

“EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DEL JUGO DE FIQUE (*Furcraea gigantea* Vent.) FERMENTADO CON *Bacillus megaterium* M46 CONTRA *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.”

**FERNANDO JAVIER MARTÍNEZ SOLARTE
ZHAIRA STEPHANIE PARRA GUERRERO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2011**

“EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DEL JUGO DE FIQUE (*Furcraea gigantea* Vent.) FERMENTADO CON *Bacillus megaterium* M46 CONTRA *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.”

**FERNANDO JAVIER MARTÍNEZ SOLARTE
ZHAIRA STEPHANIE PARRA GUERRERO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial**

**ASESOR
Ph.D PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO
Decano de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias Exactas**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2011**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º del acuerdo 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación:

MSc. DOLLY REVELO

Dr. OSWALDO OSORIO

San Juan de Pasto, Septiembre de 2011

DEDICATORIA

A ti Señor, porque siempre has estado conmigo, no dejaste que desmayara, me has dado fortaleza, sé que siempre me ayudarás y siempre me sostentarás con tú mano.

A mis Padres y a mi Hermano, por su amor, respaldo y apoyo incondicional.

Y a quienes de una forma u otra han hecho de mí lo que soy.

Gracias.

Fernando Javier Martínez Solarte

Al Dios de los cielos y la tierra, por ser mi guía, mi luz, mi refugio, mi sustentador y mi fuerza, por su amor, misericordia y bondad, por estar siempre presente en mi vida y en mi familia, por todas y cada una de las innumerables cosas bellas que me ha regalado.

A mis Padres, por su apoyo y respaldo en todo momento.

Y a todas aquellas personas que estuvieron presentes en mi formación profesional.

Zhaira Stephanie Parra Guerrero

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a:

A la Universidad de Nariño por permitirnos la terminación de nuestra carrera profesional.

Al Ministerio de Agricultura por la financiación de este trabajo de investigación.

Al Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria TEA, por el apoyo logístico para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Ph.D Pablo Fernández Izquierdo por su apoyo, asistencia y contribuciones en el desarrollo del trabajo de grado.

Ph.D Andrés Hurtado por su asesoría y colaboración brindada.

Ph.D Oswaldo Osorio por las correcciones del trabajo de grado.

MSc. Dolly Revelo por su dirección, colaboración, asesoría y correcciones del trabajo de grado.

Al personal del laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, por la colaboración suministrada.

A todos aquellos que han contribuido de alguna manera a la terminación de este proyecto de investigación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1 FIQUE (<i>Furcraea</i> spp.)	23
4.2 JUGO DE FIQUE (<i>Furcraea</i> spp.).....	24
4.3 GÉNERO <i>Bacillus</i>	25
4.3.1 <i>Bacillus megaterium</i>	25
4.3.1.1 Cultivo de <i>Bacillus megaterium</i>	26
4.4 METABOLITOS SECUNDARIOS BACTERIANOS.....	27
4.5 PHYTOPHTHORA INFESTANS	28
5. ESTADO DEL ARTE.....	30
6. METODOLOGÍA	34
6.1 MICROORGANISMO.....	34
6.2 OBTENCIÓN DE JUGO DE FIQUE.....	34
6.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus megaterium</i> M46 EN CADA MEDIO DE CULTIVO	34
6.4 SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE JUGO DE FIQUE PARA EL CRECIMIENTO DE <i>Bacillus megaterium</i> M46 CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA PARA EL CONTROL DEL FITOPATÓGENO <i>Phytophthora infestans</i>	35
6.4.1 Diseño de experimentos para la selección del mejor medio de cultivo	35
6.4.2 Medios de cultivo evaluados.	35
6.4.3 Activación de <i>Bacillus megaterium</i> M46	36

6.4.4	Fermentación	36
6.4.5	Inhibición in vitro del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i>	36
6.5	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN MODIFICANDO CANTIDAD DE INÓCULO, EDAD DE INÓCULO, TEMPERATURA Y AGITACIÓN	37
6.5.1	Cantidad y edad de inóculo:	37
6.5.1.1	Diseño de experimentos.	37
6.5.1.2	Activación de <i>Bacillus megaterium</i> M46.	38
6.5.1.3	Fermentación	38
6.5.2	Temperatura y agitación	39
6.5.2.1	Diseño de experimentos	39
6.5.2.2	Activación de <i>Bacillus megaterium</i> M46	40
6.5.2.3	Fermentación.	40
6.6	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL MEDIO OPTIMIZADO CONTRA <i>Phytophthora infestans</i>	40
6.6.1	Diseño de experimentos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra <i>Phytophthora infestans</i>	41
6.6.1.1	Activación de <i>Bacillus megaterium</i> M46	41
6.6.1.2	Fermentación.	41
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1	PERFIL DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus megaterium</i> M46 EN CADA UNO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	42
7.2	SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE JUGO DE FIQUE PARA EL CRECIMIENTO DE <i>Bacillus megaterium</i> M46 CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA PARA EL CONTROL DEL FITOPATÓGENO <i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	45
7.3	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN MODIFICANDO CANTIDAD DE INÓCULO, EDAD DE INÓCULO, TEMPERATURA Y AGITACIÓN	49
7.3.1	Cantidad de inóculo y edad de inóculo	50
7.3.2	Temperatura y agitación	53

7.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL MEDIO OPTIMIZADO CONTRA <i>Phytophthora infestans</i>	57
8.	CONCLUSIONES	64
9.	RECOMENDACIONES	65
	BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estructura física de la hoja de fique (<i>Furcraea</i> spp.)	23
Tabla 2. Composición química de la hoja de fique (<i>Furcraea</i> spp.)	24
Tabla 3. Medio mínimo para el crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> (medio químicamente definido para el crecimiento de bacterias heterotróficas).....	26
Tabla 4. Composición del medio de cultivo para el desarrollo y mantenimiento de <i>Bacillus megaterium</i>	27
Tabla 5. Composición de los medios de cultivo	35
Tabla 6. Niveles del Diseño Factorial 2 ² para cantidad y edad de inóculo	38
Tabla 7. Combinaciones de los factores cantidad y edad de inóculo del Diseño Factorial 2 ²	38
Tabla 8. Niveles del Diseño Factorial 2 ² para temperatura y agitación	39
Tabla 9. Combinaciones de los factores temperatura y agitación del Diseño Factorial 2 ²	40
Tabla 10. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según los medios de cultivo	46
Tabla 11. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según los medios de cultivo	46
Tabla 12. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según los medios de cultivo	47
Tabla 13. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según cantidad y edad de inóculo.....	50
Tabla 14. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según cantidad y edad de inóculo (Diseño Factorial 2 ²)	51
Tabla 15. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según cantidad y edad de inóculo (Comparación de múltiples muestras)	51

Tabla 16. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según cantidad y edad de inóculo (Comparación de múltiples muestras)	52
Tabla 17. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según temperatura y agitación	54
Tabla 18. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según temperatura y agitación (Diseño Factorial 2 ²)	54
Tabla 19. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según temperatura y agitación (Comparación de múltiples muestras)	55
Tabla 20. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> evaluando temperatura y agitación (Comparación de múltiples muestras)	55
Tabla 21. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> presentado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones (10.000 a 50.000 mg*L ⁻¹)	57
Tabla 22. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según las concentraciones de 10.000 a 50.000 mg*L ⁻¹	58
Tabla 23. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según las concentraciones de 10.000 a 50.000 mg*L ⁻¹	58
Tabla 24. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) presentado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones dentro del rango de 10.000 a 20.000 mg*L ⁻¹	60
Tabla 25. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> mostrado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones dentro del rango de 10.000 a 20.000 mg*L ⁻¹	60
Tabla 26. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora</i>	

infestans mostrado por el medio optimizado para las diferentes
concentraciones dentro del rango de 10.000 a 20.000 mg*L⁻¹..... 61

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Curva de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> M46 en los medios de cultivo M1, M2 y M3	42
Figura 2. Consumo de azúcares de <i>Bacillus megaterium</i> M46 en los medios de cultivo M1, M2 y M3	44
Figura 3. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según los medios de cultivo	48
Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según los medios de cultivo	49
Figura 5. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según cantidad y edad de inóculo.....	53
Figura 6. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> según la temperatura y agitación	56
Figura 7. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> con el medio de cultivo optimizado para las concentraciones de 10.000 a 50.000 mg*L ⁻¹	59
Figura 8. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> con el medio de cultivo optimizado evaluando las concentraciones de 10.000 a 20.000 mg*L ⁻¹	62
Figura 9. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Phytophthora infestans</i> a 15.000 mg*L ⁻¹ después de 16 días	63

GLOSARIO

ABSORBANCIA: Es la medida de energía radiante o flujo radiante que es absorbido por un material o una superficie como función de la longitud de onda de dicha energía o flujo. Es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI): Concentración mínima que causa la máxima inhibición del crecimiento radial.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Es un conjunto de experimentos o pruebas, de tal manera que los datos generados puedan analizarse estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas acerca de un sistema o proceso.

FACTORES: Variables que influyen en el sistema y que pueden ser controladas por el investigador.

FERMENTACIÓN: Proceso de reacciones bioquímicas para la obtención de energía, por parte de los microorganismos.

FIQUE (*Furcraea* spp.): Plantas grandes, de tallo erguido, densamente poblado de hojas de color verde, en forma radial, angostas, carnosas, puntiagudas, acanaladas, y dentado espinosas.

FITOPATÓGENO: Microorganismo, que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular, causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, por la absorción de nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

FUNGICIDA: Agente que destruye los hongos.

INÓCULO: Suspensión de microorganismos que se transfieren a un medio de cultivo a través de la inoculación.

SACAROSA: Compuesto químico carbonatado cuya fórmula empírica es $C_{12}H_{22}O_{11}$ que en química se denomina azúcar.

SUSTRATO: Medio sobre el que crece un organismo.

RESUMEN

Se evaluó a nivel *in vitro* la actividad antagónica del jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) sin fermentar (MB) y de tres tratamientos correspondientes a jugo de fique fermentado con la bacteria *Bacillus megaterium* M46 (M1, M2 y M3), frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary causante del tizón tardío de la papa. Para la selección del mejor tratamiento se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) que permitió determinar que M3 presentó el mejor porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* del 84.81%. Para optimizar las condiciones de fermentación de M3, se utilizó un diseño factorial 2² modificando cantidad y edad de inóculo, temperatura y agitación y se estableció que la mejor combinación entre cantidad y edad de inóculo fue del 15% v/v y 48 horas respectivamente con un PI del 94.20% y para los factores de temperatura y agitación la mejor combinación fue de 35°C y 100 rpm respectivamente con un PI del 94.27%. Finalmente se encontró que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de M3 optimizado fue de 15.000 mg*L⁻¹. Esta investigación demostró que al fermentar el jugo de fique con *B. megaterium* M46 y sin el requerimiento de fuentes de carbono y otros nutrientes adicionales, se incrementa el efecto antagónico frente a *P. infestans* evidenciando su potencial para el control biológico del fitopatógeno.

Palabras clave: Jugo de fique, *Bacillus megaterium* M46, *Phytophthora infestans*, porcentaje de inhibición (PI).

ABSTRACT

Was evaluated at *in vitro* antagonistic activity of sisal juice (*Furcraea gigantea* Vent.) unfermented (MB) and three treatments for sisal juice fermented with the bacteria *Bacillus megaterium* M46 (M1, M2 and M3), against phytopathogen *Phytophthora infestans* (Mont.) Of Bary causes potato late blight. To select the best treatment we used a completely randomized design (CRD) which identified that M3 had the best percentage inhibition (PI) mycelial growth of *P. infestans* of 84.81%. To optimize the fermentation conditions of M3, we used a factorial design 2^2 modifying quantity and age of inoculum, temperature and agitation was established that the best combination between quantity and age of inoculum was 15% v/v and 48 hours respectively with a PI of 94.20% and for the factors of temperature and stirring the best combination was 35°C and 100 rpm respectively with a PI of 94.27%. Finally it was found that the minimum inhibitory concentration (MIC) of optimized M3 was 15.000 mg*L⁻¹. This research showed that the sisal juice fermented with *B. megaterium* M46 and without the requirement for carbon and other sources of additional nutrients, increases the antagonistic effect against *P. infestans* showing its potential for biological control of phytopathogen.

Keywords: Sisal juice, *Bacillus megaterium* M46, *Phytophthora infestans*, percentage inhibition (PI).

INTRODUCCIÓN

En Colombia, el cultivo de fique es un sector con importante connotación de índole económica y social, de éste dependen económicamente en el país 70.000 familias (MADR, IICA & CORPOICA, 2004).

Ambientalmente los residuos generados por el beneficio del fique son considerados altamente contaminantes, siendo el jugo el más representativo, por esto se están buscando alternativas para darle un aprovechamiento, evaluando sus propiedades como agente de control biológico ya que es una sustancia que se caracteriza por tener propiedades tensoactivas, plaguicidas y por poseer esteroides naturales entre los que se han encontrado saponinas y fitoesteroles (Gómez & Vanegas, 2001). Con base en esto se han realizado estudios *in vitro* del extracto de fique para determinar su acción biocida sobre la estructura micelial y conidial de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora infestans* causantes de las enfermedades conocidas como “Pudrición Algodonosa del Lulo” (*Solanum quitoense*), “Antracnosis del Tomate de Árbol” (*Solanum betacea*) y “Tizón tardío” o “Gota de la Papa” (*Solanum tuberosum*) respectivamente (Gómez H., 2001; Álvarez *et al.*, 2010). Los estudios muestran que el jugo de fique puede ser empleado para controlar dichas plagas vegetales como alternativa al uso de compuestos químicos que tienen incidencias negativas en el ambiente, así como en la salud humana (Santoyo *et al.*, 2010).

Otra opción para el aprovechamiento del jugo es el uso de microorganismos propios de éste. Rodríguez *et al.* (2010), encontró numerosas bacterias presentes en el jugo de fique de la variedad Negra Común, las cuales demostraron capacidad antagónica frente al fitopatógeno *P. infestans*, siendo la más representativa la bacteria identificada mediante pruebas API 50 CHB como *Bacillus megaterium* M46. Por lo tanto, ésta bacteria fue objeto de estudio en el presente trabajo de investigación.

En esta investigación se planteó evaluar *in vitro* el efecto antagónico del jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) fermentado con *B. megaterium* M46 contra *P. infestans* causante de la gota en la papa.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente de la planta de fique sólo se aprovecha el 4% como materia prima para obtención de fibra, los residuos del proceso de extracción constituyen el 96%, de los cuales el jugo es el 70% (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN, 2006). Estos residuos ocasionan contaminación de las aguas debido a las propiedades fisicoquímicas de los jugos por cuanto estos contienen un alto contenido de azúcares, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa, además proteínas sapogénicas, esteroides y minerales que como lo demuestra un estudio realizado por la Universidad el Bosque son extremadamente tóxicos para peces y organismos acuáticos (Martínez & Caicedo, 2002).

Por otra parte, el uso indiscriminado de plaguicidas afecta significativamente los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), el cual es uno de los principales productos agrícolas de las zonas de clima frío. El principal limitante del cultivo es la goma de la papa, enfermedad causada por el fitopatógeno *Phytophthora infestans*, el cual llega a causar pérdidas hasta del 100% de la producción cuando se presentan condiciones óptimas para su desarrollo. Por lo tanto, el agricultor al no contar con variedades resistentes al patógeno se ve obligado a realizar continuas aplicaciones (12 durante el ciclo de cultivo) de productos químicos y sistémicos para su control, los cuales incrementan los costos de producción y ocasionan una disminución en sus ingresos sin contar con el impacto ambiental que se genera. Este tipo de manejo, sin criterios técnicos, ha generado problemas graves como la resistencia del patógeno a fungicidas comercialmente utilizados (Arnason *et al.*, 1989).

Ahora bien, la aplicación del jugo de fique para el control de enfermedades en diferentes cultivos se ha realizado de manera artesanal por los agricultores, quienes han comprobado de manera empírica su efecto, no obstante en la actualidad este jugo no está siendo aprovechado de forma alguna y está causando un grave impacto ambiental (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN, 2006). En la actualidad se están proponiendo otras alternativas al uso de fungicidas comerciales como la utilización de productos elaborados por algunas especies del género *Bacillus* (Orietta y Larrea, 2002), en la flora nativa del jugo de fique existe una gran variedad de especies del género *Bacillus* con capacidad antagónica contra *P. infestans*, dentro de las cuales se destaca la bacteria *Bacillus megaterium* M46 (Rodríguez *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta donde se ha realizado la revisión de literatura, no se han encontrado estudios que evalúen el efecto antagónico de *B. megaterium* frente a fitopatógenos ni del jugo de fique fermentado con esta bacteria, por esta razón se carece de parámetros de comparación del efecto antagónico que puede mostrar contra *P. infestans*.

Con base en estos hallazgos se deben explorar nuevas alternativas para el aprovechamiento del jugo de fique tales como la evaluación de este jugo

fermentado con *B. megaterium* M46. Con esta investigación se podrá contribuir a la disminución de los problemas ambientales ocasionados por el jugo de fique y al desarrollo de nuevos productos beneficiando a los agricultores en el control de la gota o tizón tardío de la papa causado por *P. infestans*.

Con este proyecto se pretende responder la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto del jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) al fermentarlo con *Bacillus megaterium* M46 contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary causante de la gota en la papa?

2. JUSTIFICACIÓN

En el departamento de Nariño, se producen aproximadamente 103.000 toneladas/año de jugo de fique, que actualmente no está siendo aprovechado de forma alguna y está causando un grave impacto ambiental en los suelos y fuentes naturales de agua (Martínez & Caicedo, 2002).

Por otro lado, la “gota o tizón tardío” causado por el fitopatógeno *Phytophthora infestans*, se constituye en el agente fitopatológico más perjudicial de la papa en las zonas húmedas del mundo y en Colombia, se reporta como el limitante de mayor incidencia en el cultivo (Lagos, 2002), debido principalmente a condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno y a la siembra de materiales altamente susceptibles, como las variedades Diacol, Capiro, Parda, Pastusa, ICA, Nevada y Tuquerreña (Jaramillo, 2004). Otro autor señala que el uso de pesticidas es por tradición la única alternativa de control ante éste problema fitosanitario (Rodríguez, 1996), sin embargo, el uso excesivo trae como consecuencias problemas ambientales de diferente tipo.

En países en vías de desarrollo el 80% de las cosechas se ven aniquiladas por plagas, así como por enfermedades producidas por microorganismos como bacterias, hongos y virus. Este es considerado uno de los problemas más importantes a nivel mundial para la agricultura. La forma de combatirlas ha sido mediante el uso de productos químico-sintéticos, los cuales son rápidos y efectivos, pero también se caracterizan por no ser específicos, es decir, además de eliminar a los organismos que dañan a la planta, también lo hacen con los que son benéficos para ella. (Rangel *et al.*, 2010).

El uso irracional de los productos químicos ha traído también como consecuencia un alto grado de contaminación de tierras de cultivo, mantos acuíferos, etc., son una amenaza a la salud y la calidad de vida humana por el hecho de dejar residuos tóxicos en el suelo y alimentos, además, debido al uso indiscriminado de este tipo de productos se está generando resistencia a ellos lo cual supone una grave situación para la producción agrícola. Tan solo en los últimos años se han registrado que más de 504 especies de insectos son resistentes al menos a una formulación de insecticidas y 17 especies de insectos son resistentes a todas las principales clases de insecticidas (Rangel *et al.*, 2010).

Debido a la gran cantidad de residuos tóxicos que origina el uso de insecticidas químicos, los científicos se han dado a la tarea de extraer sustancias biológicas, realizar ingeniería genética o usar organismos vivos para el control de plagas y enfermedades que afectan a la agricultura. Esto ha creado la necesidad de desarrollar otras medidas de control de plagas, conocidas como “control biológico”, ya sean bioinsecticidas, biofungicidas y plantas transgénicas, se han presentado

como una excelente alternativa, ya que no requieren del uso de químicos sintéticos (Rangel *et al.*, 2010).

Para el desarrollo de esta investigación se planteó el uso de la bacteria *Bacillus megaterium* M46 con base en las pruebas de antagonismo contra *P. infestans* realizados por los grupos de investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño, que demostraron que esta bacteria presentó la mejor inhibición con respecto a un total de 67 morfotipos (23 de levaduras y 44 de bacterias) aislados del jugo de fique de la variedad Negra Común. Para esta evaluación emplearon la técnica de sensidiscos impregnados con extractos de los metabolitos bacterianos después de un proceso de fermentación controlado (Rodríguez *et al.*, 2010).

En otras investigaciones se ha evaluado la capacidad de bacterias del genero *Bacillus*, como entes de control biológico en cultivos de tomate, aguacate, plátano, arroz y cebolla, cuyos resultados muestran la capacidad de inhibición en el crecimiento de fitopatógenos del suelo como *Fusarium oxysporium*, *Fusarium lycopersici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani* (Brada *et al.*, 1995; Castellanos *et al.*, 1995; Korsten *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2001).

Por lo tanto, se consideró importante evaluar *in vitro* el efecto antagónico del jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) fermentado con *B. megaterium* M46 contra *P. infestans* causante del tizón tardío en la papa, ya que los resultados de esta investigación pueden contribuir al aprovechamiento del jugo de fique y a su valorización. Se propone obtener un producto con valor comercial y alto potencial de comercialización que mitigue el impacto ambiental causado por el jugo de fique como residuo y a atacar el problema originado por *P. infestans* en los cultivos de papa.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar in vitro el efecto del jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) fermentado con *Bacillus megaterium* M46 contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar un medio de cultivo a base de jugo de fique para el crecimiento de *Bacillus megaterium* M46 con actividad antagónica para el control del fitopatógeno *Phytophthora infestans*.
- Optimizar las condiciones de fermentación modificando cantidad de inóculo, edad de inóculo, temperatura y agitación.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del medio optimizado contra *Phytophthora infestans*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 FIQUE (*Furcraea* spp.)

Son plantas grandes, de tallo erguido, su altura varía entre 2 y 7 metros, densamente poblado de hojas de color verde, en forma radial, largas (1 a 3 m), angostas (10 y 20 cm), carnosas, puntiagudas, acanaladas y dentadas, en algunas variedades, presenta líneas o estrías tenues. Pueden encontrarse plantas con más de 50 años de edad, pero su periodo típico de vida varía entre 10 y 20 años. Poseen gran cantidad de raíces que se expanden y enraízan profundamente haciéndola una planta antierosiva. Su vida útil (producción de fibra, jugos, etc.) comienza entre los 3 y 6 años, dependiendo de las condiciones que enfrente (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN, 2006).

En Colombia, ésta planta crece casi en todos los climas, desde las llanuras costeras hasta los 3.000 metros de altura, pero como cualquier otra planta económica, requiere ciertas condiciones climáticas para su normal desarrollo y alta productividad. En términos generales, las condiciones climáticas óptimas para el cultivo del fique son: temperatura entre los 19 y 23°C, altura entre 1.300 y 1.900 m.s.n.m., humedad relativa entre el 50 y 70% y una luminosidad promedio de 5 a 6 horas diarias (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN, 2006).

Tanto sus características físicas como su composición química varían según la planta y el cultivo. La composición porcentual de los productos se observan en la Tabla 1 y en la Tabla 2, se muestra la caracterización química de la hoja del fique.

Tabla 1. Estructura física de la hoja de fique (*Furcraea* spp.)

Componente	Porcentaje en la hoja	Porcentaje útil	Usos
Fibra	5	4	En la industria textil, empaques
Jugo	70	40	Extracción de esteroides
Estopa	8	3	Pulpa de papel
Bagazo	17	10	Material de construcción, abonos

Fuente: Arroyave & Velásquez, 2001

Tabla 2. Composición química de la hoja de fique (*Furcraea* spp.)

Fibra		Jugo	Bagazo	
Cenizas	0.7%	Clorofila	Cenizas	12.2%
Celulosa	73.8%	Carotenoides	E.E.	3.64%
Resinas, ceras y grasas	1.9%	Saponinas Azúcares	Proteína Elementos Nitrogenados	9.84% 71.29%
Lignina	11.3%	Resinas	Calcio	21.65%
Pentosanos	10.5%	Flavonoides Ácidos orgánicos	Fósforo Magnesio	0.09% 0.2%
TOTAL	98.2%	Alquitranes	Fósforo	1.81%
		Agua	Sodio	0.04%
		Lignina	Cobre	14 ppm
		Calcio	Hierro	647 ppm
		Lipoides	Manganeso	33 ppm
		Fósforo	Zinc	17 ppm

Fuente: Arroyave & Velásquez, 2001

4.2 JUGO DE FIQUE (*Furcraea* spp.)

Del desfibrado, queda un 96% de residuos y subproductos que, en general, se desechan. El jugo constituye el 70%, del cual hasta el 40% se puede extraer por prensado (torta); contiene saponinas y alcaloides que causan la muerte de peces. Estudios muestran que la concentración letal media CL50 (96 horas) de los jugos del fique es de 1 mg/L (miligramo por litro) o de 1 ppm (parte por millón) en alevinos de trucha arco iris de una pulgada, es decir, que 1 ppm es la concentración necesaria para matar la mitad de la población de peces que se estudiaron e igualmente que 3 ppm es la concentración crítica muriendo el total de peces expuestos para cada especie (Martínez & Caicedo, 2002).

Las saponinas al hidrolizarse, producen sapogeninas y azúcares. Las primeras son precursoras de hormonas y corticoides, entre los que se encuentra la hecogenina, que es un producto químico usado como precursor de hormonas, en la producción de pastillas anticonceptivas, un producto de alto valor comercial en la Industria Farmacéutica (MADR, IICA & CORPOICA, 2004).

El jugo de fique es una suspensión con características variables, dependiendo de la edad, la estación del año y la fertilidad del suelo. De color verde ocre, tiene un olor característico fuerte y es muy corrosivo. Su densidad media a escala experimental es de 1.02 Kg/L y su pH varía entre 4 y 5. Sus constituyentes se conocen en forma cualitativa, siendo agua, celulosa, materia orgánica y minerales, con los siguientes valores porcentuales (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN, 2006):

- ✓ 85% de humedad.
- ✓ 6% de celulosa. (D-glucosa)
- ✓ 8% parte orgánica y amorfa (Con sacarosa, proteínas, nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, saponinas y sapogeninas).
- ✓ 1% Minerales.

El jugo de fique presenta características especiales de tipo biocida pero no se ha podido establecer la composición química exacta. Mediante estudios fitoquímicos preliminares, llevados a cabo en la Universidad de Nariño (Benavides, Bacca y Ortiz, 2009), se ha logrado determinar la presencia de diversas sustancias en el jugo de fique, entre las que se encuentran alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides, quinonas y glucósidos cardiotónicos. Su presencia se encontró en jugos de dos variedades de fique, Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y Tunosa Común o Negra Común (*Furcraea gigantea*).

Cabe resaltar que además se ha descrito la flora microbiana presente en el jugo de fique, Rodríguez *et al.* (2010) encontraron un total de 67 morfotipos (23 levaduras y 44 bacterias), ocho morfotipos bacterianos y cinco levaduriformes mostraron mejor actividad antagónica frente a *Phytophthora infestans* y establecieron que la bacteria que presentó mayor inhibición corresponde al género *Bacillus*.

4.3 GÉNERO *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimioheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos, son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos. En medios de cultivo crecen como largas cadenas semejantes a caña de bambú y la proliferación máxima se obtiene con un pH de 7-7.4 en condiciones aerobias pero se produce desarrollo en ausencia de oxígeno y crecen en un rango de temperatura de 12 a 45°C (Koneman, 2001).

4.3.1 *Bacillus megaterium*. La fuente de aislamiento más común de esta cepa es el agua de río y heces fecales (Rheinheimer, 1987). Su forma es de bastón, característica del género *Bacillus*, de gran tamaño alcanzando en promedio de 1,2-1,5 μm de diámetro y de 2-5 μm de largo. La reacción de Gram es positiva, sus esporas son de forma elíptica y de paredes finas. Es estrictamente aerobia, desarrollándose en el rango de temperatura de 4 a 45°C y su reacción a la prueba

de catalasa es positiva (Gordon & William, 1973). Además, es productor de vitamina B12, productor de penicilina amidasa para penicilina sintética y produce enzimas que se utilizan para hacer los esteroides sintéticos (Vary, 2007).

4.3.1.1 Cultivo de *Bacillus megaterium*. En cuanto a los requerimientos nutricionales para cultivar *Bacillus megaterium*, es necesario proveer el ambiente bioquímico y biofísico apropiado. El ambiente bioquímico (nutricional) se hace disponible como medio de cultivo. Los medios de cultivo son empleados para el aislamiento y mantenimiento de cultivos puros y también son utilizados para la identificación de bacterias de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas (Todar, 2000).

Los medios de cultivo pueden ser clasificados en varias categorías dependiendo de su composición o uso. Un medio químicamente definido (sintético) (Tabla 3) es un medio en el que se conoce la exacta composición química. Un medio definido es un medio mínimo si provee sólo los nutrientes exactos (incluyendo algunos factores de crecimiento) necesarios para el crecimiento del organismo. La utilización de medios mínimos definidos requiere que el investigador conozca los requerimientos nutricionales exactos de los organismos en cuestión. Los medios definidos químicamente son de valor para el estudio de los requerimientos nutricionales mínimos de los microorganismos, para cultivos enriquecidos, y para una amplia variedad de estudios fisiológicos (Todar, 2000).

Tabla 3. Medio mínimo para el crecimiento de *Bacillus megaterium* (medio químicamente definido para el crecimiento de bacterias heterotróficas)

Componente	Cantidad	Función del componente
Sucrosa	10.0 g	C y fuente de energía
K ₂ HPO ₄	2.5 g	Buffer pH; fuente de P y K
KH ₂ PO ₄	2.5 g	Buffer pH; fuente de P y K
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0 g	Buffer pH; fuente de N y P
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20 g	Fuente de S y Mg ⁺⁺
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g	Fuente de Fe ⁺⁺
MnSO ₄ H ₂ O	0.007 g	Fuente de Mn ⁺⁺
Agua	985 ml	
pH 7.0		

Fuente: Todar, 2000

Otros autores señalan que para el desarrollo y mantenimiento de la cepa heterótrofa *B. megaterium*, se deben suministrar componentes de un medio complejo (indefinido) (Tabla 4), a base de extracto de levadura, KH₂PO₄ y MgSO₄ 7H₂O (Carrillo, 2003). Los medios complejos habitualmente contienen materiales

complejos de origen biológico tales como sangre, leche, extracto de levadura o extracto de carne, cuya composición química exacta es indeterminada (Todar, 2000).

Los medios complejos habitualmente proveen la gama completa de factores de crecimiento que pueden ser requeridos por un microorganismo por lo que pueden ser utilizados más prácticamente para cultivar bacterias desconocidas o bacterias cuyos requerimientos nutricionales son complejos (por ejemplo, organismos que requieren muchos factores de crecimiento) (Todar, 2000).

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para el desarrollo y mantenimiento de *Bacillus megaterium*

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	0.5 g
Proteosa peptona N°3	0.5 g
Casamino ácidos	0.5 g
Glucosa	0.5 g
Almidón soluble	0.5 g
Piruvato de sodio	0.3 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05 g
Agar Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Brözel & Cloete, 1992

4.4 METABOLITOS SECUNDARIOS BACTERIANOS

Los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por determinados microorganismos, normalmente en una fase tardía de su ciclo de crecimiento, cuyas características son (Castillo, Sosa y Scorza, 2004):

- No son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce. En estado natural, sus funciones se hallan ordenadas a la supervivencia de la especie, pero cuando los microorganismos que los producen se desarrollan en cultivo puro los metabolitos secundarios no desempeñan esa misión.
- Generalmente se producen como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí.

- Cada uno de estos productos es producido por un grupo muy reducido de organismos.
- La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea (degeneración de la raza), por lo que son muy importantes las técnicas de conservación de estos microorganismos.

Los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos, de los que se han descubierto más de 5000, cifra que aumenta a razón de una media aproximada de 300 por año, aunque la mayoría carecen de utilidad pues son tóxicos para los organismos vivos. Aproximadamente el 75% de los antibióticos conocidos son producidos por actinomicetos. Algunas especies son excepcionales productores de antibióticos, por ejemplo *Streptomyces gryseus* produce al menos 40 antibióticos diferentes (Castillo, Sosa y Scorza, 2004).

En el metabolismo secundario las fases de crecimiento se denominan trofofase, fase de crecimiento logarítmico donde normalmente no se producen los metabolitos secundarios, e idiofase, fase estacionaria donde normalmente se producen los metabolitos secundarios. Aunque es una simplificación pensar sólo en dos fases, esta simplificación permite comprender mejor la fermentación industrial de los metabolitos secundarios. Es decir, si se quiere producir un metabolito secundario primero se debe asegurar las condiciones apropiadas durante la trofofase para un buen crecimiento y después, se debe alterar esas condiciones en el momento adecuado para asegurar una excelente producción del metabolito secundario (Castillo, Sosa y Scorza, 2004).

4.5 PHYTOPHTHORA INFESTANS

El tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial. El nombre de *P. infestans*, se deriva de las palabras griegas phyto (planta), phthora (destructor) (Pérez y Forbes, 2008).

El desarrollo epidémico del “tizón tardío” depende en gran parte del efecto que tiene la humedad relativa y la temperatura sobre las distintas etapas del ciclo de vida de *P. infestans*. La germinación de los esporangios se reproduce a humedades relativas superiores al 90%, con una temperatura óptima entre 10-15°C, rango en el cual el fitopatógeno se desarrolla adecuadamente, esporula y libera las zoosporas, las cuales germinan y penetran en el tejido a través de estomas, lenticelas y heridas, produciendo nuevamente la enfermedad (Agrios, 2002).

La resistencia a fungicidas en el patógeno se determina por una menor sensibilidad que la normal a dichos productos. Esta resistencia es el resultado de mutaciones estables. La disminución temporal de la sensibilidad a un fungicida vendría a ser una adaptación del patógeno, sin embargo por no ser heredable puede ser revertida por cambios en las estrategias de control químico (Pérez y Forbes, 2008).

El tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum*) y del tomate (*Lycopersicum esculentum mill.*) son las enfermedades más importantes causadas por *P. infestans*. Además, se reportan ataques de este patógeno en pepino (*S. muricatum ait.*) y otras solanáceas (Pérez y Forbes, 2008).

5. ESTADO DEL ARTE

En la naturaleza existe una amplia gama de plantas que producen una diversidad de metabolitos tóxicos, tal característica les permite a éstas plantas actuar como antagonistas de patógenos bióticos y plagas. Su potencial antagónico se lo puede aprovechar mediante la preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos con resultados promisorios en laboratorio e invernadero (Frayre, 1993; Zabaleta, 2000; Granada, 2002).

Los insumos de origen vegetal han sido objeto de estudio en los últimos años con el fin de desarrollar una nueva alternativa para el control agroecológico de plagas y enfermedades en el sector agrícola, reduciendo así las desventajas ocasionadas por el uso de producto sintéticos con el mismo fin. Entre estos estudios, se encuentran los concernientes a los del jugo de fique. Acevedo & Serna (2004), realizaron una evaluación de las propiedades fungicidas del jugo del fique. Los estudios *in vitro* del extracto de fique realizados para determinar la acción biocida de esta sustancia sobre las estructuras micelial y conidial de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Sclerotinia sclerotiorum*, causantes de las enfermedades conocidas como "Pudrición Algodonosa del Lulo" (*Solanum quitoense*) y "Antracnosis del Tomate de Árbol" (*Solanum betacea*), demuestran que esta sustancia inhibe el desarrollo micelial de *C. gloeosporoides* cuando la concentración del extracto de fique en medio de cultivo PDA es superior al 5% y afecta la germinación conidial cuando la concentración del extracto es superior al 1%. Con respecto, al efecto sobre *S. sclerotiorum*, concentraciones de extracto de fique superiores al 4% inhibieron el desarrollo micelial del hongo en el medio de cultivo PDA.

Álvarez *et al.* (2010), evaluaron la respuesta de sensibilidad de *Phytophthora infestans* al bioinsumo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.). Los resultados mostraron que el asilamiento evaluado fue altamente susceptible a altas concentraciones del extracto de fique, definiendo $75.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ la concentración capaz de inhibir el crecimiento *in vitro*.

Por otro lado el uso del jugo de fique en la agricultura tradicional ha sido empírico y existen experiencias por parte de agricultores quienes hablan de las bondades de su utilización como repelente, fertilizante líquido edáfico, propiedades curativas en enfermedades foliares, de actividad sistémica, como herbicida, fungicida, insecticida y fertilizante (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN, 2006).

Benavides, Bacca y Ortiz (2009), encontraron dentro del estudio fitoquímico de jugo de fique, la presencia de diversas sustancias como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides, quinonas y glucósidos cardiotónicos, los cuales han sido evaluados como sustancias inhibidoras por otros autores.

Fuertes *et al.* (1998), demostraron que la presencia de flavonoides y alcaloides, presentes en las hojas de *Lupinus ballianus*, le confieren a ésta una marcada actividad antibacteriana y antifúngica. Esta acción antimicrobiana se debería a que los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas, actuando como venenos protoplasmáticos. La acción antibacteriana y antifúngica de los alcaloides se podría deber a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida.

Apablaza *et al.* (2002), realizaron dos experimentos para evaluar la actividad antifúngica de saponinas presentes en extractos de quillay sobre oídio de las cucurbitáceas (*Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea*) en condiciones de ataque natural y obtuvieron que a dosis bajas y medias se controla el oídio de las cucurbitáceas en un 42% y 49% respectivamente.

En la Universidad de Nariño, los grupos de investigación: Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y Biotecnología Microbiana, desarrollaron el proyecto denominado: "MICROORGANISMOS DEL JUGO DE FIQUE CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE AL PATÓGENO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary" y fue presentado en el XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas en Armenia (2010), en el cual realizaron el aislamiento de bacterias y levaduras presentes en el jugo de fique; seleccionaron los diferentes morfotipos de acuerdo a sus atributos culturales y microscópicos y realizaron una prueba de antagonismo contra el fitopatógeno *P. infestans*, empleando la técnica de sensidiscos impregnados con extractos de los metabolitos bacterianos y de levaduras obtenidos después de un proceso de fermentación controlado. Aislaron un total de 67 morfotipos (23 de levaduras y 44 de bacterias). Ocho morfotipos bacterianos y cinco de levaduras presentaron una buena inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. infestans*. De estos 1 bacteriano y 1 de levadura presentaron la mejor inhibición (Rodríguez *et al.*, 2010). Los morfotipos de bacterias y levaduras fueron conservados en tubos con Agar nutritivo inclinado y Agar YGC respectivamente, en refrigeración. La bacteria que presentó mayor inhibición (*Bacillus megaterium* M46), se tomó para el desarrollo de esta investigación, identificada mediante pruebas API 50 CHB (Rodríguez *et al.*, 2010).

En cuanto al género *Bacillus*, estudios demuestran que las bacterias de este género son efectivas para inhibir el desarrollo de hongos como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cactorum*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium cepivorum* y *Uromyces appendiculatus*, entre muchos otros (Hernández *et al.*, 2008).

Las potencialidades del género *Bacillus* sobre *Pseudomonas fluorescens* han sido señaladas por Kim, Cook y Weller (1997), quienes encontraron mayor control de patógenos del trigo cuando utilizaron *Bacillus* sp.

Las bacterias del genero *Bacillus* se han evaluado para el control de enfermedades fungosas, determinándose que las aplicaciones de *Bacillus subtilis* pre y poscosecha en aguacate tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Korsten *et al.*, 1997). Los mejores resultados fueron logrados con un tratamiento integrado que incluía aplicaciones de benomil y oxiclورو de cobre y control biológico, siendo este el primer informe de control biológico pre-cosecha en aguacate.

Otros estudios han determinado el efecto de bacterias del género *Bacillus*, sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *F. oxysporium* var *cubensis* (Brada *et al.*, 1995); también se han realizado pruebas *in vitro* con *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente (Torres *et al.*, 2001). Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *F. oxysporium*, *Fusarium lycopersici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Castellanos *et al.* (1995), evaluaron *B. subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre, determinándose que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos. Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas.

También se ha estudiado con *B. subtilis*, la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. Además se observaron vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas (Fernández, 2003).

Hernández *et al.* (2008), evaluaron *Bacillus* spp. para el control del crecimiento *in vitro* de *R. solani*, encontrándose que el rango de inhibición era de 29,3 a 40,4%, siendo la cepa B9 la más eficaz. Otro estudio similar realizado previamente (Lagunas *et al.*, 2001) reportó que aislamientos de *Bacillus firmus* también redujeron significativamente el crecimiento micelial *in vitro* del hongo *P. capsici*. Pereira De Melo (2005), reportó que la bacteria endofítica de yuca, *Bacillus pumilus*, presentó una fuerte inhibición contra los fitopatógenos *R. solani*, *Pythium* y *Sclerotium rolfsii*. Por medio de un método cromatográfico, se identificó que la sustancia antifúngica producida por la bacteria *B. pumilus*, fue la pumilacidina.

Reinoso *et al.* (2007), aislaron microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* a partir de muestras de suelo procedentes de regiones paperas. Los aislados bacterianos los emplearon en experimentos de tamizaje con el objetivo de determinar su posible efecto inhibitorio sobre el

crecimiento *in vitro* de *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya chrysanthemi*, *A. solani* y *R. solani*, agentes causales de la pudrición blanda bacteriana, el tizón temprano y la rizoctoniasis de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Entre los aislados más promisorios encontraron las cepas *Brevibacillus brevis* Q7, *Brevibacillus laterosporus* Q18 y *Brevibacillus laterosporus* G10, las que produjeron halos de inhibición con un diámetro igual o mayor de 20 mm en los experimentos realizados con las bacterias fitopatógenas, e inhibieron en más del 65% el crecimiento micelial de *A. solani* y *R. solani*.

6. METODOLOGÍA

6.1 MICROORGANISMO

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la cepa bacteriana identificada mediante pruebas API 50 CHB como *Bacillus megaterium* M46, microorganismo aislado del jugo de fique de la variedad Negra Común por Rodríguez *et al.* (2010), la cual se conservó en tubos con Agar Nutritivo inclinado en refrigeración.

6.2 OBTENCIÓN DE JUGO DE FIQUE

Se empleó hojas de fique de la variedad Negra Común (*Furcraea gigantea* Vent.) procedentes del Municipio de El Tambo (Nariño). El jugo se extrajo mediante un molino de rodillos en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño. El jugo de fique extraído se conservó a una temperatura de congelación de -10°C para evitar la degradación del mismo.

6.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE CRECIMIENTO DE *Bacillus megaterium* M46 EN CADA MEDIO DE CULTIVO

Se empleó la técnica de turbidimetría para observar la cinética de crecimiento del microorganismo con el propósito de determinar el tiempo de fermentación de los medios de cultivo, correspondiente al tiempo que le toma al microorganismo llegar al inicio de la fase estacionaria más 48 horas. Por otro lado, se usó la técnica de antrona para evaluar el consumo de azúcares de *Bacillus megaterium* M46 en cada uno de los medios de cultivo.

Para turbidimetría, se extrajeron 3 mL del medio fermentado y se tomó la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH DR/2010) a una longitud de onda de 620 nm.

Posteriormente para la técnica de antrona, esta muestra se llevó a centrifugación a 8000 rpm por 10 minutos (Centrifugadora SIGMA 2-16P) para precipitar el botón celular y se tomó del sobrenadante 500 µL, que se adicionaron a 5 mL de reactivo de antrona y 2 mL de agua destilada estéril; se agitó suavemente y se colocó en hielo, después se llevó a baño termostático (INDULAB 009-2-T) durante 10 minutos, se retiraron los tubos y por último se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.

Las mediciones se realizaron hasta que se estabilizó la curva de crecimiento.

6.4 SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE JUGO DE FIQUE PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus megaterium* M46 CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA PARA EL CONTROL DEL FITOPATÓGENO *Phytophthora infestans*

6.4.1 Diseño de experimentos para la selección del mejor medio de cultivo.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y la unidad experimental correspondió a cada caja de Petri con Agar Tomate enmendado con los diferentes medios a una concentración de $10.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. El diseño experimental propuesto se realizó por triplicado y se obtuvo un total de 12 experimentos.

La variable de respuesta del diseño experimental correspondió al porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* (epígrafe 6.4.3). Los datos se analizaron con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

6.4.2 Medios de cultivo evaluados. Se evaluaron 4 medios de cultivo a base de jugo de fique con un pH ajustado entre 6,5-7, de los cuales, 3 medios se fermentaron con la bacteria *Bacillus megaterium* M46 y el cuarto medio sin inocular fue utilizado como testigo. La composición de cada medio de cultivo se muestra en la Tabla 5.

Los criterios de composición de M1 se seleccionaron teniendo en cuenta lo descrito por Brözel & Cloete (1992) y Todar (2000). Para M2 el componente mayoritario fue jugo de fique suplementado con una fuente de carbono y para el M3 y MB, el medio fue conformado únicamente con jugo de fique.

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo

Medio 1 (M1) ^{a y b}		Medio 2 (M2)		Medio 3 (M3)		Medio sin inocular Blanco (MB)	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Extracto de levadura ^a	0.5 g	Jugo de Fique (Filtrado)	1 L	Jugo de Fique (Filtrado)	1 L	Jugo de Fique (Filtrado y esterilizado)	1 L
Sacarosa ^b	10 g	Sacarosa	30 g				
K ₂ HPO ₄ ^b	2.5 g						
KH ₂ PO ₄ ^b	2.5 g						
(NH ₄) ₂ HPO ₄ ^b	1.0 g						
MgSO ₄ 7H ₂ O ^b	0.20 g						
FeSO ₄ 7H ₂ O ^b	0.01 g						
MnSO ₄ H ₂ O ^b	0.007 g						
Jugo de Fique (Filtrado)	985 ml						

Fuente: (Brözel & Cloete, 1992) ^a; (Todar, 2000) ^b

Los medios de cultivo para cada uno de los ensayos realizados durante esta investigación fueron esterilizados a 121°C y 15 psi durante 15 minutos (Autoclave ALL AMERICAN MODEL N°75X) previo al proceso de fermentación con *B. megaterium* M46.

6.4.3 Activación de *Bacillus megaterium* M46. Se activó en Caldo Nutritivo (OXOID) y se dejó en incubación a 30°C por 24 horas (Incubadora DIES TZN45). Posteriormente a una absorbancia de 0.10 ± 0.01 se inoculó 1 mL (10% v/v) en 9 mL del medio de cultivo y se incubó nuevamente a 30°C por 24 horas.

6.4.4 Fermentación. Una vez obtenido el inóculo, 10 mL (10% v/v) se pasaron en 90 mL del medio de cultivo para obtener un volumen final de fermentación de 100 mL en erlenmeyer de 250 mL. Luego los medios de fermentación se dejaron en incubación con agitación constante a 100 rpm y 35°C (Shaker DIES MP5W) durante el tiempo determinado en la cinética de crecimiento (epígrafe 6.3). Además es importante resaltar que el medio de cultivo sin inocular (MB) fue sometido a las mismas condiciones de fermentación de los otros medios. Finalizada la fermentación se encontró la variable de respuesta (epígrafe 6.4.5) del diseño experimental propuesto.

6.4.5 Inhibición in vitro del fitopatógeno *Phytophthora infestans*. El fitopatógeno *P. infestans* fue suministrado por el Grupo de Investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y fue conservado bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (Álvarez *et al.*, 2010).

El comportamiento *in vitro* del fitopatógeno se determinó por medio del crecimiento micelial de las colonias de *P. infestans* para esto discos de 1,36 cm de diámetro del fitopatógeno de 16 días de crecimiento, se obtuvieron con sacabocado y se establecieron en cajas de Petri con medio Agar Tomate enmendado con los diferentes tratamientos. Cada unidad experimental fue evaluada después de un periodo de incubación de 8 días a temperatura ambiente y en oscuridad (Álvarez *et al.*, 2010). El testigo (sin enmendar) se utilizó como parámetro de comparación. Al cabo de este tiempo el crecimiento radial del fitopatógeno fue medido con la ayuda del programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

Se determinó el porcentaje de crecimiento utilizando la relación propuesta por Riveros *et al.* (2003) con modificaciones:

$$PC = \frac{DMCM - 1.36 \text{ cm}}{DMCA - 1.36 \text{ cm}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

PC: Porcentaje de crecimiento.

DMCM: Diámetro medio de la colonia creciendo en el tratamiento.

1.36 cm: Diámetro del cilindro con el micelio.

DMCA: Diámetro medio de la colonia sin enmendar.

Las modificaciones realizadas a la fórmula propuesta por Riveros *et al.* (2003), corresponden a la sustracción del diámetro del cilindro con el micelio (1.36 cm) al diámetro medio de la colonia sin enmendar (DMCA) siendo este último el único valor en el denominador de la ecuación original.

Con base en la Ecuación 1 se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PI) de *P. infestans* con la fórmula propuesta por Ticona *et al.* (1998):

$$PI = 100 - PC \quad (\text{Ecuación 2})$$

6.5 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN MODIFICANDO CANTIDAD DE INÓCULO, EDAD DE INÓCULO, TEMPERATURA Y AGITACIÓN

Una vez que se determinó el mejor medio de cultivo a base de jugo de fique para el crecimiento de *B. megaterium* M46, es decir el que mostró mayor efecto antagónico frente a *P. infestans*, éste se evaluó modificando las condiciones de cultivo como cantidad de inóculo, edad de inóculo, temperatura y agitación.

6.5.1 Cantidad y edad de inóculo:

6.5.1.1 Diseño de experimentos. Se empleó un Diseño Factorial 2^2 y se evaluó los factores de cantidad y edad de inóculo, analizados en dos niveles (mínimo y máximo). Los niveles de los factores se observan en la Tabla 6 y la combinación de los tratamientos resultantes se muestra en la Tabla 7. Estos ensayos se realizaron por triplicado y con cuatro repeticiones al centro.

La unidad experimental correspondió a cada caja de Petri con Agar Tomate enmendado con el fermento de cada experimento a una concentración de $10.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Los datos se analizaron estadísticamente con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

La variable de respuesta correspondió al porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* para determinar cuál fue la cantidad y edad de inóculo óptimos.

Tabla 6. Niveles del Diseño Factorial 2² para cantidad y edad de inóculo

Condiciones del Inóculo	Nivel		
	Mínimo	Medio	Máximo
Cantidad de Inoculo (%)	5	10	15
Edad del inoculo (h)	24	36	48

Fuente: (Brözel & Cloete, 1992)^a; (Todar, 2000)^b

Tabla 7. Combinaciones de los factores cantidad y edad de inóculo del Diseño Factorial 2²

Tratamiento	Factor	
	Cantidad de inóculo (% v/v)	Edad del inóculo (h)
T1	5	24
T2	15	24
T3	5	48
T4	15	48
T5	10	36
T5	10	36
T5	10	36
T5	10	36

Fuente: (Brözel & Cloete, 1992)^a; (Todar, 2000)^b

Para la selección de los valores de edad de inóculo (Tabla 6) se tuvo en cuenta lo mencionado por Crueger (1993) y Scragg (1997), los cuales establecen como parámetro general un inóculo de 10% para incrementar la formación de producto, partiendo de esto se determinó el rango máximo y mínimo en el que se realizaron los ensayos. En cuanto a los valores de edad de inóculo (Tabla 6) se tuvo presente el estudio realizado por Ríos (2002), el cual utilizó inóculos bacterianos de una edad de 48 horas para la formación de biopelículas a partir de *B. megaterium*, razón por la cual se tomó éste como valor máximo para no correr riesgos en la utilización de un inóculo demasiado viejo.

6.5.1.2 Activación de *Bacillus megaterium* M46. Se activó en Caldo Nutritivo (OXOID) y se incubó a 30°C por 24 horas. Luego a una absorbancia de 0.10 ± 0.01 se inoculó 1 mL en 9 mL (10% v/v) del medio de cultivo y se incubó a 30°C durante el tiempo determinado para cada ensayo como se muestra en la Tabla 6.

6.5.1.3 Fermentación. Una vez que se obtuvo el inóculo, en erlenmeyer de 250 mL se inoculó las cantidades mencionadas en la Tabla 7 y se trabajó con un

volumen total de fermentación de 100 mL, se dejó en incubación con agitación constante a 100 rpm y 35°C durante el tiempo determinado en la cinética de crecimiento (epígrafe 6.3). Al cabo de este tiempo se estableció la mejor combinación entre cantidad y edad de inóculo determinada por medio de la variable de respuesta (epígrafe 6.4.5) del diseño experimental propuesto.

6.5.2 Temperatura y agitación

6.5.2.1 Diseño de experimentos. Una vez establecida la mejor combinación entre cantidad y edad de inóculo (epígrafe 6.5.1) que había de ser adicionada al mejor medio de cultivo (epígrafe 6.4), se procedió a estudiar el efecto de los factores temperatura y agitación mediante un Diseño Factorial 2², evaluado en dos niveles (mínimo y máximo), los cuales se muestran en la Tabla 8.

Los ensayos se realizaron por triplicado y con cuatro repeticiones al centro y la combinación de los tratamientos se muestra en la Tabla 9.

Para el respectivo análisis la unidad experimental fue cada caja de Petri con Agar Tomate enmendado con el fermento de cada experimento (Tabla 9) a una concentración de 10.000 mg*L⁻¹. Los datos se analizaron estadísticamente con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

La variable de respuesta correspondió al PI del crecimiento micelial de *P. infestans*. Se utilizó este diseño para determinar cuál fue la mejor combinación entre temperatura y agitación.

Tabla 8. Niveles del Diseño Factorial 2² para temperatura y agitación

Factor	Nivel		
	Mínimo	Medio	Máximo
Temperatura (°C)	30	35	40
Agitación (rpm)	70	100	130

Fuente: (Brözel & Cloete, 1992)^a; (Todar, 2000)^b

Los valores de temperatura y agitación (Tabla 8) se seleccionaron teniendo en cuenta las características del *B. megaterium*. Éste es estrictamente aerobio y se desarrolla en el rango de temperatura de 4 a 45°C (Gordon & William, 1973).

Tabla 9. Combinaciones de los factores temperatura y agitación del Diseño Factorial 2²

Tratamiento	Factor	
	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
T1	40	130
T2	40	70
T3	30	130
T4	30	70
T5	35	100
T5	35	100
T5	35	100
T5	35	100

Fuente. Este estudio

6.5.2.2 Activación de *Bacillus megaterium* M46. Se activó en Caldo Nutritivo (OXOID) y se incubó a 30°C por 24 horas. Luego se inoculó al 10% v/v a una absorbancia de 0.10 ± 0.01 en erlenmeyer de 50 mL con la composición del medio final y se incubó a 30°C durante el tiempo establecido previamente en la optimización del factor de edad de inóculo (epígrafe 6.5.1).

6.5.2.3 Fermentación. Una vez obtenido el inóculo, en erlenmeyer de 250 mL se inoculó la cantidad encontrada en el epígrafe 6.5.1 y se trabajó con un volumen total de fermentación de 100 mL. Posteriormente el medio de fermentación se dejó en incubación a la temperatura y agitación descrita en el diseño de experimentos (Tabla 8 y 9) durante el tiempo determinado en la cinética de crecimiento (epígrafe 6.3). Al cabo de este tiempo se estableció la mejor combinación entre temperatura y agitación determinada por medio de la variable de respuesta (epígrafe 6.4.5) del diseño experimental propuesto.

6.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL MEDIO OPTIMIZADO CONTRA *Phytophthora infestans*

Una vez determinadas las mejores condiciones tanto de edad y cantidad de inóculo, como de temperatura y agitación (epígrafe 6.5), siguiendo el protocolo propuesto por Burgos *et al.* (2010), se realizaron ensayos para encontrar la concentración mínima inhibitoria del mejor medio de cultivo a base de jugo de fique fermentado con *B. megaterium* M46 que mostró mayor efecto antagónico

contra *P. infestans*. Para esto, Agar Tomate se enmendó con diferentes concentraciones (10.000, 20.000, 30.000, 40.000 y 50.000 mg*L⁻¹).

6.6.1 Diseño de experimentos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Phytophthora infestans*. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para establecer el rango donde se produjo la máxima inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans* a la concentración más baja del medio fermentado. Posteriormente, se evaluaron concentraciones de 1.000 en 1.000 mg*L⁻¹ dentro del rango encontrado.

La unidad experimental fue cada caja de Petri con Agar Tomate enmendado con las diferentes concentraciones del medio optimizado. El diseño experimental propuesto se realizó por triplicado.

La variable de respuesta del diseño experimental correspondió al PI del crecimiento micelial de *P. infestans*. Los datos se analizaron con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

6.6.1.1 Activación de *Bacillus megaterium* M46. Se activó en Caldo Nutritivo (OXOID) y se incubó a 30°C por 24 horas. Luego se inoculó al 10% v/v a una absorbancia de 0.10 ± 0.01 en erlenmeyer de 50 mL con la composición del medio final y se incubó a 30°C durante el tiempo establecido previamente en la optimización del factor de edad de inóculo (epígrafe 6.5.1).

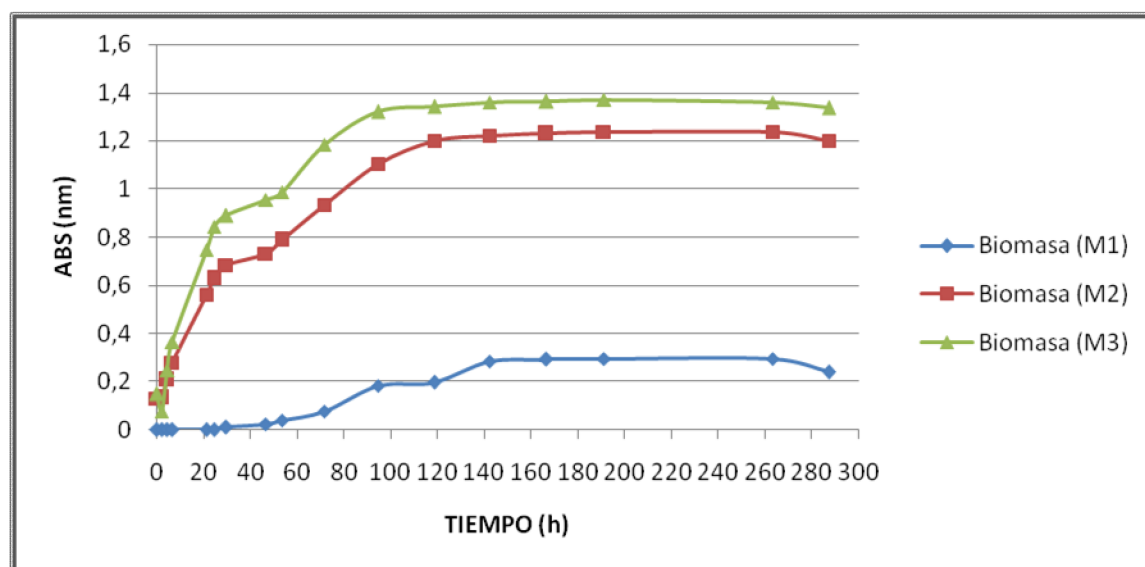
6.6.1.2 Fermentación. Una vez obtenido el inóculo en erlenmeyer de 250 mL, éste se inoculó a la cantidad encontrada en el epígrafe 6.5.1 y se dejó en incubación teniendo en cuenta la mejor combinación entre temperatura y agitación encontrada en el epígrafe 6.5.2 durante el tiempo determinado en la cinética de crecimiento (epígrafe 6.3). Al cabo de este tiempo se determinó la CMI contra *P. infestans* por medio de la variable de respuesta (epígrafe 6.4.5) del diseño experimental propuesto.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PERFIL DE CRECIMIENTO DE *Bacillus megaterium* M46 EN CADA UNO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En las Figuras 1 y 2 se presentan los perfiles de crecimiento de la bacteria *Bacillus megaterium* M46 en los diferentes medios de fermentación. La composición de los medios evaluados se muestra en la Tabla 5.

Figura 1. Curva de crecimiento de *Bacillus megaterium* M46 en los medios de cultivo M1, M2 y M3



Fuente. Este estudio

En la Figura 1 se muestran las curvas de crecimiento de *B. megaterium* M46 en cada medio de cultivo. Se observa que el comportamiento del microorganismo en cada uno de los medios es diáuxico, probablemente por la complejidad de los medios de fermentación.

En M1 se observa que *B. megaterium* M46 tuvo una fase de adaptación de alrededor de 50 horas, una primera fase de crecimiento de 45 horas y una primera fase estacionaria de 25 horas, punto en el cual mostró un comportamiento diáuxico. La segunda fase de crecimiento tuvo una duración de 20 horas, a partir de este momento se realizó un seguimiento a la fase estacionaria por espacio de 120 horas, momento en el cual mostró una caída en los valores de absorbancia, lo que no significa que el microorganismo llegó a su fase de muerte.

El comportamiento que presentó *B. megaterium* M46 en M2 fue el siguiente: no mostró una fase de adaptación definida, una fase inicial de crecimiento de 30 horas y una primera fase estacionaria de 20 horas, iniciando un comportamiento diáuxico. La segunda fase de crecimiento tuvo una duración de 70 horas, a partir de este momento se realizó un seguimiento a la fase estacionaria por espacio de 140 horas, momento en el cual mostró una caída en los valores de absorbancia, lo que no significa que el microorganismo llegó a su fase de muerte.

En M3, *B. megaterium* M46 no presentó una fase de adaptación, se observó una primera fase de crecimiento de 25 horas y una fase estacionaria de 20 horas, a partir de este momento se presentó un comportamiento diáuxico. La segunda fase de crecimiento tuvo una duración de 40 horas y desde éste momento se realizó un seguimiento a la fase estacionaria por espacio de 165 horas, momento en el cual mostró una caída en los valores de absorbancia, lo que no significa que el microorganismo llegó a su fase de muerte.

Con base en el comportamiento presentado por el microorganismo en cada uno de los medios de cultivo (Figura 1), se determinaron los días de fermentación. Pereira De Melo (2005), menciona que los metabolitos responsables de la inhibición se empiezan a acumular en el medio de cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial (inicio de la fase estacionaria), estos productos no son esenciales para el crecimiento y la reproducción de los microorganismos que las producen. Es por esto que los tiempos que se establecieron para la fermentación fueron alrededor de 8, 7 y 6 días para los medios M1, M2 y M3 respectivamente.

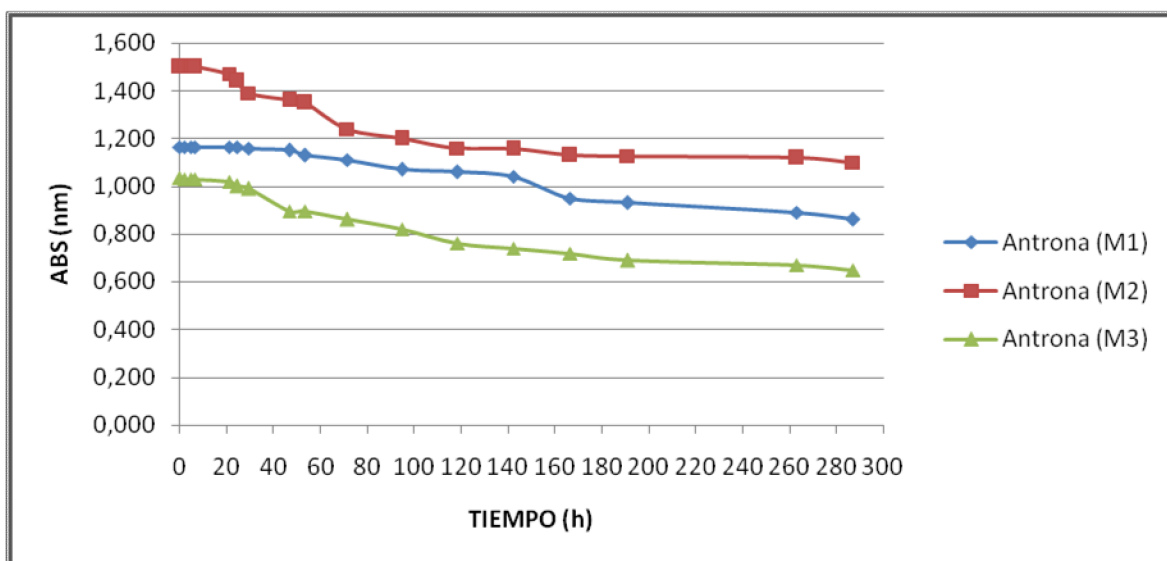
No se conoce la caracterización fisicoquímica del jugo de fique de la variedad Negra Común, sin embargo la caracterización del jugo de fique de la variedad Uña de Águila muestra que tiene un alto contenido de fuentes de carbono (Glucosa: 11.22 g/L, sacarosa: 0.24 g/L y fructosa: 7.3 g/L) y metales pesados (Ca: 1226.91 mg/L; Mg: 141.52 mg/L; Zn: 0.98 mg/L; Fe: 10 g/L) (Ramírez, 2010). Además los aditivos agregados al jugo de fique (M1) son los componentes necesarios para el crecimiento de *B. megaterium* (Brözel & Cloete, 1992; Todar, 2000), por ésta razón, se presume que el microorganismo se encontró en un medio saturado indicando un crecimiento inferior en comparación al mostrado en M2 y M3, posiblemente a que el crecimiento de biomasa fue influenciado por factores tales como la presencia de sustancias tóxicas, concentración de sales y oxidantes. Las sustancias tóxicas envenenan a los microorganismos, la concentración de sales influye con las relaciones de presiones interna-externa y los oxidantes destruyen las enzimas y materiales celulares (Valdez y Vázquez, 2003). De igual forma puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos determinando la velocidad de crecimiento del proceso (Ertola, Yantom y Mignone, 2000). A esto se añade que en ocasiones algunos componentes del medio de cultivo pueden resultar inhibidores del crecimiento, sobre todo cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas. Esto es factible que ocurra con la fuente de carbono y

energía por ser el componente que se encuentra en mayor proporción en los medios (Ertola, Yantom y Mignone, 2000).

Además el hecho de que una concentración de sustrato elevada pueda inhibir el crecimiento, impone una restricción a la concentración de los medios de cultivo y con esto a la concentración final de biomasa que se pueda obtener (Ertola, Yantom y Mignone, 2000), quizá también ésta sea una de las razones por la cual la cantidad de biomasa fue menor en M1 seguido de M2.

Asimismo se observa que el microorganismo presentó el más alto crecimiento en M3 posiblemente porque no existe saturación de componentes nutricionales y las fuentes de carbono existentes en el jugo de fique son suficientes para el desarrollo del microorganismo y la producción de metabolitos con propiedades antagónicas (Pereira De Melo, 2005) frente a *P. infestans*.

Figura 2. Consumo de azúcares de *Bacillus megaterium* M46 en los medios de cultivo M1, M2 y M3



Fuente: esta investigación

Por otra parte, como se ve en la Figura 2, el consumo de azúcares de *B. megaterium* M46 no fue completo, quizá porque en el jugo de fique existe una gran cantidad de azúcares (Glucosa: 11.22g/L, Sacarosa: 0.24g/L y Fructosa: 7.3g/L) (Ramírez, 2010) haciendo innecesario el agregar fuentes de carbono a los medios de cultivo. Además se observa que el valor más alto de absorbancia se dio en M2 ya que éste fue suplementado con 30 g/L de sacarosa, seguido por M1 suplementado con 10 g/L de sacarosa y por último M3 correspondiente a jugo de fique sin ningún tipo de suplemento (Tabla 5).

7.2 SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE JUGO DE FIQUE PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus megaterium* M46 CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA PARA EL CONTROL DEL FITOPATÓGENO *Phytophthora infestans*

El valor del crecimiento promedio micelial de *P. infestans* usado como control correspondió a 6.76 cm con una desviación estándar de 0.03. Éste valor se empleó durante toda la investigación para todos los cálculos del porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* (Ecuación 1 y 2).

En la Tabla 10 se consignan los datos correspondientes a las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans*, criterio empleado en la selección del mejor medio de cultivo. Ésta evaluación se realizó teniendo en cuenta los días de fermentación establecidos por la curva de crecimiento para cada uno de los medios, siendo éstos de 8 días para M1, 7 días para M2 y 6 días para M3. Además se tomó el promedio de los días de fermentación de los medios de cultivo M1, M2 y M3 para la evaluación del medio sin inocular MB, es decir 7 días.

Tabla 10. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según los medios de cultivo

Medio de Cultivo	Media del Porcentaje de Inhibición Micelial (PI)	Desviación Estándar (σ)
M1	81.85	0.37
M2	67.53	0.38
M3	84.81	0.19
MB	19.44	0.37

Fuente. Este estudio

El análisis de varianza (Tabla 11) indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes ensayos, puesto que el P-valor es inferior a 0.05, con un 95% de confianza, mostrando que la composición de los medios de cultivo son influyentes en el PI del crecimiento micelial de *P. infestans*.

Tabla 11. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según los medios de cultivo

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente – F	P- Valor
Entre grupos	8245.41	3	2748.47	24123.51	0.0000
Intra grupos	0.911467	8	0.113933		
Total (Corr.)	8246.33	11			

Fuente. Este estudio

La Tabla 12 muestra que hay diferencia significativa entre los diferentes grupos, dado que no hay solapamiento entre las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans*.

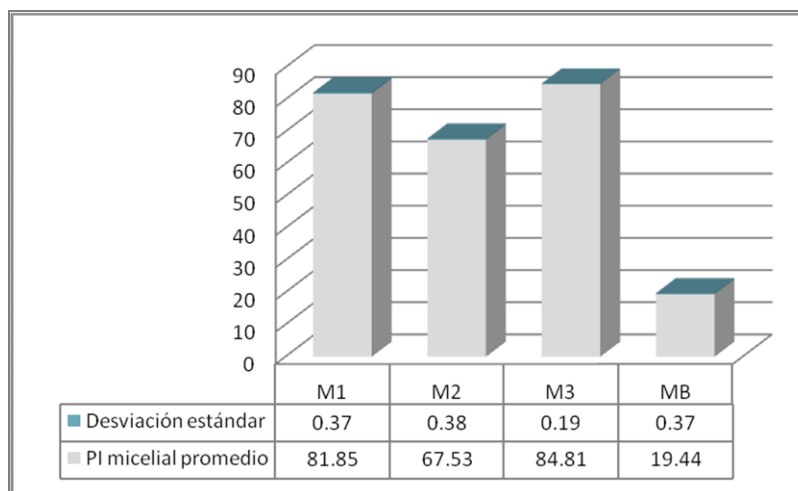
Tabla 12. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según los medios de cultivo

Nivel	Frecuencia	Media	Grupos Homogéneos
MB	3	19.44	X
M2	3	67.53	X
M1	3	81.85	X
M3	3	84.81	X

Fuente. Este estudio

Con los datos anteriormente descritos, el mejor medio de cultivo para la fermentación con *B. megaterium* M46 resultó ser M3 cuya composición se limita a los componentes del jugo de fique y la media del PI del crecimiento micelial de *P. infestans* en un medio Agar Tomate enmendado con una concentración de 10.000 mg*L⁻¹ de éste fermento, fue de 84.81%, mientras que para MB, jugo de fique sin inocular, fue del 19.44%. Estos resultados demuestran que el efecto biocida del jugo de fique se incrementa al someterlo a fermentación con *B. megaterium* M46 (Figura 3), también cabe resaltar que M1 presentó un alto porcentaje de inhibición similar al de M3, sin embargo, M1 se descartó por el costo que implica la fermentación que es más alto debido a los componentes que se deben agregar al jugo de fique, mientras que para M3 no se requiere la adición de otros nutrientes, además el tiempo de fermentación necesario en M1 es mayor que en M3 lo que se traduce en mayores costos de operación y producción.

Figura 3. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según los medios de cultivo



Fuente. Este estudio

Al jugo de fique se le han atribuido propiedades fungicidas debido a la presencia de sustancias como saponinas, flavonoides y alcaloides, los cuales le confieren a éste un potencial uso como bioinsumo. Álvarez *et al.* (2010) encontraron un efecto letal del bioinsumo a una concentración de 75.000 ppm en ensayos *in vitro* con jugo fermentado sin esterilizar por cuatro días con temperatura constante de 33°C, además señalan un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* del 78.2%, a una concentración de 10.000 ppm del bioinsumo de fique con características fungistáticas, éste valor es más alto que el encontrado en ésta investigación para MB (jugo de fique esterilizado y sin inocular), el cual presentó la media más baja del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* (19.44%) en comparación con los medios fermentados con *B. megaterium* M46, los cuales presentaron medias en el porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* del 81.85%, 67.53% y 84.81% para M1, M2 y M3 respectivamente, hecho atribuido a que probablemente el proceso de esterilización afecta los metabolitos del fique así como los producidos por la flora microbiana presente en el mismo con actividad antagónica frente a *P. infestans*. Sin embargo, los medios fermentados con *B. megaterium* M46 (M1 y M3), presentaron el PI del crecimiento micelial de *P. infestans* mas alto, demostrando que el jugo de fique incrementa su potencial antagónico al fermentarlo con *B. megaterium* M46.

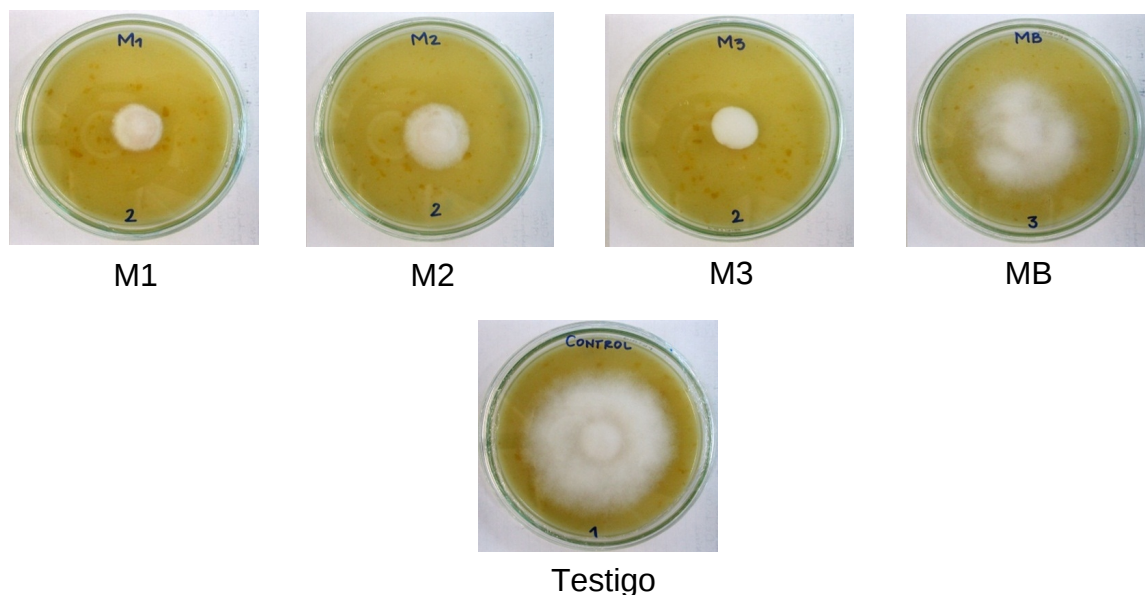
Este hecho puede sustentarse en que los microorganismos pueden ser utilizados como agentes para el control biológico de hongos fitopatógenos. El género *Bacillus*, ha sido identificado como un potente antagonista debido a la producción de metabolitos secundarios producidos desde el final de la fase exponencial e

inicio de la estacionaria, entre los cuales se encuentran antibióticos y proteasas (Singh *et al.* 2008).

Los antibióticos antifúngicos tienen la función de controlar biológicamente los patógenos que atacan las plantas. Varias de esas sustancias antifúngicas han sido caracterizadas como polipéptidos de bajo peso molecular, compuestos en su mayoría por aminoácidos (Pereira De Melo, 2005).

Los resultados fotográficos de las pruebas de antagonismo de *P. infestans* se observan en la Figura 4.

Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según los medios de cultivo



Fuente. Este estudio

7.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN MODIFICANDO CANTIDAD DE INÓCULO, EDAD DE INÓCULO, TEMPERATURA Y AGITACIÓN

El mejor medio de cultivo a base de jugo de fique (M3) para la fermentación de *B. megaterium* M46, se evaluó modificando las condiciones del cultivo como cantidad de inóculo y edad de inóculo, temperatura y agitación. A continuación se muestran los resultados de los diseños de experimentos para la selección de la mejor combinación de éstos factores.

7.3.1 Cantidad de inóculo y edad de inóculo. En la Tabla 13 se consignan los datos correspondientes a las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans*, criterio que se empleó en la selección de los factores biológicos de cantidad y edad de inóculo.

Tabla 13. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según cantidad y edad de inóculo

Tratamiento	Media del Porcentaje de Inhibición Micelial (PI)	Desviación Estándar (σ)
T1 (5% v/v - 24 h)	64.07	0.19
T2 (15% v/v - 24 h)	84.44	0.37
T3 (5% v/v - 48 h)	79.63	0.19
T4 (15% v/v - 48 h)	94.20	0.11
T5 (10% v/v - 36 h)	75.08	0.22

Fuente. Este estudio

El análisis de varianza (Tabla 14) muestra que los factores de cantidad y edad de inóculo, son significativos sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans*, con un P-Valor inferior a 0.05, mientras que la interacción entre estos dos factores no es significativa sobre la variable de respuesta (PI).

Por su parte el coeficiente R-Cuadrado evidencia un ajuste del 88.60%, con lo cual se dedujo que el diseño no cuenta con un buen ajuste. Por lo tanto se realizó un análisis por el método de comparación de múltiples muestras (Tabla 15).

Tabla 14. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según cantidad y edad de inóculo (Diseño Factorial 2²)

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Razón	P- Valor
A:Edad Inóculo	480.45	1	480.45	52.52	0.0000
B:Cantidad Inóculo	915.43	1	915.43	100.07	0.0000
AB	25.20	1	25.20	2.75	0.1126
Error Total	182.95	20	9.15		
Total (Corr.)	1604.03	23			

R-cuadrado = 88.60%

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 86.88%

Error Estándar de Est. = 3.02

Error absoluto de la media = 2.75

Estadístico Durbin-Watson = 0.85 (P=0.0025)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.53

Fuente. Este estudio

La Tabla 15 muestra que hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, con un P-Valor inferior a 0.05 y con un nivel de confianza del 95%. Además en la Tabla 16 se observa que las medias del porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* de los diferentes tratamientos no son homogéneas.

Tabla 15. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según cantidad y edad de inóculo (Comparación de múltiples muestras)

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente – F	P- Valor
Entre grupos	1603.07	4	400.77	7969.50	0.0000
Intra grupos	0.96	19	0.05		
Total (Corr.)	1604.03	23			

Fuente. Este estudio

Tabla 16. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según cantidad y edad de inóculo (Comparación de múltiples muestras)

Tratamiento	Frecuencia	Media	Grupos Homogéneos
T1 (5% v/v - 24 h)	3	64.07	X
T5 (10% v/v - 36 h)	12	75.08	X
T3 (5% v/v - 48 h)	3	79.63	X
T2 (15% v/v - 24 h)	3	84.44	X
T4 (15% v/v - 48 h)	3	94.20	X

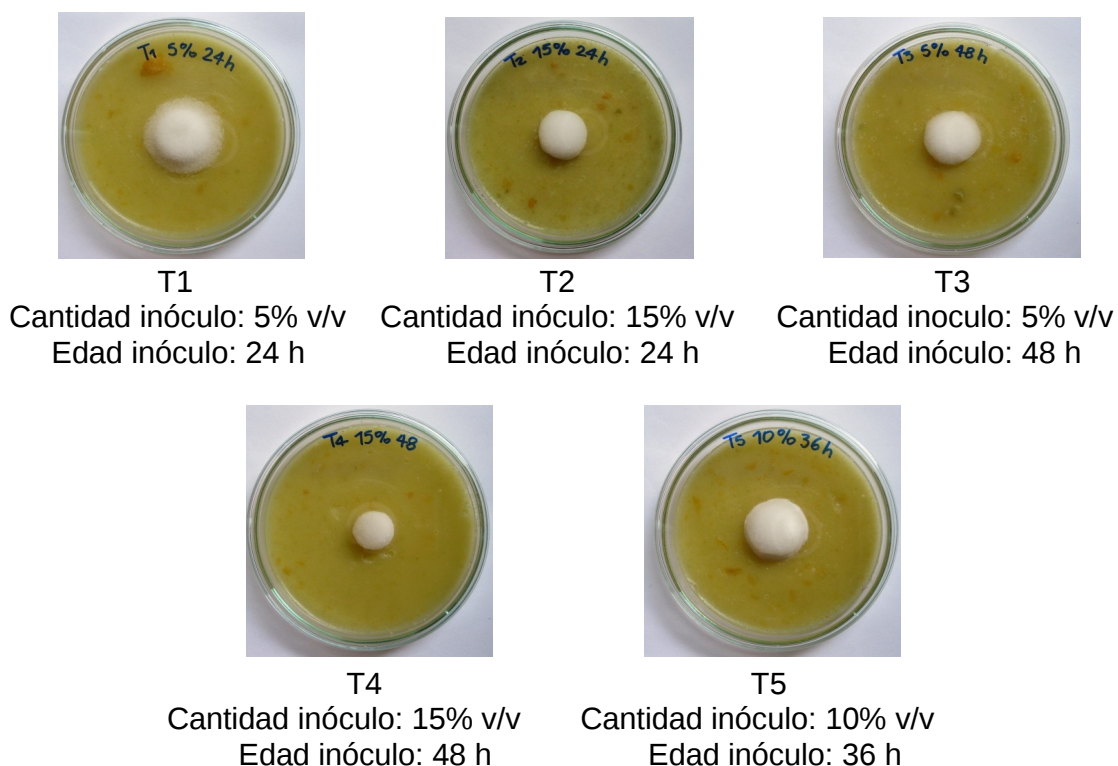
Fuente. Este estudio

Con los datos anteriormente mostrados se determinó que al evaluar el mejor medio de cultivo a base de jugo de fique (M3) para el crecimiento de *B. megaterium* M46, la mejor combinación entre los factores biológicos del cultivo como cantidad de inóculo y edad de inóculo, están dadas por lo representado en el tratamiento cuatro (T4), con una cantidad de inóculo del 15% v/v y una edad de inóculo de 48 horas, siendo éste el tratamiento con el valor más alto en la media del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* en medio Agar Tomate enmendado con una concentración de $10.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del fermento evaluado, con un valor del 94.20%.

La mejor combinación que se encontró entre cantidad de inóculo y edad de inóculo correspondió a los máximos niveles ensayados, esto puede atribuirse a que el proceso de fermentación se ve directamente afectado por la cantidad de inóculo, ya que una pequeña cantidad de inóculo retrasa el crecimiento y la velocidad de formación de producto, por ende una mayor “carga” de inóculo incrementa la producción, tomándose como parámetro general un inóculo de 10% (Crueger, 1993; Scragg, 1997), además las bacterias tienen la capacidad de aumentar la población cuando existe una cantidad de biomasa viable en el medio (Ertola, Yantom y Mignone, 2000), por tal razón se presume que se produjo una mayor cantidad de metabolitos con capacidad antagónica al utilizar un inóculo de 15% v/v. En cuanto a la edad de inóculo, nuestros resultados son similares a lo establecido en el estudio realizado por Ríos (2002), el cual utilizó inóculos bacterianos de una edad de 48 horas para la formación de biopelículas a partir de *B. megaterium* resultando ser ésta la mejor edad.

En la Figura 5 se observa las diferencias en la inhibición de *P. infestans* según cada tratamiento.

Figura 5. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según cantidad y edad de inóculo



Fuente. Este estudio

7.3.2 Temperatura y agitación. En la Tabla 17 se consignan los datos correspondientes a las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del *P. infestans*, criterio que se empleó en la selección de los factores biológicos de temperatura y agitación.

Tabla 17. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según temperatura y agitación

Tratamiento	Media del Porcentaje de Inhibición Micelial (PI)	Desviación Estándar (σ)
T1 (40°C - 130 rpm)	89.50	0.28
T2 (40°C - 70 rpm)	92.72	0.28
T3 (30°C - 130 rpm)	80.87	0.47
T4 (30°C - 70 rpm)	85.56	0.19
T5 (35°C - 100 rpm)	94.27	0.15

Fuente. Este estudio

El análisis de varianza (Tabla 18) muestra que solo el factor temperatura es significativo sobre el porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans*, con un P-Valor inferior a 0.05. Además el coeficiente R-Cuadrado evidencia un ajuste del 43.62%, con lo cual se dedujo que el diseño no cuenta con un buen ajuste. Por lo tanto se realizó un análisis por el método de comparación de múltiples muestras para seleccionar el mejor tratamiento (Tabla 19).

Tabla 18. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según temperatura y agitación (Diseño Factorial 2²)

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Razón	P- Valor
A:Temperatura	187.15	1	187.15	12.29	0.0022
B:Agitación	46.85	1	46.85	3.08	0.0947
AB	1.64	1	1.64	0.11	0.7465
Error Total	304.51	20	15.22		
Total (Corr.)	540.15	23			

R-cuadrado = 43.62%

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 35.17%

Error Estándar de Est. = 3.90

Error absoluto de la media = 3.56

Estadístico Durbin-Watson = 0.85 (P=0.0024)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.53

Fuente. Este estudio

La Tabla 19 indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, con un P-Valor inferior a 0.05 y con un nivel de confianza del 95%. Además en la Tabla 20 se observa que las medias del porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* de los diferentes tratamientos no son homogéneas.

Tabla 19. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según temperatura y agitación (Comparación de múltiples muestras)

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente – F	P- Valor
Entre grupos	539.09	4	134.77	2421.46	0.0000
Intra grupos	1.06	19	0.06		
Total (Corr.)	540.15	23			

Fuente. Este estudio

Tabla 20. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* evaluando temperatura y agitación (Comparación de múltiples muestras)

Tratamiento	Frecuencia	Media	Grupos Homogéneos
T3 (30°C - 130 rpm)	3	80.87	X
T4 (30°C - 70 rpm)	3	85.56	X
T1 (40°C - 130 rpm)	3	89.50	X
T2 (40°C - 70 rpm)	3	92.72	X
T5 (35°C - 100 rpm)	12	94.27	X

Fuente. Este estudio

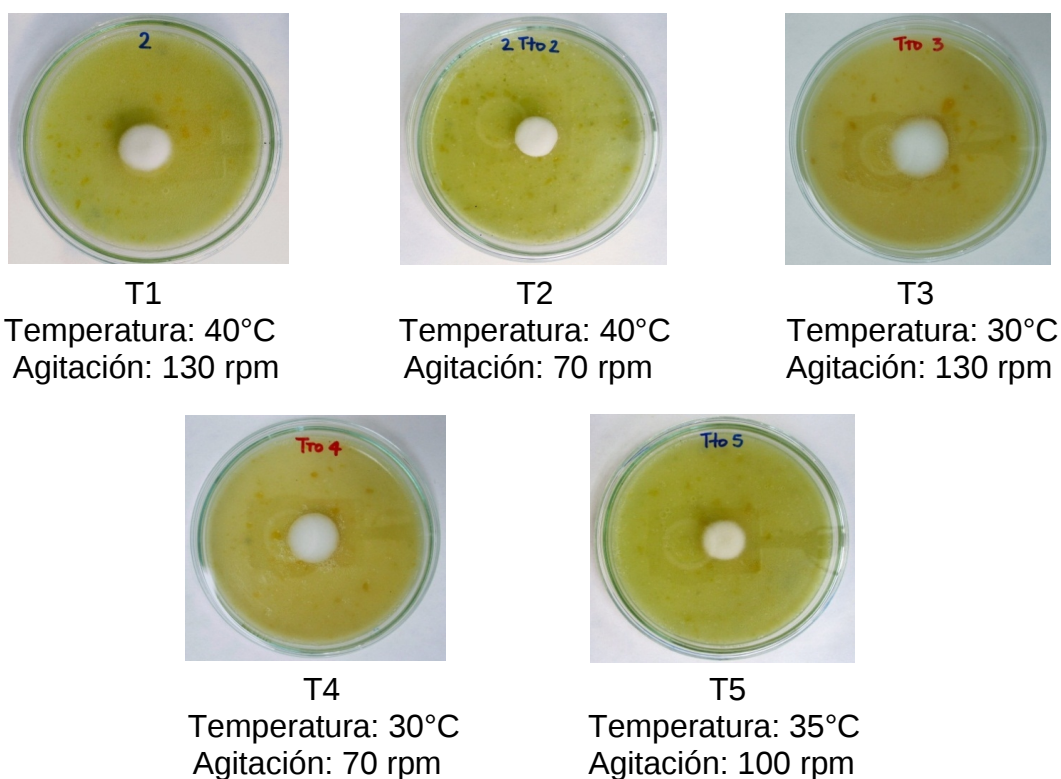
Con los datos anteriormente mostrados, se determinó que al evaluar el mejor medio de cultivo a base de jugo de fique (M3) para la fermentación con *Bacillus megaterium* M46 durante 6 días, con unas condiciones de cantidad de inóculo de 15% v/v y edad de inóculo de 48 horas, la mejor combinación en los factores físicos de temperatura y agitación, están dadas por lo representado en el tratamiento cinco (T5) con una temperatura de 35°C y una agitación de 100 rpm, siendo éste el tratamiento con el porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* más alto, con un valor del 94.27%. La temperatura de este tratamiento es similar a la evaluada por Carissimi *et al.* (2009), quienes evaluaron

la actividad antifúngica de *Bacillus* sp. E164 contra *Bipolaris sorokiniana* causante de manchas marrones en el trigo y encontraron que la temperatura óptima del medio de cultivo para la mayor inhibición de éste fitopatógeno, fue de 37°C y con agitación constante durante 48 horas. Esto puede atribuirse a que estas temperaturas están dentro del rango en el que las bacterias del género *Bacillus* se desarrollan (Koneman, 2001) y con estos resultados se puede presumir que el rango óptimo para el desarrollo y la producción de sustancias con carácter antifúngico se encuentra alrededor de estas temperaturas.

En cuanto a la agitación, éste factor contribuye a la aireación del medio de cultivo beneficiando el desarrollo de *B. megaterium* que es estrictamente aerobio (Gordon & William, 1973). Con base en los resultados (Tabla 20) se podría decir que para obtener un alto porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans*, es necesario contar con una acertada combinación de los factores de temperatura y agitación.

En la Figura 6 se observa las diferencias en la inhibición de *P. infestans* según cada tratamiento.

Figura 6. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según la temperatura y agitación



Fuente. Este estudio

7.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL MEDIO OPTIMIZADO CONTRA *Phytophthora infestans*

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se siguió el protocolo propuesto por Burgos *et al.* (2010). M3 se fermentó con *Bacillus megaterium* M46 con un inóculo de 48 horas y una cantidad de 15% v/v (epígrafe 7.3.1), el cual se sometió a una temperatura de 35°C y una agitación de 100 rpm (epígrafe 7.3.2).

En la Tabla 21 se indican los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* en medio Agar Tomate enmendado con diferentes concentraciones del medio optimizado (10.000, 20.000, 30.000, 40.000 y 50.000 mg*L⁻¹).

Tabla 21. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* presentado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones (10.000 a 50.000 mg*L⁻¹)

Concentraciones (mg*L ⁻¹)	Media del Porcentaje de Inhibición Micelial (PI)	Desviación Estándar (σ)
A (10.000)	94.5	0,11
B (20.000)	100	0
C (30.000)	100	0
D (40.000)	100	0
E (50.000)	100	0

Fuente. Este estudio

El análisis de varianza (Tabla 22) indica que existen diferencias significativas entre los grupos, puesto que el P-valor es inferior a 0.05, con un 95% de confianza. Por otro lado, la prueba de rangos múltiples (Tabla 23) señala cuatro grupos homogéneos que corresponden a las concentraciones de 20.000, 30.000, 40.000 y 50.000 mg*L⁻¹, siendo la media del porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* de 100%.

Tabla 22. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según las concentraciones de 10.000 a 50.000 mg*L⁻¹

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente - F	P- Valor
Entre grupos	72.51	4	18.13	7532.41	0.0000
Intra grupos	0.02	10	0.002		
Total (Corr.)	72.53	14			

Fuente. Este estudio

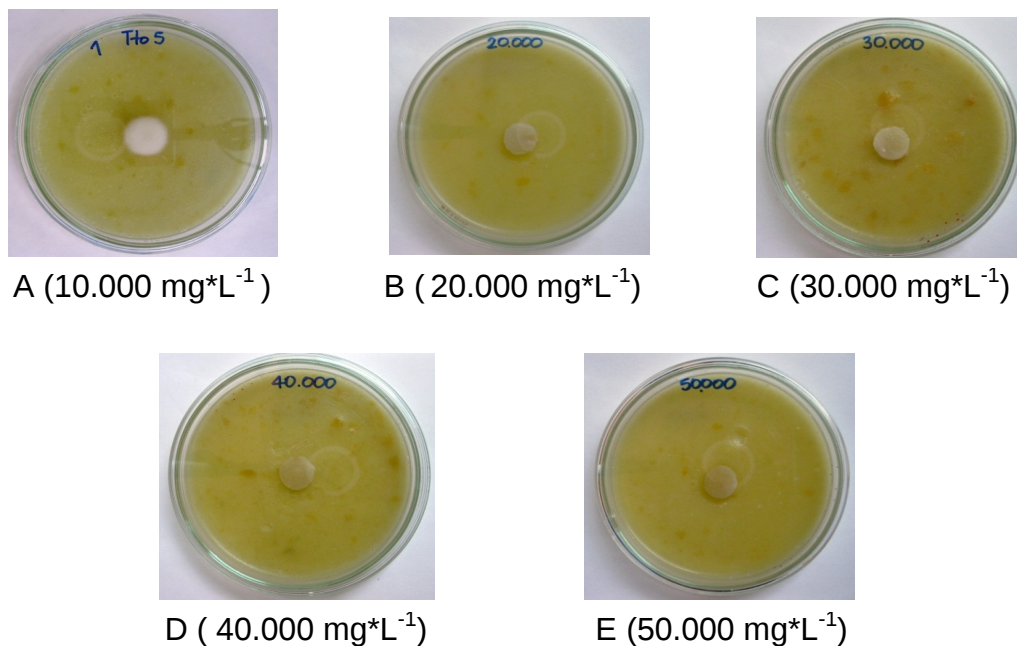
Tabla 23. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* según las concentraciones de 10.000 a 50.000 mg*L⁻¹

Concentraciones	Frecuencia	Media	Grupos Homogéneos
A (10.000 mg*L ⁻¹)	3	94.50	X
C (30.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
D (40.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
E (50.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
B (20.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X

Fuente. Este estudio

En la Figura 7 se muestran las fotografías de los ensayos antagónicos mostrados por cada una de las concentraciones.

Figura 7. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* con el medio de cultivo optimizado para las concentraciones de 10.000 a 50.000 mg*L⁻¹



Fuente. Este estudio

Según lo anterior, el rango donde se produjo la máxima inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* a una concentración mínima, se encontró entre las concentraciones de 10.000 y 20.000 mg*L⁻¹.

En la Tabla 24 se relacionan los datos para el porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans* dentro del rango de las concentraciones encontrado. Este ensayo se realizó con concentraciones seriadas de 1.000 en 1.000 mg*L⁻¹.

Tabla 24. Medias de los porcentajes de inhibición (PI) presentado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones dentro del rango de 10.000 a 20.000 mg*L⁻¹

Concentraciones (mg*L ⁻¹)	Media del Porcentaje de Inhibición Micelial (PI)	Desviación Estándar (σ)
A (10.000)	94.50	0,11
A1 (11.000)	97.41	0,19
A2 (12.000)	100	0
A3 (13.000)	100	0
A4 (14.000)	100	0
A5 (15.000)	100	0
A6 (16.000)	100	0
A7 (17.000)	100	0
A8 (18.000)	100	0
A9 (19.000)	100	0
B (20.000)	100	0

Fuente. Este estudio

El análisis de varianza (Tabla 25) indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, puesto que el P-valor es inferior a 0.05, con un 95% de confianza y la prueba de rangos múltiples (Tabla 26) señala nueve grupos homogéneos que corresponden a las concentraciones de 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000 y 20.000 mg*L⁻¹, siendo la media del porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. infestans*, del 100%.

Tabla 25. ANOVA para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* mostrado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones dentro del rango de 10.000 a 20.000 mg*L⁻¹

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente - F	P- Valor
Entre grupos	84.98	10	8.50	44.44	0.0000
Intra grupos	4.21	22	0.19		
Total (Corr.)	89.19	32			

Fuente. Este estudio

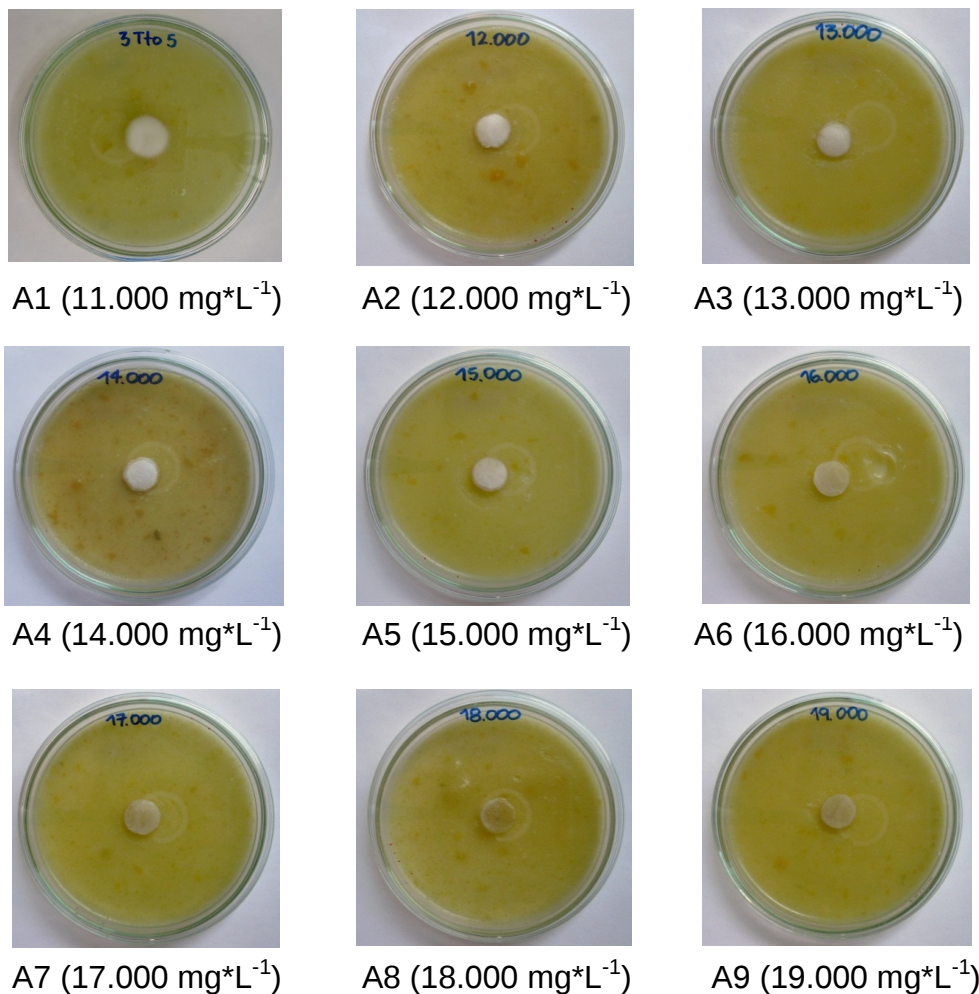
Tabla 26. Prueba de rangos múltiples para las medias de los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* mostrado por el medio optimizado para las diferentes concentraciones dentro del rango de 10.000 a 20.000 mg*L⁻¹

Concentraciones	Frecuencia	Media	Grupos Homogéneos
A (10.000 mg*L ⁻¹)	3	94.50	X
A1 (11.000 mg*L ⁻¹)	3	98.33	X
A2 (12.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A4 (14.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A5 (15.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A6 (16.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A8 (18.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A7 (17.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A9 (19.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
B (20.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X
A3 (13.000 mg*L ⁻¹)	3	100.0	X

Fuente. Este estudio

Los resultados anteriores señalan que a partir de la concentración A2: 12.000 mg*L⁻¹, las medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans*, son iguales hasta alcanzar la concentración de B: 20. 000 mg*L⁻¹. Con el análisis estadístico no se pudo establecer claramente el valor al cual se produjo la máxima inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* a una concentración mínima del fermento, por tanto la evaluación se realizó visualmente dado que el fermento tomó un carácter fungicida provocando una inhibición total a concentraciones mayores a 20.000 mg*L⁻¹, lo que facilitó una determinación visual de la CMI. La presencia de un botón bien definido sin crecimiento micelial del fitopatógeno fue el criterio cualitativo escogido para determinar la CMI basados en el protocolo establecido por Rodero *et al.* (1995) y se encontró que la concentración mínima que causa la máxima inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* fué de 15.000 mg*L⁻¹, concentración a partir de la cual el fermento comenzó a tomar un carácter fungicida, tal como se indica en la Figura 8.

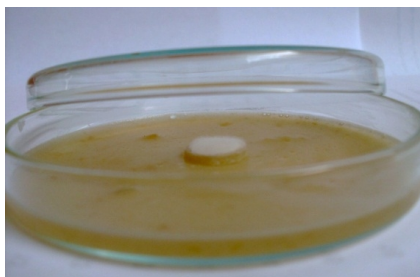
Figura 8. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* con el medio de cultivo optimizado evaluando las concentraciones de 10.000 a 20.000 mg*L⁻¹



Fuente. Este estudio

Con el propósito de corroborar que la CMI fuera de 15.000 mg*L⁻¹, fue necesario dejar 8 días adicionales de crecimiento micelial de *P. infestans* y se encontró que ésta es la concentración mínima a la que se produce la máxima inhibición del crecimiento micelial de *P. infestans* (Figura 9).

Figura 9. Inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* a 15.000 mg*L⁻¹ después de 16 días



Fuente. Este estudio

Con los resultados obtenidos en ésta investigación se puede inferir que a pesar que el jugo de fique ha demostrado tener cierta eficacia para el control biológico, al someterlo a un proceso de fermentación con *B. megaterium* M46, su efecto antagónico contra el fitopatógeno *P. infestans* se incrementa en gran medida y éstas propiedades antagonistas se deben probablemente a la excreción de sustancias antifúngicas que inhiben el crecimiento micelial (Pereira De Melo, 2005). Estos hallazgos pueden contribuir a diseñar nuevas y más efectivas estrategias de mejoramiento de productos biológicos para el control de *Phytophthora infestans*.

La utilización de este bioinsumo para prevenir la Gota de la papa a nivel *in vitro* se constituye en una alternativa posible para controlar la enfermedad en campo y para disminuir la aplicación de fungicidas de origen químico.

8. CONCLUSIONES

El mejor medio de cultivo para la bacteria *Bacillus megaterium* M46, fue el jugo de fique sin el requerimiento de fuentes de carbono y otros nutrientes adicionales (M3), mostrando el mayor porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans* con un valor del 84.81%, en comparación con el que presentó el jugo de fique sin inocular (MB) que fue del 19.44%, además resultó adecuado, económico y factible, ampliándose las posibilidades de su uso como biocontrol.

La optimización de M3, se dio con una combinación entre cantidad y edad de inóculo de 15% v/v y 48 horas respectivamente, con un porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* del 94.20% y una combinación entre temperatura y agitación de 35°C y 100 rpm respectivamente, con un PI del crecimiento micelial de *P. infestans* del 94.27%.

El porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans*, se incrementa del 84.81% al 94.27%, después de optimizar M3 con las combinaciones de los factores de cantidad de inóculo, edad de inóculo, temperatura y agitación.

La mínima concentración del medio optimizado a la que se produce la máxima inhibición (CMI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora infestans*, fue de 15.000 mg*L⁻¹.

La cepa aislada del jugo de fique, *Bacillus megaterium* M46, demostró ser un eficaz potencializador *in vitro* del efecto antagónico del jugo de fique frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans* causante del tizón tardío de la papa, resultando ser un muy promisorio agente de biocontrol, debido al efecto atribuido a la posible producción de sustancias antibióticas.

9. RECOMENDACIONES

Confirmar la identificación de la bacteria *Bacillus megaterium* M46 mediante otras pruebas taxonómicas que permitan dependiendo de los requerimientos propios de la bacteria, un cultivo y uso biotecnológico más eficiente.

Realizar estudios para la identificación de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica producidos por *B. megaterium* M46 para incrementar su efecto en conjunto con el jugo de fique.

Explorar *in vivo* la potencialidad de este bioinsumo para el control integrado de la enfermedad de la Gota de la papa, debido a su efectividad y bajo costo económico.

Evaluar el efecto antagónico *in vitro* del medio de jugo de fique fermentado con *Bacillus megaterium* M46 contra otros fitopatógenos del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO MEDINA, Juan Francisco y SERNA GÓMEZ, Erika Yannet. Optimización del proceso de extracción de material orgánico procedente de fique (*Furcraea* sp.) y observación del efecto biofungicida. Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín. Facultad de Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial. 2004. 200 p.

AGRIOS, G. Fitopatología. 2ª ed. México: Limusa, 2002. 838 p.

ÁLVAREZ, David *et al.* Sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary al extracto de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) y fungicidas sistémicos. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. San Juan de Pasto. 2010.

ANDERSON, T.H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Ag.Ecosys.Environ.* 2003. p. 285-293.

APABLAZA G. *et al.* Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.), *Ciencia e Investigación Agraria*. 29. 2002. p. 83-90.

ARNASON *et al.* Insecticides of plants origin. American Chemical Society Symposium Series Vol. 387. Washington. 1989. 213 p.

ARROYAVE, Paola C. y VELÁSQUEZ, David E. Aprovechamiento integral de *Furcraea macrophylla* Backer. Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de Procesos. Medellín. 2001. 250 p.

BENAVIDES, C. O., BACCA, E. D., & ORTIZ, B. Y. Estudio fitoquímico cualitativo del jugo de dos variedades de *fique del departamento de Nariño*. Informe de investigación. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. 2009.

BERGEYS D. Manual of the Determinative Bacteriology. Second Edition. Philadelphia. 1982. p. 540-589.

BRADA, IE. *et al.* Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl.var. *cubensis* Smith. Ciudad Habana, Cuba. INIFAT. 1995. 11 p.

BRÖZEL V. S., y CLOETE, T. E. Evaluation of nutrient Agars for the enumeration of viable aerobic heterotrophs in cooling water. 1992. Citado por: RIOS, A., y JORGE, E. Formación de biopelículas por adherencia bacteriana a probetas de cobre. Universidad Austral de Chile. 2002. 27 p.

BURGOS H., Armando. *et al.* Capacidad Antifúngica de los Extractos Hidroalcohólicos de Cuatro Plantas Silvestres sobre Hongos Fitopatógenos y Micotoxigénicos del Maíz. En : CONGRESO DEL NOROESTE Y NACIONAL DE CIENCIAS ALIMENTARIAS Y BIOTECNOLOGÍA. (7º : 2010 : Sonora). VII Congreso Del Noroeste Y Nacional De Ciencias Alimentarias Y Biotecnología. Sonora : Universidad de Sonora. 2010. 9 p.

CARISSIMI, Mariana. *et a.* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Bacillus* sp. E164 AGAINST *Bipolaris sorokiniana*. Departamento de Microbiología. Instituto de Ciencias Basicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. BIOCIENCIAS. 2009.

CARRILLO, Leonor. Vida y Muerte de los Microorganismos. MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA. 2003. 9 p.

CASTELLANOS, J.; OLIVA, P., IZQUIERDO, E. y MORALES, N. Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell). Cif en cebolla. Ciudad Habana, Cuba. INIFAT. 1995. 21 p.

CASTILLO COLOMBO, C., SOSA BRICENO y SCORZA, J. Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [online]. ene. 2004, vol.24, no.1-2 [citado 05 Julio 2011], p.65-67. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S13155562004000100011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1315-2556.

CRUEGER Wulf. Manual de microbiología industrial. Ed ACRIBIA, S.A Zaragoza España. 1993.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN. GUÍA AMBIENTAL DEL SUBSECTOR FIQUERO. CADENA PRODUCTIVA NACIONAL DEL FIQUE - CADEFIQUE. Bogotá. p. 17, 25, 27, 93-94.

ERITOLA, R., YANTOMO, O. Y MIGNONE, C. MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL. O.E.A. 2000. p. 31 -53.

FERNÁNDEZ LARREA, O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Cuba [online]. [citado 2011-06-07], 2003. Disponible en <<http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/pdf/antagonistas.pdf>>

FRAYRE, S. Efectos de extractos vegetales en el desarrollo de *Phytophthora infestans* en jitomate. En : Memorias del X Congreso Nacional de Fitopatología. México, Zacatecas. 1993. 52 p.

FUERTES, César, *et al.* FLAVONOIDES Y ALCALOIDES DE *LUPINUS BALLIANUS* C.P. SMITH CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA.

Ciencia e Investigación: Vol. 1 N° 2 - Diciembre 1998. Instituto de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia, UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

GÓMEZ ECHEVERRI, Mónica María y VANEGAS GÓMEZ, Emerson León. Evaluación de la producción de esteroides a partir del jugo de fique con *Cunninghamella* spp. Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín. Facultad de Ingeniería Química. 2001.

GÓMEZ H. Jorge E. Evaluación del extracto de fique en el desarrollo *in-vitro* de *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz) Penz & Sacc. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Corpoica. Popayán: 2001.

GORDON, R.E. y WILLIAM, C.H. The genus *Bacillus*. Estados Unidos, Department of Agriculture. Agriculture Handbook N° 427. 1973.

GRANADA, N., Efecto de once extractos vegetales sobre el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont de Bary) en papa (*Solanum phureja* Juz. et Buk). Revista agronomía. Vol. 10 No. 1-2. 2002. 148 p.

HERNANDEZ CASTILLO, FD *et al.* Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton* (B. Aires) [online]. 2008, vol.77 [citado 2011-07-05], p. 241-252. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572008000100020&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1851-5657.

JARAMILLO, S., Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias agropecuarias, 2004. 137 p.

KIM, D.S., COOK, R.J., WELLER, D.M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*. 1997. p. 551-558.

KONEMAN E., *et al.* Diagnóstico Microbiológico. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. 2000.

KORSTEN, L., DE VILLIERS, EE., WEHNER, RC and KOTZET, JM. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvet fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease*. 1997. p. 455-459.

LAGOS, L. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el departamento de Nariño. Universidad del Valle, Cali. Tesis Msc en Microbiología. 2002. p. 45.

LAGUNAS, J., E. *et al.* *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev Mex Fitopatología. 2001. p. 57-61.

MADR, IICA & CORPOICA. Diagnóstico Estratégico de la Cadena del Fique. Bogotá D.C., 2004.

MARTÍNEZ, Angélica María y CAICEDO, Tania Ximena. Bioensayo de toxicidad de los jugos de fique en peces, en el municipio de Tambo (Nariño). Bogotá: Universidad El Bosque, 2002. 26 p. Tesis de Postgrado en la especialización de Salud Ambiental.

ORIETTA, F Y LARREA, V. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Costa Rica. 2002. 110 p.

PEREIRA DE MELO, Flávia M. ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELO ENDÓFITICO DE MANDIOCA *Bacillus pumilus* MAIIM4a. Universidad de Sao Paulo, Área de Microbiología Agrícola. Estado de Sao Paulo. Piracicaba. Maio. 2005.

PÉREZ W., FORBES G. Manual Técnico. *El tizón tardío de la papa*. 2008. Centro Internacional de la Papa. Apartado 1558, Lima, Perú. cip@cgiar.org.

RANGEL, T., Karen, A. *et al.* Control biológico: una forma efectiva y ecológica para el combate de plagas. 2010.

REINOSO P., Yaritza. *et al.* CEPAS DE *Brevibacillus laterosporus* Y *Brevibacillus brevis* ANTAGONISTAS DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS DEL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.). Universidad de La Habana, Departamento de Microbiología y Virología. Ciudad de La Habana. Fitosanidad, Vol 11, N° 2. 2007. 7 p.

RHEINHEIMER, G. Microbiología de las aguas. Editorial Acribia, Zagagoza, España. 1987. 299 p.

RÍOS ALVEAL, Jorge Eduardo. Formación de biopelículas por adherencia bacteriana a probetas de Cobre. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 2002. 49 p.

RIVEROS, *et al.* Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) De Bary a Metalaxil en cultivo de papas en el norte de Chile. Agricultura técnica Chile. 2003. p. 117-124.

RODERO, L., *et al.* Pruebas de sensibilidad in vitro para levaduras: Evaluación de un micrométodo. Rev Argent Micol. 1995.

RODRÍGUEZ F., Verónica L. *et al.* MICROORGANISMOS DEL JUGO DE FIQUE CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE AL PATÓGENO *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. En : CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. (45° : 2010 : Armenia). Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Armenia : Universidad del Quindío. 2010. 108 p.

RODRÍGUEZ, A. *Vademécum* del cultivo de la papa. Bogotá, Colombia, Grafemas Ltda. 1996. 172 p.

SANTOYO, G., *et al.* Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* zum 80 hacia hongos fitopatógenos. 2010. 58 p.

SCRAGG, Alan. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en proceso tecnológico. Ed LIMUSA, NORIEGA EDITORES. Balderas, México DF. 1997.

SINGH N., *et al.* Biological control of root fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World J. Microbiology Biotechnology. 24:1669-1679. 2008.

TICONA, Virginia., *et al.* Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotóxicos como indicadores de potenciales antitumorales. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Etioquímicas. Vol VI. 1998. 14 p.

TODAR, Kenneth. Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias. University of Wisconsin-Madison. 2000.

TORRES, LA., *et al.* Actividad antagónica de especies de *Bacillus* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanidad. [online]. 2001. Disponible en la World Wide:

Web:<http://www.papandina.cip.cgiar.org/fileadmin/documentpool/Administrativo/Informe/Fase/06-10-11-Compendio_2002_2006.pdf>

RAMÍREZ, Margarita *et al.* Aprovechamiento Integral del Fique : USOS ALTERNATIVOS Y SU POTENCIAL. UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA. Itaguí, Colombia : Dirección Agrícola y ambiental. 2010. 12 p.

VALDEZ, Cesar Y VÁZQUEZ, Alba. INGENIERÍA DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE AGUAS RESIDUALES. Crecimiento de la biomasa y utilización del sustrato. México, D.F. 2003.

VARY, Patricia. *Bacillus megaterium* 101. Genetics, Plasmids and Sequencing. NIU. Dept. Biological Sciences. 2007. 2 p.

ZABALETA, M., Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. México, Terra. Vol. 17 No. 3. 2000. p. 23-26.