillus 1* respecto al resto de bacterias y así mismo cuando este es enfrentado a las dos cepas de patógenos hasta en un 7%, limitando el crecimiento de *Fusarium A* en un 70.62±2.03% y un 63.64±3.03% el crecimiento de *Fusarium B*.

Cook y Baker (1984)⁷³ describen mecanismos mediante los cuales algunos microorganismos son competencia directa de algún patógeno, tales como la “**Competencia**”, un mecanismo directo que consiste en el requerimiento común entre dos especies, ambos se perjudican generando un desequilibrio; “**Competencia por nutrimentos**”, siendo esta la más común, en la que una especie consume los recursos disponibles tanto para su reproducción, respiración y/o metabolismo delimitando así la colonización de otras especies patógenas; “**Interacción directa con el patógeno**” en la cual hay una interacción directa entre parasitismo y la predación, donde el antagonista mediante lisis enzimática degrada las estructuras fúngicas y posteriormente utiliza los enlaces peptídicos hidrolizados para alimentarse de estos (no reportado en el género *Bacillus*) y por último la “**Competencia por espacio**” donde el crecimiento de cierto microorganismo en un área inhibe la expansión de otros; es evidente que solo esta última fue visible en este ensayo, pues a excepción de los casos en los que se enfrentó *Bacillus 1* vs *Fusarium B* (**Figura 22**) y *Bacillus 3* vs *Fusarium B* (**Figura 22C**), hasta se pudo apreciar el contacto directo del micelio con las colonias bacterianas, sin mostrarse ningún tipo de halo de inhibición o un área delimitada en la que el patógeno no pudo acercarse a las colonias.

Sin embargo, para la técnica de sobreposición se puede afirmar que la *Bacillus 1* es la que presenta mayor capacidad antagonista frente a *Fusarium A* seguido de *Fusarium B*.

3.3.2. Enfrentamiento dual

Las placas fueron evaluadas durante 3 días, cada 24 horas, se obtuvieron los siguientes resultados:

En un plazo de 24 horas se observó un mayor crecimiento de las bacterias, mientras que el crecimiento del hongo fue más lento. Los efectos inhibitorios fueron evidentes al cabo de 48 horas sin observarse diferencias en la siguiente evaluación (72 horas). El crecimiento del hongo en cada uno de los tratamientos fue comparado con un control sembrado en simultáneo, para el caso de “*Fusarium A*” este alcanzó un radio promedio de 18 mm (**ver Anexo 9**) al cabo de 72 horas y para “*Fusarium B*” este alcanzó un radio promedio de 16 mm en 72 horas (**ver Anexo 10**).

A continuación, se muestran los datos obtenidos de la evaluación realizada frente a Fusarium A:

Tabla N° 12: Crecimiento en mm de “Fusarium A” enfrenteado a las distintas cepas aisladas de Bacillus sp por triplicado.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)	% de crecimiento
FaB1.1	6	9	9	50
FaB1.2	7	9	9	50
FaB1.3	6	8	9	50
FaB2.1	7	10	10	55.56
FaB2.2	7	11	11	61.11
FaB2.3	6	9	9	50
FaB3.1	6	9	9	50
FaB3.2	6	10	10	55.56
FaB3.3	7	10	10	55.56

En el caso de *Fusarium A vs Bacillus 1*, en 24 horas el radio del hongo alcanzo en promedio los 6mm, a las 48 horas aumentó a 9 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 50% de su crecimiento (comparado con el control de 18 mm).

En el caso de *Fusarium A vs Bacillus 2*, en 24 horas el radio del hongo alcanzo en promedio los 7mm, a las 48 horas aumentó a 10 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 55.56% de su crecimiento (comparado con el control de 18 mm).

En el caso de *Fusarium A vs Bacillus 3*, en 24 horas el radio del hongo alcanzo en promedio los 6mm, a las 48 horas aumentó a 10 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 53.7% de su crecimiento (comparado con el control de 18 mm).

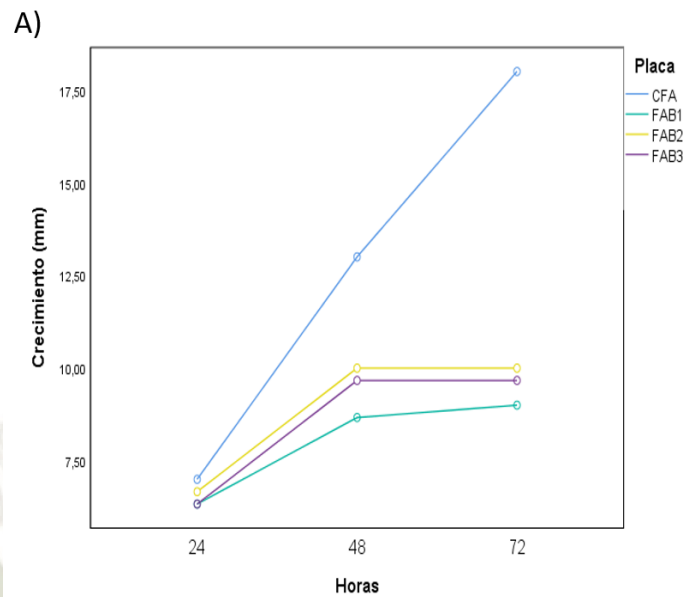


Figura N° 24: Crecimiento en placa de *Fusarium A* frente a bacterias aisladas de *Bacillus* 1, 2 y 3 mediante la técnica de enfrentamiento dual.

En la **Figura 24**, se muestra los perfiles para el crecimiento de los microorganismos aislados, en el gráfico se muestra el crecimiento de *Fusarium A* como control (CFA), así como su crecimiento una vez enfrentado a las bacterias B1, B2 y B3, al igual que en la prueba de sobreposición se puede observar la drástica inhibición del crecimiento del patógeno en la placa representada por las pendientes poco pronunciadas en comparación a CFA.

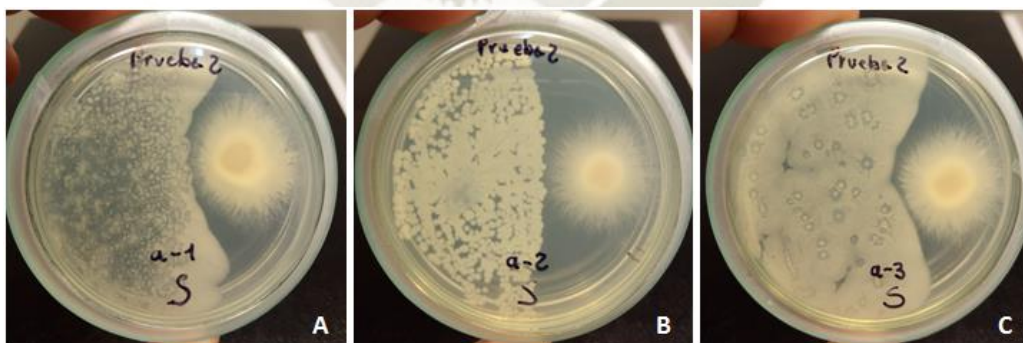


Figura N° 25: Crecimiento e inhibición del patógeno "*Fusarium A*" frente a las distintas cepas aisladas mediante la prueba de enfrentamiento dual a las 72 horas del sembrado. 25A *Fusarium A* vs *Bacillus*1, 25B *Fusarium A* vs *Bacillus*2, 25C *Fusarium A* vs *Bacillus*3.

A continuación, se muestran los datos obtenidos de la evaluación realizada frente a Fusarium B:

Tabla N° 13: Crecimiento en mm de "Fusarium B" enfrentado a las distintas cepas aisladas de Bacillus por triplicado.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)	% de crecimiento
FbB1.1	5	7	7	43.75
FbB1.2	5	6	6	37.5
FbB1.3	6	6	6	37.5
FbB2.1	6	8	8	50
FbB2.2	7	9	9	56.25
FbB2.3	7	8	8	50
FbB3.1	6	8	8	50
FbB3.2	6	8	8	50
FbB3.3	5	7	7	43.75

En el caso de *Fusarium B vs Bacillus 1*, en 24 horas el radio del hongo alcanzo en promedio los 5 mm, a las 48 horas aumentó a 6 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 39.58% de su crecimiento (comparado con el control de 16 mm).

En el caso de *Fusarium B vs Bacillus 2*, en 24 horas el radio del hongo alcanzo en promedio los 7 mm, a las 48 horas aumentó a 8 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 52.08% de su crecimiento (comparado con el control de 16 mm).

En el caso de *Fusarium B vs Bacillus 3*, en 24 horas el radio del hongo alcanzo en promedio los 6 mm, a las 48 horas aumentó a 8 mm y este valor se mantuvo al completar las 72 horas de evaluación. En este caso el hongo solo alcanzó el 47.92% de su crecimiento (comparado con el control de 16 mm).

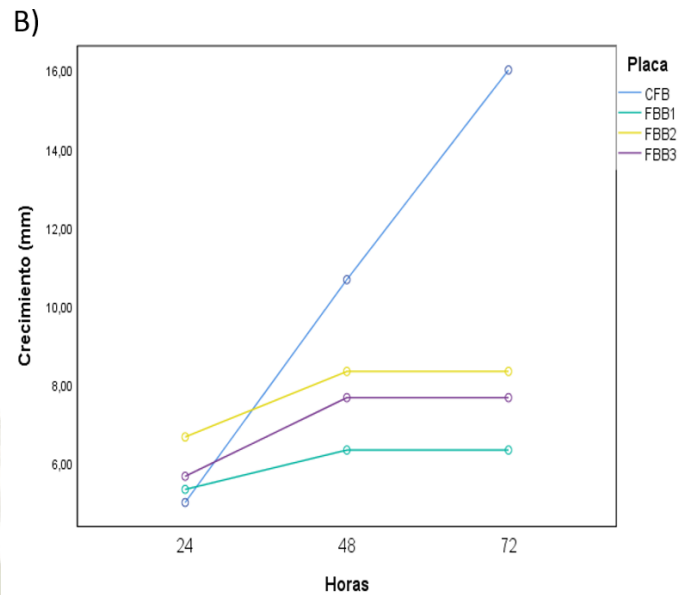


Figura N° 26: Crecimiento en placa de *Fusarium B* frente a bacterias aisladas de *Bacillus* 1, 2 y 3 mediante la técnica de enfrentamiento dual.

En la **Figura 26**, se muestra los perfiles para el crecimiento de los microorganismos aislados, en el gráfico se muestra el crecimiento de *Fusarium B* como control (CFB), así como su crecimiento una vez enfrentado a las bacterias B1, B2 y B3, una vez más es evidente como se detiene el crecimiento micelial del patógeno, no logrando alcanzar ni la mitad de su desarrollo en condiciones no adversas.

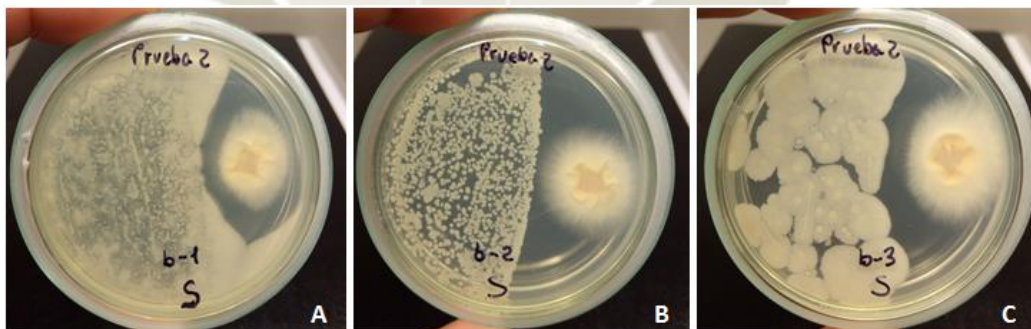


Figura N° 27: Crecimiento e inhibición del patógeno “*Fusarium B*” frente a las distintas cepas aisladas mediante la prueba de enfrentamiento dual a las 72 horas del sembrado. 27A *Fusarium B* vs *Bacillus*1, 27B *Fusarium A* vs *Bacillus*2, 27C *Fusarium B* vs *Bacillus*3.

Para la técnica de enfrentamiento dual también se realizó la evaluación del porcentaje de inhibición a las 72 horas, en la **Figura 28** se muestra el gráfico de barras correspondiente para cada tratamiento en los cuales de color verde se muestra los resultados para *Fusarium A* y en Azul para *Fusarium B* Se muestra que la cepa B1 frente a

Fusarium A y *B* mostró 50.00% y 60.42% de inhibición, la cepa B2 mostró un 44.44% y 47.92% respectivamente; y la cepa B3 mostro un 46.29% y 52.08% para FA y para FB.

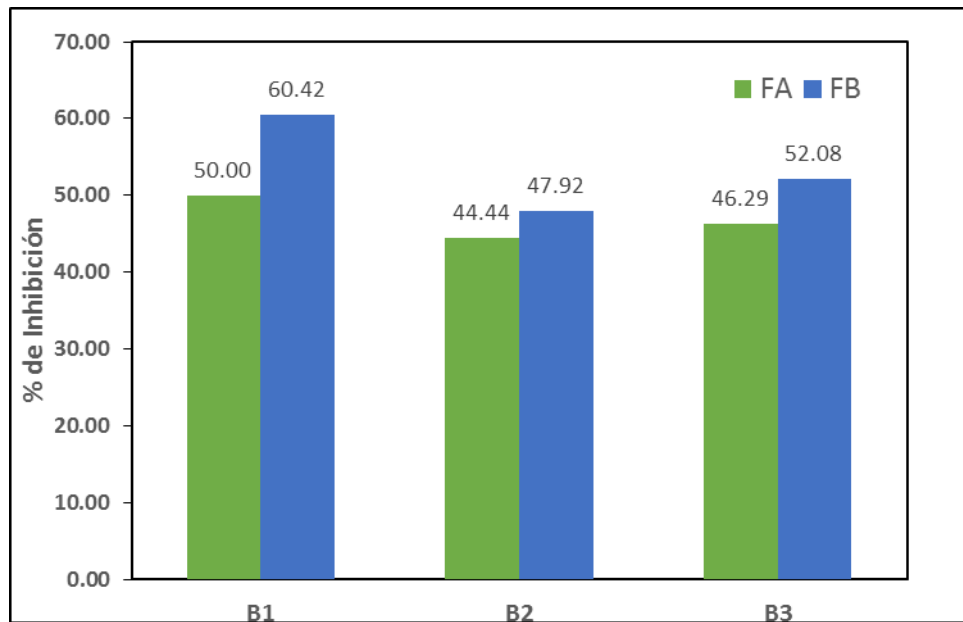


Figura N° 28: Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp.* mediante la técnica de enfrentamiento dual.

Las diferencias en el porcentaje de inhibición fueron confirmadas mediante pruebas estadísticas, así en la **Tabla 14**, se muestra el Análisis de Varianza realizado en el cual se observa que existen diferencias estadísticamente significativas a un 95% de confianza entre los porcentajes de inhibición de los 8 tratamientos (valor- $p < 0.05$).

Tabla N° 14: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	11821.4	7	1688.77	168.40	0.0000
Intra grupos	160.45	16	10.0281		
Total (Corr.)	11981.9	23			

Se procedió a realizar las comparaciones múltiples según HSD Tuckey (**Tabla 15**) en la cual se muestran los promedios para cada ensayo.

Tabla N° 15: Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición con la técnica de sobreposición.

Sobre posición	% de Inhibición
Control Fa	0.0±0.0 ^a
control Fb	0.0±0.0 ^a
FaB2	44.44±5.55 ^b
FaB3	46.29±3.21 ^b
FbB2	47.92±3.60 ^b
FaB1	50.0±0.20 ^b
FbB3	52.08±2.5 ^{bc}
FbB1	60.42±2.8 ^c

*Promedio ± DS. Comparaciones mediante HSD Tuckey

Tras realizar las comparaciones múltiples según HSD Tuckey, se observa que la mayor capacidad de inhibición fue lograda por la Bacteria 1 sobre *Fusarium B* con un 60.42±2.8% y sobre *Fusarium A* con un 50.0±0.20%. Sin embargo, no existió diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de inhibición encontrado en FbB3 y FaB1 con 52.08% y 50% respectivamente, así mismo se hace evidente que los porcentajes de inhibición logrados tanto por la Bacteria 2 y 3 son muy similares, sin tener diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Tal como se observa en la **Tabla 16**, tanto en el enfrentamiento dual como en la técnica de sobreposición, es la cepa B1 la que muestra una mayor capacidad antagonista frente a los patógenos fungales.

Tabla N° 16: Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición de *Fusarium*

Sobre posición	Sobreposición	Enfrentamiento dual
Control Fa	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
Control Fb	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
FaB1	70.62±2.03 ^e	50.0±0.20 ^b
FbB1	63.64±3.03 ^d	60.42±2.8 ^c
FaB2	43.64±0.69 ^b	44.4433±5.55 ^b
FbB2	51.48±2.98 ^c	47.9167±3.60 ^b
FaB3	55.43±2.29 ^c	46.29±3.21 ^b
FbB3	56.57±1.74 ^c	52.08±2.5 ^{bc}

Estudios similares como los realizados por Constanza y Chavez (2011)⁷⁴ en los cuales se utilizó el mismo medio de cultivo para los ensayos (PDA) y realizaron las evaluaciones en el mismo periodo de tiempo (72 horas) alcanzaron porcentajes de inhibición entre 70.21% y 45.27% tras evaluar distintas especies del genero *Bacillus*, tales como *liqueniformis*, *subtilis*, *cereus*, *brevis* y *megaterium*; estos porcentajes de inhibición son similares a los alcanzados por el *Bacillus 1* evaluado en el presente trabajo de investigación evidenciando que su poder antagonista no es inferior a otros géneros aislados por otros autores.

3.3.3. Difusión de metabolitos en agar

Las placas fueron evaluadas al cabo de 96 horas, este periodo de evaluación fue necesario para observar la expansión del hongo alrededor de las horadaciones en el agar. Tanto en el caso del “*Fusarium A*” como el “*Fusarium B*” ambos fueron inhibidos solamente por el “*Bacillus 1*”, siendo evidente al cabo de 72 horas y manteniéndose de esta forma hasta las 96 horas, mostrando un halo inhibitorio de forma ovoide, en la cual la zona central del hongo fitopatógeno logro acercarse al pocillo, pero sin llegar a hacer contacto con este a pesar de la duración de la evaluación, observándose además como el micelio rodeaba la horadación pero sin acercarse a esta. Por el contrario “*Bacillus 2 y 3*” no mostraron ninguna resistencia al avance del micelio, siendo totalmente cubiertos por este ya a las 72 horas de evaluación.

Tabla N° 17: Crecimiento en mm de los patógenos enfrentados a los metabolitos extraídos de las distintas cepas aisladas de *Bacillus sp.*

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)	96h (en mm)	% de crecimiento
FaB1.1	6	14	17	18	50
FaB1.2	6	13	15	15	41.67
FaB1.3	6	14	17	17	47.22
FbB1.1	6	12	13	14	42.42
FbB1.2	6	11	11	12	36.36
FbB1.3	6	12	14	14	42.42

Utilizando los datos representados en la **Tabla 17** se pudo hallar los promedios de inhibición entre las diferentes repeticiones, en los cuales se logró obtener un promedio de 53.70% de inhibición en el crecimiento del "Fusarium A" y un 59.60% para el caso de "Fusarium B".

En la **Figura 29**, se muestra el crecimiento en milímetros de *Fusarium A* y *B* solos como control de crecimiento y enfrentados frente a la bacteria 1, donde se observa que *Fusarium B* alcanzo un 59.60% de inhibición y *Fusarium A* un 53.70% de inhibición a pesar de ser menor la inhibición en *Fusarium A* fue necesario realizar las pruebas estadísticas correspondiente para confirmarlo.

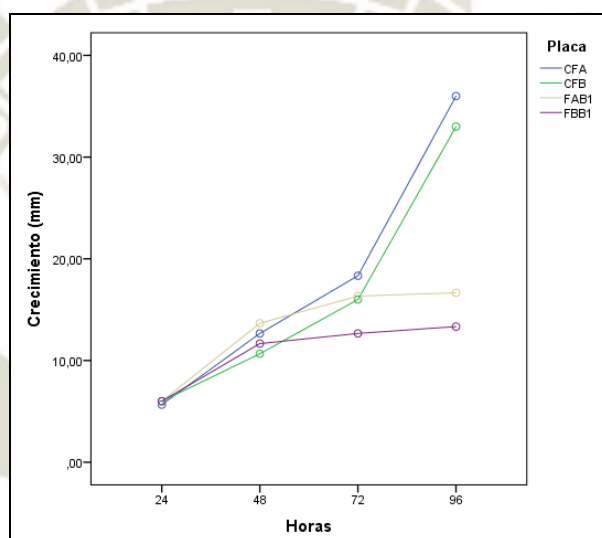


Figura N° 29: Crecimiento de microorganismos mediante difusión de metabolitos.

El porcentaje de inhibición se calculó a partir de diferencia del radio del micelio no influenciado respecto al radio del micelio influenciado por la presencia de los metabolitos de "Bacillus 1" utilizando la siguiente ecuación:

$$\% IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$$

% IM: Porcentaje de inhibición crecimiento micelial

CML: Crecimiento micelial libre

CMI: Crecimiento micelial influenciado

Ecuacion 1: Cálculo del porcentaje de inhibición⁷⁵.

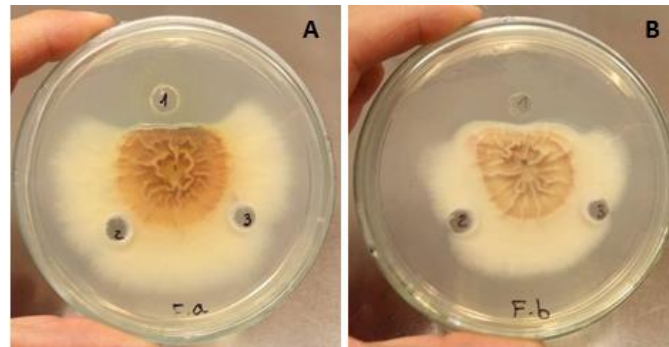


Figura N° 30: Micelio inhibido ante la presencia de metabolitos provenientes de B1 a las 96 horas de evaluación. 30A inhibición sobre el patógeno “Fusarium A”. 30B inhibición sobre el patógeno “Fusarium B”.

Estos resultados son muy alentadores considerando estudios similares realizados por Ragazzo y Robles⁷⁶ en el cual analizaron cepas de bacillus aisladas provenientes de diferentes lugares, reportando un promedio de 10 mm de diametro en el tamaño del halo de inhibición y 26 mm de diametro en el caso de la cepa con mayor actividad antagonista dentro de todas las que fueron aisladas por su equipo (50 cepas).

La inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno suele ser atribuido a la combinación de distintos compuestos bioactivos citados ampliamente en la bibliografía pues se ha demostrado que este efecto inhibitorio no posee la misma capacidad antagonista cuando actúan por separado; demostraron que la Surfactina no posee ninguna actividad inhibitoria por si sola, reportando la falta de un halo de inhibición en el crecimiento del micelio en las placas Petri, sin embargo cuando se evalúan los compuestos activos combinados, alcanzaban halos de inhibición de hasta 23 milímetros, comparados con los 13-17 milímetros alcanzados cuando se evaluó la Iturina A por separado⁷⁶.

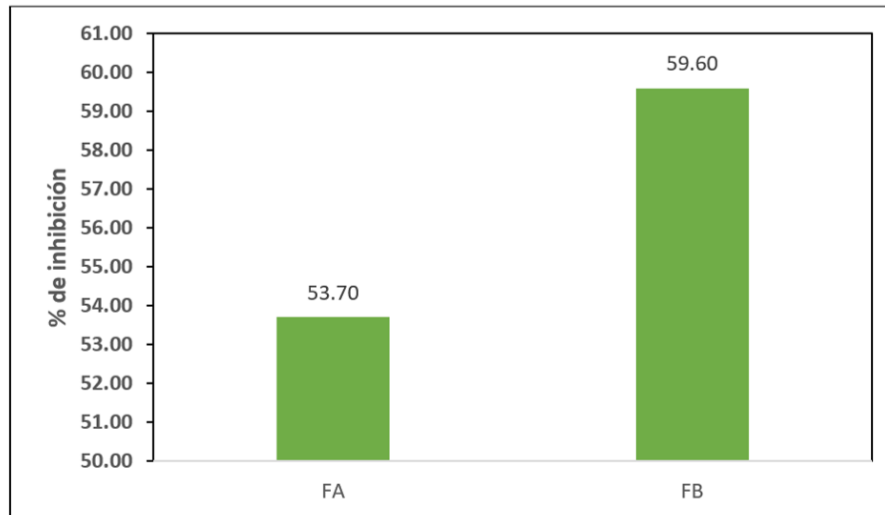


Figura N° 31: Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp.* con la Bacteria 1 mediante la técnica de difusión de metabolitos en agar.

En la **Tabla 18**, se muestra el análisis de varianza realizado a la inhibición de *Fusarium a* y *B* frente a la bacteria 1, observando que si existe diferencias estadísticamente significativas a un 95% de confianza (valor- $p < 0.05$).

Tabla N° 18: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición con la técnica de difusión de metabolito

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9680.39	3	3226.8	427.00	0.0000
Intra grupos	60.4557	8	7.55696		
Total (Corr.)	9740.85	11			

Se continuó con la prueba de HSD Tuckey (**Tabla 19**) en la cual se evidenció que tanto FaB1 como FbB1 con $53.70 \pm 5.55\%$ y $59.6 \pm 3.21\%$ respectivamente no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí, más si lo son respecto a sus controles es decir la bacteria 1 inhibe de igual manera tanto a *Fusarium A* como a *Fusarium B*.

Tabla N° 19: Comparaciones múltiples para el porcentaje de inhibición con la técnica de difusión de metabolito

Sobre posición	% de Inhibición
Control Fa	0.0±0.0 ^a
control Fb	0.0±0.0 ^a
FaB1	53.70±5.55 ^b
FbB1	59.6±3.21 ^b

*Promedio ± DS. Comparaciones mediante HSD Tuckey

Tras realizar las pruebas de inhibición se observaron dos patrones esperados, en el primero (pruebas 1 y 2) el crecimiento del hongo fue delimitado por el crecimiento bacteriano. Esto probablemente debido a la manifestación de un mecanismo de competencia por espacio, como ha sido descrito por autores como Butt en 1999⁷⁷ mas no necesariamente dado por una alta producción de compuestos bioactivos con actividad fungicida. El segundo patrón fue caracterizado por la formación de un semihalo de inhibición (el cual tenía forma ovoide) esta formación manifiesta la posible producción previa por parte de las bacterias del genero *Bacillus* de compuestos fungitóxicos que lograron penetrar en el agar, tal como fue descrito por Cavaglieri en 2004⁷⁸ y Joshi en 2008⁷⁹.

La producción de este tipo de compuestos ha sido ampliamente comprobada por parte de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, siendo fungicidas de naturaleza lipopeptídica tales como la Iturina y Surfactina las más reportadas^{79, 80, 81}.

Respecto a los metabolitos conocidos producidos por el género *Bacillus*, la Iturina A tiene la capacidad de dañar directamente la membrana citoplasmática del fitopatógeno, creando canales a través de la membrana, lo cual permite la liberación de iones vitales tales como el K⁺ desencadenando una cadena de eventos que llevan al colapso de la membrana fungal. Onangena (2007)⁸².

Estudios realizados por Brar en 2002⁸³ demostraron que los organismos benéficos no solamente pueden actuar en el control biológico ya sea compitiendo por espacio o con la liberación de antifúngicos que actúan de manera directa sobre las membranas de los patógenos, sugiere además que los compuestos bioactivos tales como las fengicinas y surfactinas pueden inducir al sistema de resistencia propio de la planta, por lo tanto se puede lograr un doble rol para la reducción de los efectos adversos de los fitopatógenos

sobre las plantas, atacando al hongo y mejorando la capacidad defensiva del hospedero en simultaneo, por lo expuesto, a pesar de que las condiciones de laboratorio y de campo son diferentes, los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo sientan un precedente acerca del potencial que estas cepas de *Bacillus* podrían alcanzar de ser aplicadas al campo de cultivo, ya sea como prevención o como tratamiento.

3.4. Evaluación de la durabilidad de los metabolitos respecto a fungicidas sintéticos comerciales

Las placas fueron evaluadas al cabo de 144 horas (6 días) tiempo necesario para que el hongo fitopatógeno logre cubrir en su totalidad la superficie del agar Sabouraud.

3.4.1. Persistencia sobre “*Fusarium A*”

Se observó que al culminar la evaluación solamente el fungicida T-REX en la posición 4, tuvo un efecto antagónico contra el crecimiento del hongo en las 3 repeticiones, la horadación que contenía el filtrado proveniente de medio líquido con la cepa B1 no mostró ningún tipo de inhibición frente a la expansión del micelio (**Anexo 11**).

3.4.2. Persistencia sobre “*Fusarium B*”

Se obtuvieron los mismos resultados observados sobre “*Fusarium A*” donde solamente el fungicida T-REX en la posición 4 (**ver Anexo 12**), tuvo un efecto antagónico contra el crecimiento del hongo en las 3 repeticiones.

Si bien los fungicidas hechos a base de Carbendazim y Metil tiofanato como es el caso de Botrimax y Homai respectivamente se venden como controladores para enfermedades como la fusariosis, evaluaciones realizadas constantemente en la industria agrícola evidenciaron la resistencia por parte de diferentes géneros de *Fusarium* hacia estos compuestos activos, esto explica el porqué de su ineficiencia ya que estos productos teóricamente tienen una acción eficaz hasta un mínimo de 7 a 15 días, contrastando con los 6 días que duró la evaluación in vitro. Debido a que ambas cepas de *Fusarium* utilizadas en esta investigación fueron aisladas del mismo campo de cebolla, no es de extrañar que ambas hayan logrado desarrollar cierta resistencia a los fungicidas.

3.5. Identificación molecular de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista.

Debido a que la cepa rotulada como “Bacillus 1” presento la mayor actividad antagonista resultante de los 3 ensayos llevados a cabo, esta fue seleccionada para la extracción, visualización, amplificación y secuenciación del gen 16S.

Tras el análisis electroforético, solo se observó una banda intensa y bien definida perteneciente al DNA genómico de la bacteria, no se observaron plásmidos adicionales ni la presencia de smears (**ver Anexo 12**) lo cual hubiese evidenciado una baja calidad o deterioro de la muestra bajo análisis, al no contar con un espectrofotómetro para medir la relación de absorbancias A260/280 estos resultados sirvieron como único criterio para confiar en la calidad del producto del ADN. Esta muestra fue utilizada para la amplificación del gen 16S que posteriormente fue secuenciada por la técnica de Sanger. La secuencia obtenida de nucleótidos (**Anexo 13**) fue comparada en el GenBank de NCBI, para lo cual se utilizó el algoritmo BLASTn (**Basic Local Alignment Search Tool**) el cual trabaja encontrando regiones similares entre secuencias biológicas, este programa compara los nucleótidos presentes en la base de datos con los encontrados en la secuencia ingresada. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El análisis con la herramienta BLASTn mostro un 99% de identidad con la secuencia de *Bacillus velezensis* y *amyloliquefaciens* depositada en el GenBank con numero de acceso [MK351256.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/MK351256.1) de esta forma se explica el porqué de su gran capacidad antagonista frente a fitopatógenos fungales, debido a que este microorganismo se encuentra estrechamente emparentado con la especie *subtilis*, microorganismos del genero bacillus ampliamente estudiados por múltiples autores como Yang y Cheng^{84, 85} los cuales reportaron las interacciones antagonistas frente a *Fusarium sp* debido principalmente a la síntesis de compuestos polipeptídicos no ribosomales, los cuales presumiblemente también se encontrarían presentes en *Bacillus velezensis*.

3.6. Elaboración de medios de producción, curva de crecimiento y cinética bacteriana.

Los cuatro medios nutritivos propuestos fueron inoculados con 1ml de medio a una concentración de 6×10^8 cel/ml el cual había sido previamente incubado durante 30 horas a

temperatura ambiente y 130 rpm, de esta forma los 4 medios artesanales partían de una concentración inicial aproximada de 4×10^6 cel/ml.

Se tomaron alícuotas durante un periodo de 56 horas, cada una de estas fue observada al microscopio utilizando una cámara de Neubauer utilizando la siguiente ecuación:

$$[C] = \#células \times 25 \times 10 \times 10^4$$

Ecuacion 2: Concentracion del numero de celulas contados en la cámara de Neubauer.

Donde la concentración del medio es igual al promedio de células contabilizado en el área de 4x4 multiplicado por 25 (total de cuadros en el área central) por la inversa de la dilución por el factor de la cámara.

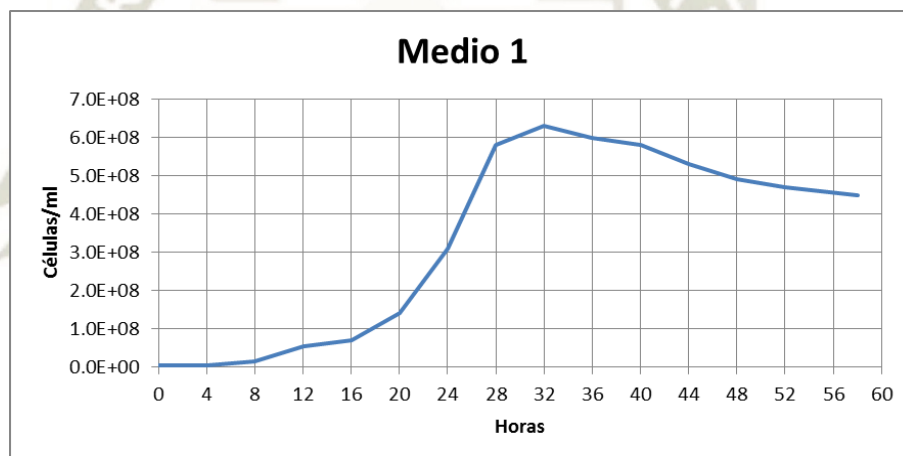


Figura N° 32: Crecimiento bacteriano en el medio 1.

En la **Figura 32** se puede observar el crecimiento bacteriano en el medio 1, se observa la etapa de adaptación de aproximadamente 4 horas, en la cual la el microorganismo no supero una concentración de 5.6×10^6 cel/ml, completado este periodo inicio su fase exponencial, el cual duró 20 horas. El medio alcanzo una concentración maxima de $6,3 \times 10^8$ cel/ml el cual se muestra como un pico dentro de la fase estacionaria, pasadas las 40 horas se observa una reducción en la concentración de los microorganismos iniciando asi su fase de muerte, llegando a una concentración de $4,5 \times 10^8$ cel/ml a las 58 horas, momento del último muestreo. **Anexo 14**

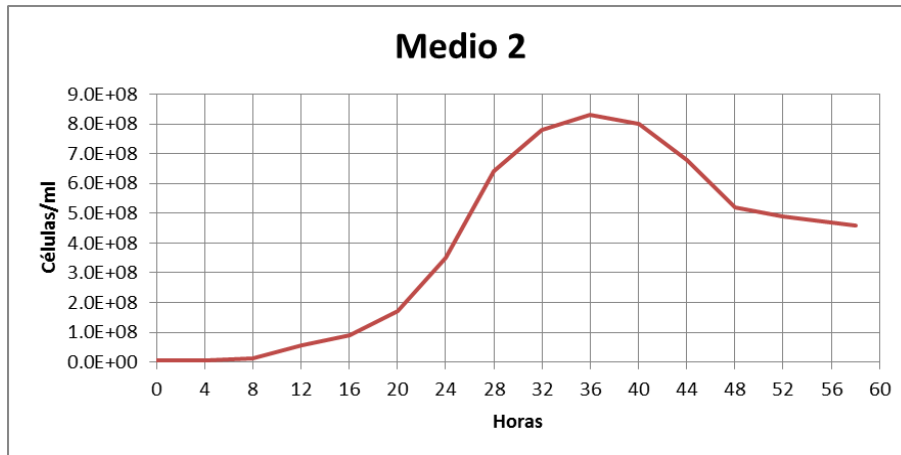


Figura N° 33: Crecimiento bacteriano en el medio 2

En la **Figura 33** se puede observar el crecimiento bacteriano en el medio 2, se observa la etapa de adaptación de aproximadamente 4 horas, en la cual la el microorganismo no supero una concentración de 5.4×10^6 cel/ml, completado este periodo inicio su fase exponencial, el cual duró 24 horas. El medio alcanzo una concentración maxima de $8,3 \times 10^8$ cel/ml el cual se muestra como un pico dentro de la fase estacionaria, pasadas las 40 horas se observa una reducción en la concentración de los microorganismos iniciando asi su fase de muerte, llegando a una concentración de $4,6 \times 10^8$ cel/ml a las 58 horas, momento del último muestreo. **Anexo 15**

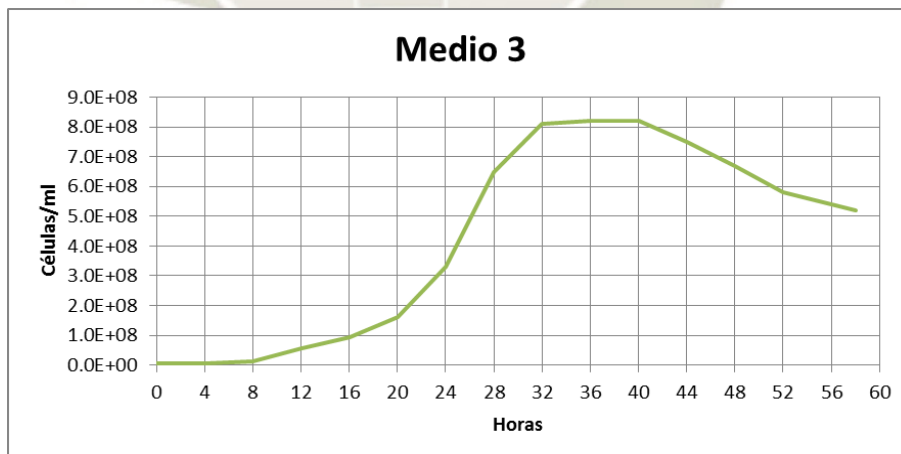


Figura N° 34: Crecimiento bacteriano en el medio 3

En la **Figura 34** se puede observar el crecimiento bacteriano en el medio 3, se observa la etapa de adaptación de aproximadamente 4 horas, en la cual la el microorganismo no supero una concentración de 5.3×10^6 cel/ml, completado este periodo

inicio su fase exponencial, el cual duró 24 horas. El medio alcanzo una concentración maxima de $8,2 \times 10^8$ cel/ml el cual se muestra como un pico dentro de la fase estacionaria, pasadas las 40 horas se observa una reducción en la concentración de los microorganismos iniciando asi su fase de muerte, llegando a una concentración de $5,2 \times 10^8$ cel/ml a las 58 horas, momento del último muestreo. **Anexo 16**

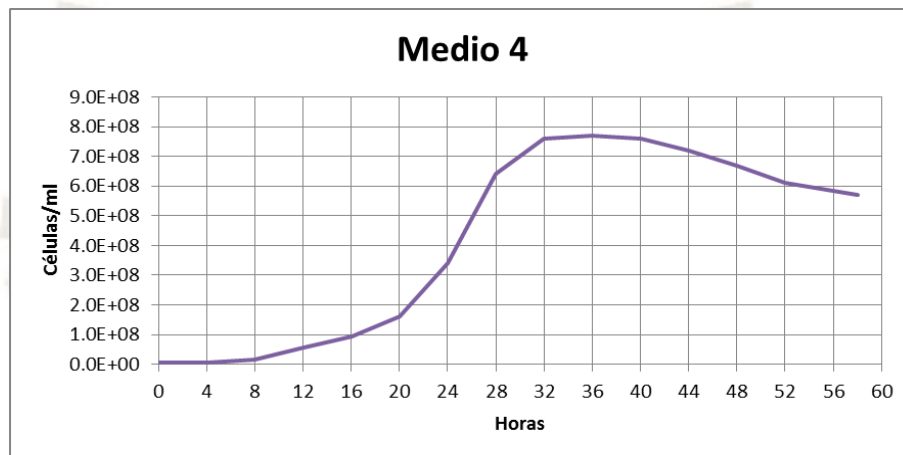


Figura N° 35: Crecimiento bacteriano en el medio 4

En la **Figura 35** se puede observar el crecimiento bacteriano en el medio 4, se observa la etapa de adaptación de aproximadamente 4 horas, en la cual la el microorganismo no supero una concentración de $5,5 \times 10^6$ cel/ml, completado este periodo inicio su fase exponencial, el cual duró 24 horas. El medio alcanzo una concentración maxima de $7,7 \times 10^8$ cel/ml, pasadas las 40 horas se observa una reducción en la concentración de los microorganismos iniciando asi su fase de muerte, llegando a una concentración de $5,7 \times 10^8$ cel/ml a las 58 horas, momento del último muestreo. **Anexo 17**

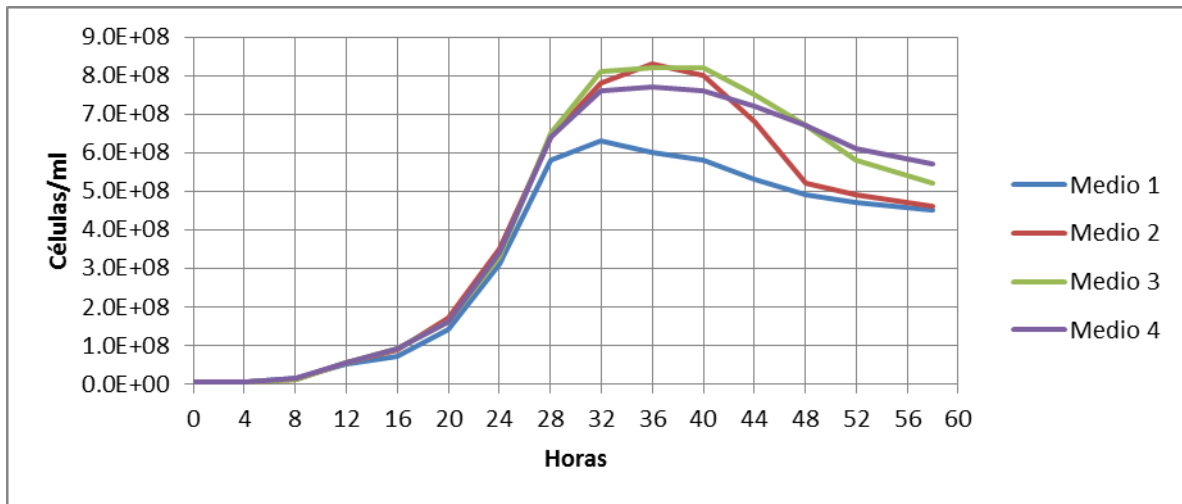


Figura N° 36: Comparación del crecimiento bacteriano entre los 4 medios propuestos.

Al comparar el crecimiento de los 4 medios propuestos (**Figura 36**) se puede observar cierta similitud entre los medios 2 3 y 4 respecto a duración de la fase estacionaria (8 horas) y concentración máxima alcanzada, pero diferentes al medio 1 cuya fase estacionaria tuvo una duración de 12 horas y a la vez una muerte de microorganismos mas lenta que en los otros medios, esto puede deberse a la menor concentración metabolitos tóxicos y de ácidos orgánicos presentes en el medio llevándolo a la acidez, ya que estos son los principales factores que influyen en la muerte bacteriana como ya demostraron Ozturk y Calik⁸⁶ al estudiar la producción de biomoléculas producidas por el género *Bacillus* por operaciones de Fed-Batch.

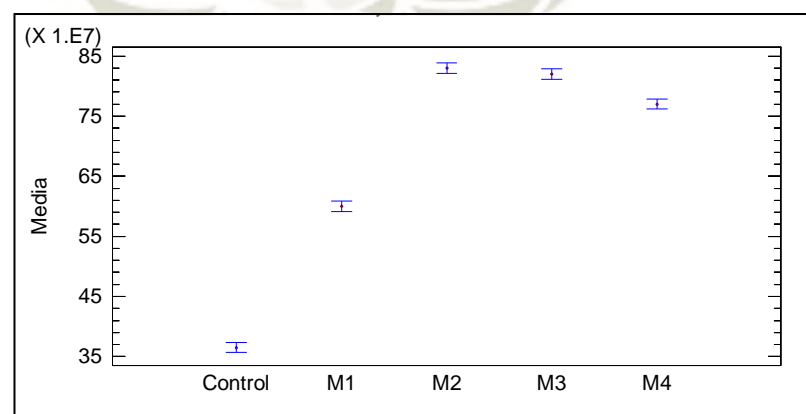


Figura N° 37: Gráfica de medias para el crecimiento de *Bacillus velezensis* en distintos medios de cultivo

El crecimiento de *Bacillus velezensis* En los distintos medios de cultivo se muestra en la **Figura 37** la cual muestra el promedio de crecimiento a las 36 horas de evaluación tiempo en el cual inicia la fase estacionaria.

Utilizando el paquete estadístico Statgraphics centurión XVI se aplicó un análisis de varianza para evidenciar diferencias en el crecimiento de *Bacillus velezensis* en distintos medios de cultivo fue significativo a un 95% de confianza (valor- $p < 0.05$) (**ver Tabla 20**).

Tabla N° 20: Análisis de varianza para el crecimiento bacteriano entre los diferentes medios propuestos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.6734E17	4	1.16835E17	1397.98	0.0000
Intra grupos	8.3574E14	10	8.3574E13		
Total (Corr.)	4.68176E17	14			

En la **Tabla 21** se muestra que el medio 2 y el medio 3 fueron los que mostraron mayor crecimiento bacteriano sin diferencias significativas entre ellos con 8.2×10^8 cel/ml y 8.3×10^8 cel/ml respectivamente, seguidos del medio 4 con 7.7×10^8 cel/ml, el medio 1 con 6.00×10^8 cel/ml y finalmente el medio Control, todos los medios propuestos presentaron mayor crecimiento que el medio control.

Tabla N° 21: Comparaciones múltiples entre los distintos medios de producción respecto al control utilizado.

Medio	Concentración de cel/ml
Control	3.65×10^8 ^A
M1	6.00×10^8 ^B
M4	7.7×10^8 ^C
M3	8.2×10^8 ^D
M2	8.3×10^8 ^D

Comparaciones mediante HSD Tuckey

Tomando como referencia las concentraciones iniciales alcanzadas en medio nutritivo como control y trabajos como los de Sotomayor-Garcia (2011)⁸⁷ que alcanzaron una concentración de 2.89×10^8 cel/ml se observa que las concentraciones alcanzadas por los medios artesanales propuestos son ligeramente superiores a los obtenidos en los

trabajos mencionados, por otro lado es posible alcanzar concentraciones mucho más altas como las reportadas por Chen (2009)⁸⁸ utilizando como base para el medio de cultivo harina de soya, reportando concentraciones superiores a 1.5×10^{10} cel/ml, sin embargo estos datos fueron obtenidos mediante la producción en biorreactores y no en matraz Erlenmeyer, por lo que se podría considerar que el medio propuesto #2 posee un gran potencial de mejora, tanto en biomasa como en producción de sustancias que ayuden a mitigar las plagas ocasionadas por las diferentes cepas de *Fusarium* que atacan los cultivos en épocas donde la humedad por las noches y el intenso calor durante las mañanas presentes en lugares como la irrigación de Santa Rita de Sihuas son factores muy favorables para la rápida proliferación de hongos fitopatógenos.



Capítulo IV:

Conclusiones:

Primera:

Gracias al correcto muestreo y tratamientos a los cuales se sometieron los diferentes microorganismos obtenidos a partir de las muestras de tierra, se logró aislar exitosamente tres diferentes cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus sp.* que se encontraban biológicamente activas, esto evidenciado por su capacidad de reproducción y producción de compuestos bioactivos.

Segunda:

Tras realizar las tres diferentes pruebas de antagonismo podemos concluir que el tipo de inhibición depende de las condiciones en las que sean enfrentados los microorganismos, siendo la competencia por espacio el más evidente en las pruebas de sobreposición de enfrentamiento dual, sin embargo en la prueba de difusión de metabolitos en agar se confirma el antagonismo por amensalismo, pues no se contaba con la presencia de bacterias en la placa, sin embargo autores como Janisiewicz y Korsten en 2002⁸⁹ mencionan que en ningún caso se ha reportado que solo un mecanismo pueda estar implicado en el biocontrol y que por el contrario este puede estar mediado por el sinergismo de varios procesos, dificultando de esta forma generar resistencia por parte del fitopatógeno contra el agente de control.

Adicionalmente, utilizando los datos obtenidos en la prueba de difusión de metabolitos en agar con los obtenidos en la evaluación de persistencia, se puede presumir que los metabolitos obtenidos en el filtrado del medio bacteriano inoculado con "*Bacillus 1*" tienen un tiempo de vida entre los 3 a 4 días, pero menor a los 6 días en contraste contra los 7 a 15 días que los fabricantes de los fungicidas sintéticos afirman en los envases de sus productos.

Tercera:

Tras haber secuenciado el ADN obtenido de la bacteria con la mayor actividad antagonista, se pudo determinar que el microorganismo aislado pertenecía al género *Bacillus* como se sospechaba desde un inicio, pudiéndose tratar de las especies *velezensis* y/o *amyloliquefaciens*, esto puede explicar el porqué de su capacidad antagonista basándose en los estudios realizados a las especies directamente emparentadas como *subtilis* o *amyloliquefaciens*, ya que los estudios realizados sobre la especie *velezensis* son limitados debido a que esta especie fue homologada recién en el año 2016

Quinta:

De los cuatro medios de producción postulados, los numero 2, 3 y 4 alcanzan concentraciones máximas muy similares (aproximadamente 8×10^8), sin embargo el ritmo al que disminuye la viabilidad de los microorganismos tras la fase estacionaria es acelerada, a diferencia del medio 1, que si bien alcanzo una concentración menor (6.3×10^8) la velocidad a la que se reducía su viabilidad también fue mas lenta, esto puede deberse a una menor concentración de compuestos orgánicos disueltos en el mismo volumen de medio, tóxicos para los mismos microorganismos que los producen, adicionalmente es presumible que otros factores tales como la temperatura o el pH hayan sido limitantes en el incremento de la concentración de los microorganismos.

Sexta:

Si bien el control biológico es una solución factible y económica al uso de fungicidas sintéticos, se debe tener en cuenta que el uso de microorganismos está limitado a las condiciones climáticas presentes en la zona donde estos sean aplicados, también se debe tener en cuenta que parte del éxito que se busca obtener al momento de aplicar el control biológico en el campo, se deberá en gran medida a la cantidad de inóculo aplicado sobre este, pues no es factible solucionar un problema tan persistente como la fusariosis con una sola aplicación de microorganismos benéficos, considerando la facilidad y la rapidez con la que se pueden degradar los compuestos bioactivos útiles contra el fitopatógeno debido a las condiciones ambientales, tales como la luz solar y el calor característico de las zonas agrícolas.

Recomendaciones al investigador:

Primera:

Se puede mejorar la concentración máxima alcanzada por los microorganismos en medio líquido regulando parámetros como el pH para evitar que el medio se convierta tan ácido debido a la gran cantidad de ácidos orgánicos, temperatura ya que esta provee la energía necesaria para la activación de diferentes reacciones durante la fase exponencial y la agitación ya que esta última es fundamental para la producción de surfactina para especies pertenecientes al género *Bacillus*.

Segunda:

En estudios anteriores se ha demostrado que la condición limitante de oxígeno favorece a la expresión de genes necesarios para la producción de compuestos bioactivos de interés para el control biológico, por lo cual es fundamental ampliar la investigación sobre el desarrollo de *Bacillus* en biorreactores, evaluando cual sería la forma más adecuada de lograr el mayor estrés en el microorganismo, buscando una máxima esporulación y en consecuencia una expresión más fuerte para la producción de los compuestos fungicidas.

Tercera:

Se debe buscar y evaluar compuestos químicos no tóxicos u orgánicos los cuales logren ralentizar el metabolismo del microorganismo durante su fase estacionaria para inhibir la posterior pérdida de concentración del microorganismo, de esta forma convirtiéndolo en un producto con una durabilidad evaluada y demostrada ampliando la vida de anaquel, siendo posible trasladarlo distancias más largas y sin necesidad de aplicarlo a penas el producto se termine de producir en los biorreactores.

Referencias Bibliográficas

1. Hungria, M., Franchini, J. C., Campo, R. J. and Graham, P. H. 2005. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. Pages 25–42
2. Cubeta, M. A., Hartman, G. L., and Sinclair, J. B. 1985. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybeans seeds. *Plant Dis.* 69:506-509
3. Endo, R., and Burkholder, E. 1971. The association of *Fusarium moniliforme* with the crown rot complex of asparagus. *Phytopathology* 61: 891. (Abstract).
4. Schreuder, W. and Lamprecht, S. 1995. Pathogenicity of three *Fusarium* species with asparagus decline in South Africa. *Plant Disease* 79: 177-181.
5. Elmer, W. 2000. Incidence of infection of asparagus spears marked in Connecticut by *Fusarium* spp. *Plant Disease* 84: 831-834.
6. Bailey K. L., Boyetchko S. M., Langle T., 2010, Social and economic drivers saping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticidas, *Biological Control*, 52:221-229.
7. Robles JEA, García EFM. Crecimiento de cebolla (*Allium cepa* L.) var. “Roja Arequipeña” en función de la fertilización NxK. *Scientia Agropecuaria*. 2012;3(1):07-14.
8. de la Fé Montenegro CF, Cárdenas Travieso RM. Producción de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), una realidad en Santa Cruz del Norte, Mayabeque. *Cultivos Tropicales*. 2014;35(4):5-12.
9. Santas J, Almajano MP, Carbó R. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International journal of food science & technology*. 2010;45(2):403-9.
10. Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-food science and technology*. 2004;37(2):263-8.

11. INFOAGRO. Inteligencia de Mercado de la Cebolla, La Libertad, Perú. Gerencia Regional de Agricultura 2009.
12. Prakash D, Singh BN, Upadhyay G. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). Food chemistry. 2007;102(4):1389-93.
13. Mundial B. Análisis integral de logística en Perú. 2016.
14. Arboleya J, Maeso D, Campelo E, Paullier J, Giménez G, Arboleya J, et al. Producción integrada de cebolla. Boletín de divulgación. 2013;105.
15. Steer B. The bulbing response to day length and temperature of some Australasian cultivars of onion (*Allium cepa* L.). Australian Journal of Agricultural Research. 1980;31(3):511-8.
16. Mondal M, Brewster J, Morris G, BUTLER HA. Bulb development in onion (*Allium cepa* L.) I. Effects of plant density and sowing date in field conditions. Annals of Botany. 1986;58(2):187-95.
17. Rojas CM. Requerimientos Agroclimáticos del Cultivo de Cebolla. Perú: MINAGRI, 2018.
18. Carvalho Nd, Nakagawa J. Sementes: ciência, tecnologia e produção: Jaboticabal: Funep; 2000.
19. Burgos Chinchay LH, Mendoza Vallejos JF. Análisis sectorial de la cebolla roja en el Perú. 2018.
20. Kiehr M, Delhey R. Estrategias para el manejo de enfermedades de cebolla en el sur argentino. AgroUNS. 2007;4(7):5-10.
21. Desjardins A, Proctor R. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. International journal of food microbiology. 2007;119(1-2):47-50.
22. Tapia C, Amaro J. Género *Fusarium*. Revista chilena de infectología. 2014;31(1):85-6.

23. Nir-Paz R, Strahilevitz J, Shapiro M, Keller N, Goldschmied-Reouven A, Yarden O, et al. Clinical and epidemiological aspects of infections caused by *Fusarium* species: a collaborative study from Israel. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3456-61.
24. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(4):695-704.
25. Monzón A, Rodríguez J. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Servicio de Micología Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. 1997.
26. Balajee S, Borman A, Brandt M, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(4):877-84.
27. Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant disease*. 2003;87(2):117-28.
28. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical microbiology reviews*. 1994;7(4):479-504.
29. Cramer CS. Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica*. 2000;115(3):159-66.
30. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013;32(12):1491-500.
31. Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*. 2003;157(3):493-502.
32. Galván GA, Koning-Boucoiran CF, Koopman WJ, Burger-Meijer K, González PH, Waalwijk C, et al. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*. 2008;121(4):499-512.

33. Retana K, Coché JAR, Castro O, Blanco M. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*. 2018;42(1):115-26.
34. Geiser DM, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. 2004;110(5-6):473-9.
35. Besano A, Ancía V, Cristian H. Alternativas para el manejo de *Fusarium* en cebolla. *Uso de Trichoderma CORGO Rio Colorado*. 2010.
36. Klokoãar-Šmit ZD, Leviã JT, Mašireviã SN, Grozdanoviã-Varga JM, Vasiã MA, Aleksiiã SR. *Fusarium* rot of onion and possible use of bioproduct. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*. 2008:135.
37. Smith AE, Secoy DM. Forerunners of pesticides in classical Greece and Rome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1975;23(6):1050-5.
38. del Puerto Rodríguez AM, Suárez Tamayo S, Palacio Estrada DE. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2014;52(3):372-87.
39. Sánchez Martín MJ, Sánchez Camazano M. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España); 1985.
40. Méndez MJ, Viteri SE. Alternativas de biofertilización para la producción sostenible de cebolla de bulbo (*Allium cepa*) en Cucaita, Boyacá. *Agronomía Colombiana*. 2007;25(1):168-75.
41. Chung B. Control de los contaminantes químicos en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2008;25(4):413-8.
42. Montoro Y, Moreno R, Gomero L, Reyes M. Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2009;26(4):466-72.

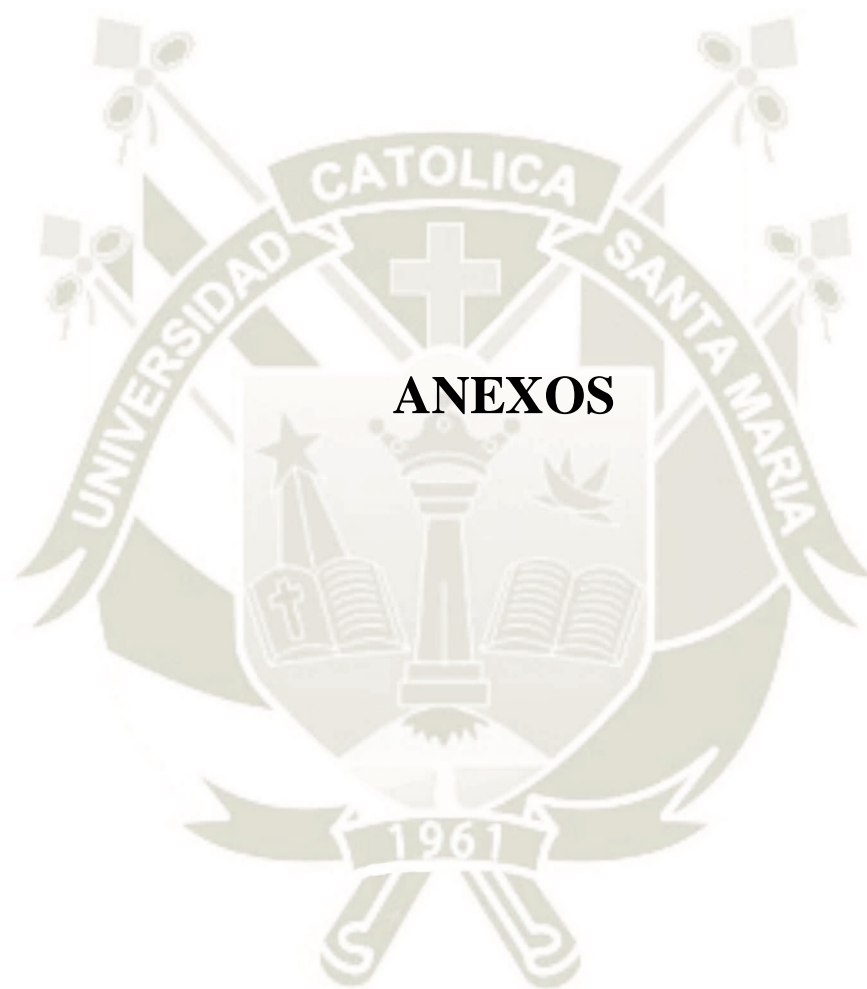
43. Pulido A, Paola D, Sandoval Sisa ER. Evaluación " In Vitro" de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento: Facultad de Ciencias; 2008.
44. Cano MA. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 2011;14(2):15-31.
45. Pérez R, Terrón TS, Muñoz-Rojas J. Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). Revista Iberoamericana de Ciencias. 2014.
46. Mondino P, Vero S. Control biológico de patógenos en plantas. Área Agraria;. 2006.
47. Villamil Carvajal JE, Blanco Valbuena JO, Viteri Rosero SE. In vitro evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against *Moniliophthora roreri* Cif & Parin Cocoa (*Theobroma cacao* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 2012;65(1):6305-15.
48. Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, Torkewitz NR, Hofmann D, Kempf HJ, et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. Pest Management Science: formerly Pesticide Science. 2000;56(8):688-95.
49. Guédez C, Castillo C, Cañizales L, Olivar R. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Academia. 2008;7(13):50-74.
50. Debach P. Lucha biológica contra los enemigos de las plantas: Mundi-Prensa; 1977.
51. Nilda PC, Vázquez L. Manejo ecológico de plagas. La Habana, Cuba Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 2004:127-284.
52. Mejía EZ. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra Latinoamericana. 1999;17(3):201-7.
53. Korsten L, De Villiers E, Wehner F, Kotzé J. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. Plant Disease. 1997;81(5):455-9.

54. Fernández-Larrea Vega O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. 2001.
55. Cuervo Lozada JP. Aislamiento y Caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales: Facultad de Ciencias; 2010.
56. Márquez F. Aislamiento y Taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Universidad Austral de Chile. 2007.
57. Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*. 2018;285:44-55.
58. Narayanasamy P. Biological management of diseases of crops: Springer; 2013.
59. Banerjee G, Gorthi S, Chattopadhyay P. Beneficial effects of bio-controlling agent *Bacillus cereus* IB311 on the agricultural crop production and its biomass optimization through response surface methodology. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2018;90(2):2149-59.
60. Layton C, Maldonado E, Monroy L, Ramírez LCC, Leal LCS. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*. 2011;9(16):177-87.
61. Rojas Badía MM, Sánchez Castro D, Rosales Perdomo K, Lugo Moya D. Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*. 2017;32(2):00.
62. Song M, Yun HY, Kim YH. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium cf. incarnatum*. *Journal of ginseng research*. 2014;38(2):136-45.
63. Ajilogba CF, Babalola OO, Ahmad F. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. *Studies on Ethno-Medicine*. 2013;7(3):205-16.

64. Manimaran P, Mohan K, Sekar R. Antagonistic activity of *Bacillus* species against basal rot disease of onion. *Journal of Mycology and Plant Pathology*. 2011;41(2):241.
65. Jagtap JDS, N. S. Potential of biocontrol agents against basal rot of onion caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cepae*. *International Journal of life sciences*. 2015(Special Issue: 2320 – 7817).
66. Sultana N, Ghaffar A. Effect of fungicides, microbial antagonists and oil cakes in the control of *Fusarium oxysporum*, the cause of seed rot and root infection of bottle gourd and cucumber. *Pak J Bot*. 2013;45(6):2149-56.
67. Logan NA, Turnbull CBP. *Bacillus* and recently derived genera. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Seventh edition. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.p. 357-69.
68. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr, editores. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Fifth edition. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams and Wilkins; 1997 p.651-708.
69. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA. 203 p.
70. Orias-Lezama, Lydio. "Tesis, Licenciatura en Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Agrarias, Heredia (Costa Rica). Evaluación de pérdidas post-cosecha causadas por patógenos en cebolla (*Allium cepa* L.) veranera, sometida a diferentes períodos y temperaturas de almacenamiento." 1988.
71. Malik, K. A. 1991. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7:629-632
72. Velicier, G. J.; Kross, L.; Lenski, R. E. 1998. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 95: 12376-12380
73. Cook R.S Y K.F Baker. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. The American Phytopathological Society, St.Paul. 1983. 539 pp.

74. Constanza L., Sanchez L., Evaluacion del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. 2011:63-75 pp.
75. Patiño, L Rodríguez, M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más relevantes en vid (*Vitis vinífera*), variedad chardonnay en el viñedo San Martín del municipio de Sogamoso, departamento de Boyacá. Trabajo de grado por el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias Básicas.
76. Ragazzo Sanchez JA, Robles Cabrera A. Selección de cepas de *Bacillus* spp, productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo serie horticultura* 2011;17(1):5-11.
77. BUTT, T. M.; HARRIS, J. G.; POWELL, K. A. 1999. Microbial biopesticides: The European Scene, pp. 23-44. In: *Biopesticides use and delivery*. HILL, F. R.; MENN, J. J. (eds.). Humana Press. New Jersey, USA.
78. CAVAGLIERI, L. R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. G. 2004. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biological Control* 31: 259-267.
79. JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology* 99: 4603-4608.
80. VOLPON, L.; BESSON, F.; LANCELIN, J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS Letters* 485: 76-80.
81. HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* 61: 693-698.
82. Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, et al. "Surfactin and fengycin Lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants." *Environ Microbiol* 2007; 9 (4):1084–90.

83. Brar, D.S. & Khush, G.S. 2002. "Transferring genes from wild species into rice." In Kang, M.S. ed. Quantitative genetics, genomics and plant breeding, p. 197-217, Oxford, CABI.
84. Gu Q., Yang Y., Yuan Q., Shi G., Wu L., Lou Z., Huo R., Wu H., Borriss R., Gao X. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017;83:1–17. doi: 10.1128/AEM.01075-17
85. Chen X.H., Vater J., Piel J., Franke P., Scholz R., Schneider K., Koumoutsi A., Hitzeroth G., Grammel N., Strittmatter A.W., et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 2006;188:4024–4036. doi: 10.1128/JB.00052-06.
86. Öztürk S, Çalık P, Özdamar TH. Fed-Batch Biomolecule Production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. *Trends Biotechnol.* 2016;34(4):329–45.
87. G Sotomayor-Garcia L. G, 2011, Efecto de antagonistas microbianos a *Sclerotinia sclerotiorum* en el desarrollo de apotecia y la incidencia de moho blanco en frijo, Tesis de maestria. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.
88. Chen Z., li Q., Liu H. M., Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1353-1360.
89. JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. 2002. Biological control of post-harvest diseases of fruit. *Annual Review of Phytopathology* 40: 411–441.



ANEXOS

Anexo N° 1:

Secado de las muestras en bandejas plásticas de 40 x 25cm.



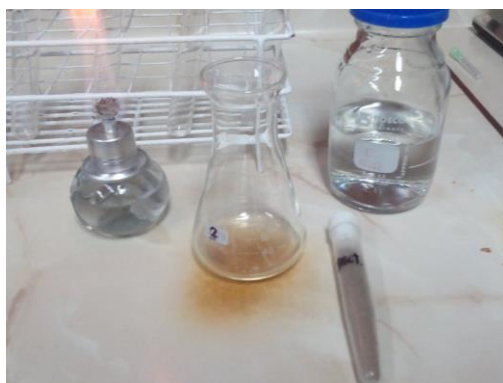
Anexo N° 2:

Método cruz, muestra dividida en 4 secciones.



Anexo N° 3:

Matraz y muestra diluida en agua estéril; baño María con termómetro.



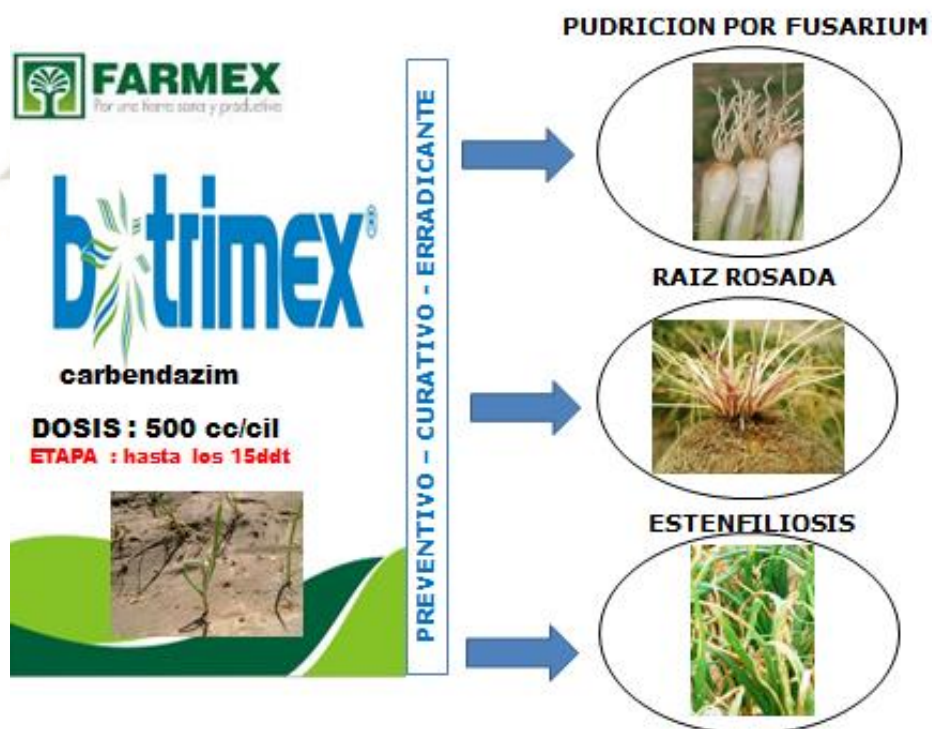
Anexo N° 4:

Filtro PVDF 0.2µm y su acoplamiento a jeringa de 5ml para extraer medio libre de microorganismos y partículas.



Anexo N° 5:

Preparación de los fungicidas sintéticos.



	<i>FICHA TÉCNICA</i>		Revisión: 05 Aprobado: JR Fecha: 08-09-17 Página 2 de 3
			

CUADRO DE USOS

CULTIVO	PLAGA		DOSIS		PC	LMR
	Nombre Común	Nombre Científico	L/ ha	L/200L	(días)	(ppm)
ARÁNDANO	Muerte regresiva	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1 - 2	-	26	0.5
ESPÁRRAGO	Fusariosis del espárrago	<i>Fusarium oxysporum f.sp. asparagi</i>	0.8 - 1	-	7	0.05
	Fusariosis del espárrago	<i>Fusarium moniliforme</i>	0.4	-		
PALTO	Muerte regresiva	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1	-	13	0.01
PAPA	Chupadera fungosa	<i>Rhizoctonia solani</i>	-	0.3 - 0.5	62	0.05
VID	Muerte regresiva	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1	-	14	0.01

PC: Periodo de Carencia (días)

LMR: Límite máximo de residuo (ppm. Partes por millón).

REGISTROS Y TOLERANCIAS DE RESIDUOS

Para informarse sobre los límites máximos de residuos (LMR) o tolerancias establecidas en los principales cultivos, visite los siguientes links:

EU Pesticide Database: (Comunidad Europea)

<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>

Environmental Protection Agency: (Estados Unidos)

http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&sid=1c8cd959ef0d373fb7620f42c8445cca&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40cfr180_main_02.tpl

TELÉFONOS DE EMERGENCIA
CICOTOX: 328 7700
ESSALUD: 411 8000 (opción 4)
CISPROQUIM: 0800-50847

Calle Arica 242 Miraflores, Lima 18 - Perú. Teléfono 51(1) 617-3300
 Correo electrónico: sec@silvestre.com.pe Página web: www.silvestre.com.pe

Anexo N° 6:

Análisis electroforético del ADN extraído de la muestra “Bacillus 1” tras 10 minutos a 110v y 300mA.



Anexo N° 7:

Control de “Fusarium a” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de sobreposición.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)
Control 1 Fa	11	27	36
Control 2 Fa	11	28	37
Control 3 Fa	10	27	35

Anexo N° 8:

Control de “Fusarium b” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de sobreposición.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)
Control 1 Fb	10	23	33
Control 2 Fb	11	24	33
Control 3 Fb	10	22	32

Anexo N° 9:

Control de “Fusarium a” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de enfrentamiento dual.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)
Control 1 FA	7	13	18
Control 2 FA	7	14	19
Control 3 FA	7	12	17

Anexo N° 10:

Control de “Fusarium b” en milímetros por triplicado a las 24, 48 y 72 horas mediante el método de enfrentamiento dual.

	24h (en mm)	48h (en mm)	72h (en mm)
Control 1 FB	5	11	15
Control 2 FB	5	11	17
Control 3 FB	5	10	16

Anexo N° 11:

Crecimiento del “Fusarium a” enfrentado a los diferentes fungicidas comerciales, agua y metabolitos provenientes de Bacillus 1.



Anexo N° 12:

Crecimiento del “Fusarium b” enfrentado a los diferentes fungicidas comerciales, agua y metabolitos provenientes de Bacillus 1.



Anexo N° 13:

Secuencia en formato fasta obtenida mediante el método Sanger en un secuenciador ABI3730X1.

```
CAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTAC
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGcaaCGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTanaCGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGgtttccGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGcatTAAGCACTCCGCTGGGGAGTacggTCGCAAGACTGaaacTCAAAGG
```

Anexo N° 14:

Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 1.

<i>horas</i>	Medio 1	medio 1.2	medio 1.3
0	4600000	4500000	4700000
4	5500000	5700000	5600000
8	14100000	14100000	13800000
12	53300000	53100000	52600000
16	70100000	70400000	69500000
20	140800000	139600000	139600000
24	311400000	308600000	310000000
28	582300000	578300000	579400000
32	627400000	629900000	632700000
36	585600000	612000000	602400000
40	580100000	578300000	581600000
44	529900000	531500000	528600000
48	490500000	490700000	488800000
52	471000000	469300000	469700000
58	449400000	451000000	449600000

Anexo N° 15:

Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 2.

<i>horas</i>	medio 2.1	medio2.2	medio2.3
0	4810000	4780000	4810000
4	5480000	5370000	5350000
8	12870000	13010000	13120000
12	55300000	55760000	53940000
16	88670000	88830000	89500000
20	169800000	170200000	170000000
24	351700000	351600000	346700000
28	641000000	640500000	638500000
32	776100000	778900000	785000000
36	830500000	830100000	829400000
40	801000000	800000000	799000000
44	678000000	683000000	679000000
48	519000000	519000000	522000000
52	487000000	480000000	494000000
58	462000000	461000000	457000000

Anexo N° 16:

Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 3.

<i>horas</i>	medio 3.1	medio 3.2	medio 3.3
0	4700000	4800000	4900000
4	5320000	5270000	5310000
8	12600000	11900000	11500000
12	54200000	55700000	55100000
16	92200000	91800000	92000000
20	167000000	163000000	150000000
24	331000000	331000000	328000000
28	644000000	649000000	657000000
32	797000000	821000000	812000000
36	824000000	819000000	817000000
40	822000000	820000000	818000000
44	755000000	753000000	742000000
48	640000000	699000000	671000000
52	578000000	578000000	584000000
58	522000000	517000000	521000000

Anexo N° 17:

Tabla de datos para la elaboración de la curva de crecimiento de “Bacillus 1” en el medio propuesto 4.

<i>horas</i>	medio 4.1	medio 4.2	medio 4.3
0	4600000	4700000	4500000
4	5600000	5400000	5500000
8	14100000	13700000	14200000
12	55800000	55800000	56400000
16	91700000	91900000	92400000
20	155000000	158000000	167000000
24	340000000	343000000	337000000
28	644000000	639000000	637000000
32	758000000	761000000	761000000
36	770000000	769000000	771000000
40	758000000	761000000	761000000
44	715000000	731000000	714000000
48	665000000	671000000	674000000
52	612000000	607000000	611000000
58	570000000	569000000	571000000