

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL JUGO DE FIQUE (*Furcraea gigantea*)
FERMENTADO CON LA LEVADURANATIVA *Candida guilliermondii* M2L
CONTRA *Phytophthora infestans* DE LA PAPA EN CONDICIONES *in vitro*.**

**MARÍA ALEJANDRA DE LA CRUZ LÓPEZ
DIANA CAROLINA MARROQUÍN BRAVO**

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

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL JUGO DE FIQUE (*Furcraea gigantea*)
FERMENTADO CON LA LEVADURANATIVA *Candida guilliermondii* M2L
CONTRA *Phytophthora infestans* DE LA PAPA EN CONDICIONES *in vitro*.**

**MARÍA ALEJANDRA DE LA CRUZ LÓPEZ
DIANA CAROLINA MARROQUÍN BRAVO**

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

**Director
Ph.D, Pablo Fernández Izquierdo**

**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 1° 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 Romo

Dr. Andrés Hurtado Benavides

San Juan de Pasto, Septiembre de 2011

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Nelly

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis familiares

A mi hermana Patricia por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos de momentos difíciles; a mi hermanos Andrés, Lorena, Víctor, Melanie y Jennifer, por su apoyo incondicional.

A mis maestros

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de mi estudio profesional y para la elaboración de esta tesis.

A mis amigos

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

A la universidad de Nariño y en especial a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

María Alejandra De la Cruz López

DEDICATORIA

A Dios
Por la vida

A mis padres y familiares
Por su apoyo incondicional

A mis profesores
Por sus enseñanzas

A mis amigos
Por los momentos compartidos.

Diana Carolina Marroquín Bravo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Nariño por permitirnos culminar nuestra carrera.

Grupo de Investigación TEA por la colaboración brindada.

Personal Planta Piloto por la colaboración brindada.

Dr. Pablo Fernández Izquierdo por su colaboración y asesoría especializada en el desarrollo del trabajo de grado.

MSc. Dolly Revelo por su asesoría, colaboración y correcciones en el trabajo de grado.

Dr. Andrés Hurtado por su asesoría y correcciones en el trabajo de grado.

Biólogo Guido Villota por la colaboración brindada.

Ing. David Álvarez por su asesoría y colaboración.

Iván Otero por su asesoría y colaboración.

Alexander Pantoja por su apoyo y colaboración.

A todas las personas que participaron en el desarrollo de la investigación de forma directa e indirecta.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. MARCO REFERENCIAL	22
3.1 JUGO DE FIQUE	22
3.1.1 Efecto biocida del jugo de fique.....	23
3.1.2 Flora microbiana del jugo de fique.....	24
3.2 LEVADURAS	25
3.2.1 Genero candida.....	25
3.2.2 Necesidades nutricionales.....	27
3.3 PATÓGENO <i>Phytophthora infestans</i>	28
3.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 OBJETIVO GENERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. METODOLOGÍA	30
5.1 OBTENCIÓN DE JUGO DE FIQUE.....	30
5.2 MICROORGANISMO EMPLEADO.....	30
5.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>C. guilliermondii</i> M2L EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	30
5.4 SELECCIÓN DEL MEDIO A BASE DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON <i>C. guilliermondii</i> M2L CONTRA <i>P. infestans</i>	31

5.4.1	Diseño experimental.	32
5.4.1.1	Porcentaje de inhibición.	32
5.5	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EDAD Y CANTIDAD DE INÓCULO; TEMPERATURA Y AGITACIÓN EN EL MEDIO SELECCIONADO CONTRA <i>P. infestans</i>	33
5.5.1	Edad y cantidad de inóculo.	33
5.5.2	Temperatura y agitación.	34
5.5.2.1	Diseño experimental.	35
5.6	DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA CANTIDAD MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON <i>Candidaguilliermondii</i> M2L CONTRA <i>P. infestans</i>	35
5.6.1	Diseño experimental.	36
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	37
6.1	EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>C. guilliermondii</i> M2L EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.	37
6.2	SELECCIÓN DEL MEDIO A BASE DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON <i>Candidaguilliermondii</i> M2L CONTRA <i>Phytophthora infestans</i>	40
6.3	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EDAD Y CANTIDAD DE INÓCULO; TEMPERATURA Y AGITACIÓN EN EL MEDIO SELECCIONADO CONTRA <i>P. Infestans</i>	43
6.3.1	Evaluación del efecto antagónico para edad y cantidad de inóculo.	44
6.3.2	Evaluación del efecto antagónico para temperatura y agitación.	47
6.4	DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA CANTIDAD MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON <i>Candidaguilliermondii</i> M2L CONTRA <i>P. infestans</i>	50
7.	CONCLUSIONES.	57
8.	RECOMENDACIONES.	58

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Composición química de la hoja de fique	22
Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo.....	31
Cuadro 3. Composición de los bioinsumos.	32
Cuadro 4. Niveles del diseño factorial 2 ² para determinar la influencia de la edad y cantidad del inóculo en el porcentaje de inhibición.	34
Cuadro 5. Niveles del diseño factorial 2 ² para determinar la influencia de la temperatura y agitación en el porcentaje de inhibición.	35
Cuadro 6. Concentraciones del bioinsumo aplicadas a la unidad experimental..	36
Cuadro 7. Rango exploratorio para determinar la concentración mínima inhibitoria.	36
Cuadro 8. Medias del porcentaje de inhibición (PI) presentado por los bioinsumos	40
Cuadro 9. ANOVA para las medias del porcentaje de inhibición del fitopatógeno <i>P. infestans</i> según el bioinsumo aplicado.....	41
Cuadro 10. Prueba LSD de Fisher para las medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno <i>P. infestans</i> según el bioinsumo aplicado, a un 95% de nivel de confianza.....	41
Cuadro 11. Medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno <i>P. infestans</i> según la edad y cantidad de Inóculo.	44
Cuadro 13. Medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno <i>P. infestans</i> según temperatura y agitación.	47
Cuadro 14. ANOVA para las medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno <i>P. infestans</i> según temperatura y agitación.	47
Cuadro 15. Media del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno <i>P. infestans</i> , presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango de 10.000 a 45.000 ppm.....	51

Cuadro 17. Prueba de múltiples rangos para el porcentaje de inhibición (PI) del patógeno *P. infestans*, presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango de 10.000 a 45.000 ppm. . 52

Cuadro 18. Medias de los porcentajes de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* presentados por el bioinsumo M2 optimizado para las distintas concentraciones dentro del rango de 15.000 a 25.000 ppm... 53

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Curva de crecimiento de <i>Candidaguilliermondii</i> M2L en el medio 1, medio 2 y medio 3.	37
Figura 2. Consumo de sustrato de la levadura <i>C. guilliermondii</i> M2L en el medio 1, medio 2 y medio 3.	38
Figura 3. Sensibilidad del fitopatógeno <i>P. infestans</i> según el bioinsumo aplicado.	43
Figura 4. Efecto de las variables edad y cantidad de inóculo sobre el porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno <i>P. infestans</i>	45
Figura 5. Sensibilidad del fitopatógeno <i>P. infestans</i> al bioinsumo M2 según la edad y cantidad de inóculo.	46
Figura 6. Efecto de las variables temperatura y agitación sobre el porcentaje de inhibición del fitopatógeno <i>P. infestans</i>	48
Figura 7. Sensibilidad del fitopatógeno <i>P. infestans</i> al bioinsumo M2 según temperatura y agitación.	50
Figura 8. Evaluación de la sensibilidad del patógeno <i>P. infestans</i> presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango inicial de de 15.000 a 45.000 ppm.	52
Figura 9. Sensibilidad del patógeno <i>P. infestans</i> al bioinsumo M2 optimizado dentro del rango de 15.000 a 25.000 ppm.	54
Figura 10. Comparativo de la sensibilidad del patógeno <i>P. infestans</i> en medio agar tomate enmendado con 18.000 ppm del bioinsumo M2 optimizado frente al testigo después de 8, 15 y 21 días de incubación.	55

GLOSARIO

ANTAGONISMO: interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos.

BIOINSUMO: recurso o producto biológico producido comercialmente para ser utilizado en cultivos. Aquellos que tienen una acción plaguicida se utilizan principalmente en programas de manejo integrado de cultivos.

DISEÑO EXPERIMENTAL: metodología que utiliza principios estadísticos para diseñar pruebas o ensayos que generen la mayor cantidad de información posibles y al menor costo.

FACTORES: son las variables que se estudian en una experimentación con el fin de medir su efecto sobre la o las variables de respuesta.

FERMENTACIÓN: producción industrial de biomasa, enzimas o metabolitos mediante el crecimiento controlado de microorganismos, en biorreactores y las condiciones de cultivo son en la mayoría de los casos aeróbicas a fin de obtener un máximo rendimiento en la producción.

JUGO DE FIQUE: es un subproducto orgánico de origen vegetal, resultante de la obtención de fibras a partir de la *Furcraea*, que junto con el bagazo representan el 96% del peso de la hoja.

VARIABLE INDEPENDIENTE: aquélla que es manipulada por el investigador en un experimento con el objeto de estudiar cómo incide sobre la expresión de la variable dependiente.

VARIABLE DEPENDIENTE: propiedad o característica que se trata de cambiar mediante la manipulación de la variable independiente.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del jugo de fique fermentado con la levadura *Candida guilliermondii* M2L contra *Phytophthora infestans* de la papa en condiciones *in vitro*. El jugo de fique se empleó por sus características biocidas (Álvarez *et al.*, 2010) y se fermentó con la cepa *C. guilliermondii* M2L obtenida en previas investigaciones a partir de jugo de fique, porque presentó la mejor inhibición frente al fitopatógeno *P. Infestans* (Rodríguez *et al.*, 2010). Para el desarrollo de la investigación, se desarrollaron 3 bioinsumos resultantes de la fermentación de diferentes medios a base de jugo de fique con *C. guilliermondii* M2L y se evaluó su efecto antagónico frente a *P. Infestans*. El mayor porcentaje de inhibición (PI) de esterito patógeno fue de 92,63% cuando se aplicó el bioinsumo M2, que consistió de jugo de fique suplementado con 10% p/v de sacarosa y fermentado con la levadura. El bioinsumo M2 fue optimizado bajo las siguientes condiciones: un cultivo de levadura de 24 horas de edad e inoculado al 15% v/v y la fermentación se llevó a cabo a 30°C y a 110 rpm; con este bioinsumo optimizado se alcanzó un porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* del 99,72% y se encontró que su concentración mínima inhibitoria (CMI) frente al fitopatógeno *P. Infestans* fue de 16.000 ppm y la concentración letal fue de 18.000ppm.

Palabras claves: Jugo de fique, *Phytophthora Infestans*, *Candida guilliermondii* M2L, Fermentación, Concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

This research work evaluated the effect of sisal juice fermented with yeast *Candida guilliermondii* M2L against *Phytophthora infestans* in potato *in vitro*. Sisal juice was used for their biocidal properties (Alvarez *et al.*, 2010) and fermented with the strain *C. guilliermondii* M2L obtained in previous research from sisal juice, because it presented the best inhibition against the plant pathogen *P. Infestans* (Rodríguez *et al.*, 2010). To develop research, developed 3 bio-products resulting from fermentation of different media based on sisal juice with *C. guilliermondii* M2L and evaluated their antagonistic effect against *P. infestans*. The highest percentage inhibition (PI) of this phytopathogen was 92,63% when applied bio-products M2, which consisted of sisal juice supplemented with 10% p/v sucrose, and fermented with yeast. The bio-products M2 was optimized under the following conditions: a yeast culture from 24 h old and inoculated to 15% v/v and the fermentation was carried out at 30°C and 110 rpm; optimized this bio-products reached a percentage of inhibition of the phytopathogen *P. infestans* of 99,72% and found that its minimum inhibitory concentration (MIC) against phytopathogenic *P. infestans* was 16.000 ppm and the lethal concentration was 18.000ppm.

Keywords: sisal juice, *Phytophthora infestans*, *Candida guilliermondii* M2L, Fermentation, minimum inhibitory concentration.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una gran variedad de residuos agroindustriales como el bagazo de caña, lactosuero, paja y jugo de fique, entre otros, que son susceptibles de ser utilizados como materia prima en diversos procesos fermentativos para la obtención de diversos subproductos y que hacen ventajoso su uso por ser una fuente abundante y de bajo costo en el mercado (Villalba *et al.*, 2009). Además del valor económico de los productos obtenidos, estos procesos podrían hacer parte del tratamiento para un mejor manejo ambiental de estos residuos.

En Colombia, el área cultivada con plantas de fique es superior a las 23.000 hectáreas (MAVDT *et al.*, 2006), con una producción aproximada de 18.743 toneladas de fibra de fique, la cual representa únicamente el 4% del peso; el restante 96%, es decir, las restantes 449.832 toneladas son desechos industriales (jugo de fique y bagazo), arrojados principalmente a las fuentes hídricas; lo que genera altos niveles de contaminación debido a las propiedades fisicoquímicas de los jugos por cuanto estos tienen un alto contenido de azúcares, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa, esteroides y minerales, además de la existencia de sapogeninas y su responsabilidad como agente tóxico que matan de forma indiscriminada peces pequeños y grandes (Martínez&Caicedo, 2002).

Por los problemas ambientales derivados del desfibrado del fique, la cadena productiva del fique ha avanzado en investigaciones que abarcan la utilización del jugo de fique en la fabricación de productos fungicidas, estudios *in vitro* han permitido 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" (*Solanumquitoense*) y "Antracnosis del Tomate de Árbol" (*Solanumbetacea*) (Gómez, 2002).

Tradicionalmente el uso de fungicidas sintéticos es la principal medida para el control de enfermedades en los cultivos de solanáceas de alta rentabilidad como: papa, tomate de árbol y lulo; sus principales desventajas radican en su alto costo, contaminación ambiental, inducir resistencia en los patógenos y por presentar problemas de toxicidad debido a su alta residualidad en los productos alimenticios (Wilson & Wisnieski, 1994).

El jugo de fique, por su alto contenido de moléculas orgánicas y bajo condiciones de almacenamiento adecuadas, favorece el desarrollo de comunidades microbianas que mediante un proceso de fermentación controlado intensifican las propiedades biocidas de dicho jugo, como es el caso de 5 cepas de levaduras que presentaron una buena inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. infestans*, las pruebas de antagonismo contra el patógeno *P. infestans* se realizaron empleando la técnica de sensidiscos impregnados con extractos de los metabolitos obtenidos después de un proceso de fermentación controlado; finalmente se escogió la cepa de levadura que presentó mayor inhibición y que corresponde a la levadura *Candida guilliermondii* M2L (Rodríguez *et al.*, 2010). La cepa de levadura *C. guilliermondii* M2L fue utilizada a lo largo de esta investigación.

En esta investigación se evaluó el efecto antagónico frente a *P. infestans* de 3 bioinsumos, los cuales se obtuvieron por la fermentación del jugo de fique de distintas composiciones con la levadura *C. guilliermondii* M2L y se compararon con un control compuesto por jugo de fique sin fermentar. De ellos se escogió el bioinsumo que presentó mayor porcentaje de inhibición frente a *P. infestans* y posteriormente se sometió a cambios de variables de fermentación tales como: edad y cantidad de inóculo, agitación y temperatura. Finalmente obtenido el bioinsumo optimizado, con el que se alcanzó un mayor porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*, se determinó la concentración mínima de inhibición y la concentración letal del bioinsumo frente al fitopatógeno *P. infestans*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Del fique dependen económicamente en el país 70.000 familias, ubicadas por lo general en zonas marginales y conformando el grupo social más deprimido de Colombia (MADR *et al.*, 2004). Paradójicamente, el cultivo es uno de los mayores generadores de empleo en el país, pero los productores viven por debajo de la línea de pobreza (MADR *et al.*, 2009).

La obtención de la fibra de fique no es un proceso eficiente, ya que solo se aprovecha el 4,3% de la planta para la generación de valor agregado como fibra y el 95,7% restante constituido por jugo y bagazo se desperdicia. Además, el vertimiento resultado del flujo en la mayoría de los casos llega a contaminar las fuentes hídricas, dado que el bagazo y el jugo de fique contienen sustancias tóxicas como las saponinas, que al oxidarse desplazan el oxígeno disuelto en el agua, afectando la ictiofauna de las quebradas, al igual que otras sustancias que afectan la disponibilidad del recurso para el consumo humano y animal (IDEAM *et al.*, 2002).

Por otra parte, el cultivo de papa en Colombia, es la principal actividad agrícola de clima frío, dispersa en unos 250 municipios con predominio de agricultores minifundistas. En el cultivo de papa se presentan ataques de plagas y enfermedades que obligan a los agricultores a realizar labores de prevención, manejo y control, acordes con la disponibilidad de recursos técnicos y financieros (MAVDT *et al.*, 2004).

Para el caso específico de la gota de la papa, la enfermedad de mayor importancia económica del cultivo de la papa, la cual llega a causar pérdidas hasta del 100% de la producción cuando se presentan condiciones óptimas para su desarrollo, los agricultores realizan aspersiones dirigidas a la parte aérea de la planta con fungicidas de síntesis química, preventivos o preventivos-curativos, a lo largo del ciclo del cultivo, los cuales no solo incrementan los costos de producción, sino que ocasionan una disminución en sus ingresos sin contar también los elevados costos ecológicos que se generan en las zonas productoras por el uso de estos productos (CORPOICA, 2000).

El uso de fungicidas para el control de la plaga normalmente genera problemas graves como la resistencia del patógeno, siendo el caso de la resistencia al producto Metalaxyl, donde se encontró mediante pruebas *in vitro* que el porcentaje

de inhibición de este producto era mínimo y que la mayoría de asilamientos de *P. infestans* de la papa evaluados en condiciones de Cundinamarca mostraban características de resistencia (Maldonado *et al.*, 2004). Para contrarrestar este impacto, se encuentra el uso de biocidas obtenidos a partir de extractos de plantas, que han sido utilizados como plaguicidas con anterioridad, pero con el desarrollo y difusión de uso de sustancias sintéticas, estos fueron abandonados y hoy su estudio contribuye a una aproximación en la estrategia para el manejo integrado de plagas y enfermedades (Arnason *et al.*, 1989).

Actualmente se ha evaluado la actividad antagónica del jugo de fique en condiciones *in vitro* fermentado con su flora nativa frente al patógeno *P. infestans* (Álvarez *et al.*, 2010), al igual que en un estudio realizado por Rodríguez *et al.* (2010), donde se aislaron 23 cepas de levadura del jugo de fique, de las cuales 5 presentaron una buena inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. infestans*, y en el que se encontró que *C. guilliermondii* M2L presentó la mejor inhibición al patógeno. Para aprovechar el alto contenido de moléculas orgánicas y las propiedades biocidas del jugo de fique, al igual que el potencial antagónico de los metabolitos formados por *C. guilliermondii* M2L, en esta investigación se combinaron los dos factores para obtener un nuevo bioinsumo que presente mayor inhibición frente a *P. infestans* de la papa y se dio respuesta a la pregunta ¿Cual es el efecto del jugo de fique fermentado con la levadura *Candida guilliermondii* M2L frente a *Phytophthora infestans* de la papa?

2. JUSTIFICACIÓN

En Colombia el cultivo de fique es un sector con importantes connotaciones de índole económica y social, de él dependen económicamente en el país 70.000 familias. Los principales departamentos productores de fique se ubican en la región andina del país, son 13 departamentos y se calcula en 72 los municipios productores de fique (MADR *et al.*, 2004). Los cinco (5) principales departamentos productores son Nariño, Cauca, Antioquia, Santander y Boyacá que representan el 99% de la superficie cosechada, estimada en más de 23.000 hectáreas (MAVDT *et al.*, 2006)

Actualmente, en el departamento de Nariño se producen aproximadamente 103.000 toneladas de jugo de fique al año (Martínez& Caicedo, 2002), las cuales son susceptibles de transformarse en diversos productos agroindustriales, por tener un gran potencial biocida que se pueden utilizar en el control de patógenos, constituyendo una herramienta agrícola con la que se podría reducir o sustituir los agroquímicos tóxicos; permitiendo al productor disminuir su dependencia de insumos químicos y reduciendo los costos de producción de los principales cultivos de nuestra región (MAVDT *et al.*, 2006).

En la naturaleza se encuentran diversos tipos de microorganismo, entre ellos las levaduras, organismos unicelulares que poseen diversas capacidades metabólicas y que pueden utilizar una amplia gama de nutrientes en diferentes condiciones ambientales para generar metabolitos con efecto biocida(Carrillo, 2003); siendo el caso de los cepas de levadura aisladas del jugo de fique que producen metabolitos con efecto inhibitorio frente a *Phytophthora infestans*, en especial la levadura *C. guilliermondii* M2L, que presentó la mejor inhibición (Rodríguez *et al.*,2010).

Con la obtención de un bioinsumos compuesto por jugo de fique fermentado con *C. guilliermondii* M2L,se podrán reemplazar en parte la gran cantidad de agroquímicos tóxicos que se aplican en Nariño para el control de la gota en la papa, ya que su producción se ve afectada por las condiciones ambientales propicias para el crecimiento y ataque del patógeno *P.infestans*, ocasionando grandes pérdidas económicas a los productores que en casos más severos llegan a ser de hasta un 100% del total producido (CORPOICA, 2000).

El desarrollar bioinsumos que provengan de la fermentación del jugo del fique, puede contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de los productores, quienes no solo recibirían ingresos por el 4% de la planta, sino que también podrían recibir beneficios económicos al darle valor agregado al jugo que actualmente se descarta como desecho industrial, lo que podría conllevar a que los empaques hechos con fibra de fique tengan acceso a mercados europeos y de otros países que actualmente los rechazan por los problemas ambientales ligados a su producción, haciendo de la actividad fiquera una inversión más atractiva (MADR *et al.*, 2009).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 JUGO DE FIQUE

Es un subproducto del proceso de obtención de fibra de cabuya y constituye el 70%, esta es una suspensión con características variables, dependiendo de la edad, la estación del año y la fertilidad del suelo (MADR *et al.*, 2004). 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 (MAVDT *et al.*, 2006):

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

Cuadro 1. Composición química de la hoja de fique

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 Agua Lignina Calcio Lipoides Fósforo	Fósforo Sodio Cobre Hierro Manganeso Zinc	1.81% 0.04% 14 ppm 647 ppm 33 ppm 17 ppm

Fuente: Arroyave y Velásquez, 2001

Mediante estudios fitoquímicos preliminares, realizados en la Universidad de Nariño (Benavides *et al.*, 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 (*Furcraeamacrophylla*) y Tunosa Común o Negra Común (*Furcraea gigantea*).

3.1.1 Efecto biocida del jugo de 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 betaceae*) 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 (Gómez, 2002).

Las Facultades de Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial de la UPBM, realizaron una optimización de la obtención del extracto vegetal (material orgánico) del fique y además observaciones del efecto biocida sobre los hongos *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. (Acevedo & Serna, 2004).

Para demostrar el potencial biocida del jugo de fique, Rojas (2008), evaluó el efecto del jugo de fique sobre el hongo *Phytophthora infestans*, causante de la gota de la papa (*Solanum tuberosum*), estabilizando el jugo de fique filtrando al vacío, pasteurizando durante 30 min a 65°C y adicionando 1.000 ppm de sorbato de potasio obteniendo un fungicida con vida útil de seis meses, y evaluando la efectividad del mismo frente a la gota de la papa. Para evaluar el efecto del biofungicida utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) variando concentraciones (3,25%, 7,5% y 11,25%) y lo comparó con el efecto de un fungicida comercial (Manzate) y un testigo al que no le aplicó fungicida. Consideró como variables de respuesta el porcentaje de incidencia de la enfermedad. Mediante el análisis de varianza encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el nivel de efectividad del fungicida Manzate y las concentraciones de 7,5% y 11,25% del biofungicida.

Un estudio similar cuyo objetivo fue el evaluar tratamientos alternativos del tizón tardío o gota de la papa, causado por *P. infestans*, fue el desarrollado por Álvarez *et al.* (2010), en el que evaluó la respuesta de sensibilidad de *P. infestans* al bioinsumo de fique (*Furcraea gigantea* Vent), comparándolo con productos

comerciales como: Ridomil Gold[®] (Metalaxyl-M + Mancozeb), y Curzate[®] (Cymoxanil + Mancozeb); para el análisis utilizó un diseño irrestrictamente al azar (D.I.A) con arreglo factorial, donde el factor A correspondió a los tratamientos evaluados y el factor B las diferentes concentraciones (10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) enmendadas en el medio de cultivo agar tomate y sobre ellos se colocó discos de micelio de 1.1cm de diámetro en las diferentes unidades experimentales; el crecimiento radial *in vitro* fue medido después de ocho días; mostrando diferencias en los resultados altamente significativas (P 0,05) en los tratamientos evaluados; demostrando que el aislamiento evaluado fue altamente susceptible a altas concentraciones del extracto de fique, para ello calculó la concentración efectiva cincuenta (EC₅₀) obteniendo valores de 4,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el producto Ridomil Gold[®] y 4,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Curzate[®], explorando un rango preciso para el bioinsumo: 10.000, 25.000, 50.000, 75.000 y 100.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, definiendo una EC50 de 8.912 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y una concentración capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* en 75.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estos valores se convierten en estimativos para el cálculo de la dosis de aplicación del extracto de fique en el control del patógeno *P. infestans* en condiciones de campo.

En el trabajo de investigación reportado por Latorre y Pantoja (2011), encontraron que el jugo de fique puede conservar sus características biocidas; aplicando al jugo un tratamiento térmico que disminuya considerablemente la presencia de las enzimas peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PPO) posibles causantes del deterioro del jugo. La mejor combinación de temperatura-tiempo que presentó una reducción de la actividad enzimática y un menor porcentaje de crecimiento de *P. infestans* fue 75°C por 4min, reportando unos valores de actividad residual para POD de 10,6% y para PPO de 3,2%; y porcentaje de crecimiento de 2,1%.

3.1.2 Flora microbiana del jugo de fique. El jugo de fique, por su alto contenido de moléculas orgánicas y bajo condiciones de almacenamiento adecuadas, favorece el desarrollo de comunidades microbianas, siendo el caso de 67 cepas (44 bacterias y 23 levaduras), aisladas del jugo de fique y seleccionadas de acuerdo a sus atributos culturales y microscópicos; algunos cepas de levaduras se identificaron con pruebas API 20C AUX entre las que se encuentran: *Rhodotolura mucilaginosa* 2, *Candidakrusei/inconspicua*, *Candidafamata*, *Candida guilliermondii*, *Candidalusitane*, entre otras; y con pruebas API 50CHB bacterias entre las que se encuentran: *Bacillusmegaterium*, *Bacilluslentus*, *Bacillusmycooides*, *Bacillussubtilis/amyloliquefaciens*, *Bacilluslicheniformis*, *Brevibacilluslaterosporus*, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2010).

3.2 LEVADURAS

Las levaduras son organismos unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen diversas capacidades metabólicas, pueden utilizar una amplia gama de nutrientes en diferentes condiciones ambientales y se reproducen por gemación dando lugar a conidias hijas (Restrepo *et al.*, 2004). Además de desarrollar mecanismos adaptativos a condiciones adversas, muchas levaduras son utilizadas como agentes de control biológico por crecer de forma saprofita, utilizando una amplia variedad de sustratos, rangos de pH, diferentes temperatura y bajas cantidades de agua disponible (Uribe, 2007). Aunque variaciones en las condiciones físicas del medio de cultivo, como cambios en la temperatura, pH y aireación, afectan el crecimiento de las levaduras; por lo tanto, este tipo de factores se deben controlar para generar una constante en la población de levaduras (Kirsop, 1987).

Las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiología, la mayoría necesitan más humedad para crecer y desarrollarse. El intervalo de temperatura de crecimiento de las levaduras es en general, parecido al de los hongos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 48°C, debe escogerse la temperatura adecuada para conseguir el máximo crecimiento y formación de metabolitos (Uribe, 2007). Una reacción ácida del medio, próxima a un pH de 4 a 4.5, estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos, no crecen, a no ser que se hayan adaptado a los mismos, crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis, por lo tanto el medio de cultivo se debe mantener en continua agitación, permitiendo el intercambio de gases entre el medio y la atmosfera interior (Custodio, 2009). Algunas levaduras el rango de agitación se encuentra en el rango de 100 a 300 (Díaz *et al.*, 2005).

3.2.1 Genero candida. Dentro de las levaduras se encuentra el género *Candida* este género pertenece a la clase *Blastomycetes* que comprende las levaduras imperfectas o asexuales (López, 2005). Las especies de *Candida*, son clasificadas como levaduras, que frecuentemente se confunden con los hongos, pero estas poseen un predominante modo unicelular de desarrollo (Odds, 1988). El género *Candida* abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que solo 18 son patógenas, cuya más común característica es la ausencia de una forma asexual (López, 2005).

Entre las especies de *Candida* se encuentra *Candida guilliermondii*, levadura mesófila aerobia, crece entre 28 – 48° C y tolera un pH entre 4–5. (Carrillo, 2003). *C. guilliermondii* asimila azúcares como: glucosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y galactosa, de los cuales fermentan glucosa, sacarosa y galactosa (Prats, 2008); algunos subproductos resultantes de su metabolismo son: 2-metil-1-butanol, 2-feniletanol e isobutanol, los cuales poseen capacidad antagónica; mientras que, el isopentanol y ácido 2-metilbutírico no poseen dicha capacidad (Jiménez, 2010).

Las cepas de levadura *Candida guilliermondii* (cepas 101 y U.S 7) disminuyen la incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinérea*, cuando se aplica simultáneamente con el patógeno en plantas de tomate (Saligkariaset *al.*, 2002). La combinación de tiabendazol a 200 mg mL⁻¹ ya sea con *C. guilliermondii* o *Pichia oleophila* es eficaz para reducir la pudrición de los cítricos causado por *Penicillium* spp. Y *Pichia membranefaciens* mezclado con iprodiona a 100 mg mL⁻¹ redujo significativamente el diámetro de lesiones causadas por *Rhizopus stolonifer* en las frutas nectarina en comparación al tratamiento con la levadura sola. En todos los casos, la enfermedad se redujo significativamente en las frutas tratadas con el fungicida solo en la alta dosis estándar, en comparación con los controles no tratados (Buck, 2003). En el estudio realizado por Zahavi *et al.* (2000), aislaron cepas de microorganismos epífitos, de uvas de mesa y de vino en Israel, que fueron utilizados en la determinación de la actividad antagónica contra *Botrytis cinerea* en uva de mesa; de estos aislados, tomaron dos levaduras (*Candida guilliermondii*, cepa A42 y *Cephalosporium acremonium*, cepa B11) y las evaluaron en el control de la podredumbre en las uvas causadas por *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*.

En los estudios realizados por Mc Laughlin *et al.* (1992), *C. guilliermondii* fue utilizada en suspensión con agua 10⁸ ufc mL⁻¹, e inoculada con 10³ esporangiosporas de *Rhizopus stolonifer* mL⁻¹ o 10⁵ conidios de *B. cinerea* mL⁻¹ encontrando que fue efectiva para el control de la enfermedad en uvas, manzanas y durazno, los mecanismos utilizados son la competencia por nutrientes y la producción de sustancias extracelulares.

En la Universidad de Nariño, por los grupos de investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y Biotecnología Microbiana determinó que la cepa de levadura *C. guilliermondii* M2L aislada del jugo de fique presentó actividad antagónica contra el fitopatógeno *P. infestans*, las pruebas de antagonismo se realizaron empleando la técnica de sensidiscos impregnados de extractos de los

metabolitos de esta levadura obtenidos después de un proceso de fermentación controlada (Rodríguez *et al.*, 2010).

3.2.2 Necesidades nutricionales. Para preparar un medio de cultivo para el crecimiento de levaduras, es necesario determinar que componentes químicos son fuente potencial de alimento para estos microorganismos, debido a que algunas sustancias son más aceptables con respecto a otras, generando en algunas ocasiones efectos antagonistas resultado del crecimiento de levaduras y otro tipo de organismos debido a la presencia de una mezcla de componentes no definidos en el medio (Haettn, 1986).

Las levaduras buscan medios de cultivo que aporten los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir sus necesidades energéticas (Leveau & Bouix, 2000):

- **Carbono:** El carbono es el compuesto mayoritario de la célula de la levadura, alrededor del 50% en peso seco. Los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono (Fiechter *et al.*, 1981). Entre las fuentes de carbono, los carbohidratos son los más frecuentemente utilizados: los carbohidratos simples, los disacáridos y los trisacáridos son metabolizados por un gran número de levaduras (Jones & Greenfields, 1981).
- **Nitrógeno:** El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo y es utilizado por las células en la formación de aminoácidos, nucleótidos y algunas vitaminas; todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ion amonio, los cuales pueden ser aportados en el medio por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, y sobre todo el sulfato amónico siendo este el mejor, y al mismo tiempo aportando el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos (Cooper, 1982).
- **Fósforo:** El fósforo se halla incluido en los ácidos nucleicos y los nucleosidos di y tri-fosfato; es asimilado por la célula en forma de iones orto fosfato (H_2PO_4); las fuentes de fósforo en el medio de cultivo deben estar constituidas por el di hidrogeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) o por el hidrogeno fosfato disodico ($Na_2 HPO_4$)(Schurr & Yagil, 1981).

En el jugo de fique, hay compuestos como celulosa, sacarosa, d-glucosa, fructosa, proteínas, fósforo, calcio, potasio, minerales y agua (MAVDT *et al.*, 2006), que actúan como fuente de macro y micronutrientes para el crecimiento de microorganismos siendo el caso de 67 cepas aisladas del jugo por Rodríguez *et al.* (2010), entre los que se encuentra *C. guilliermondii* M2L.

3.3 PATÓGENO Phytophthorainfestans

Phytophthora significa destructor de plantas y la especie *infestans* es la que causa el tizón tardío o gota de la papa. Esta enfermedad apareció en Europa Continental, en las islas británicas, por lo que se dieron muchas teorías sobre su origen, de manera especial atribuidas al mal clima por lluvias excesivas y polución industrial (Jaramillo, 2004).

Debido a que el patógeno fue asociado al cultivo de la papa que era el cultivo básico en la alimentación a escala mundial tomó gran importancia el estudio del patositem *aPhytophthorainfestans / Solanumtuberosum*, dentro de un contexto de coevolución (Erwin & Ribeiro, 1996).

Cuando los esporangios o zoosporas liberadas por el patógeno *P.infestans* llegan a los tejidos de la planta huésped, emiten un tubo germinativo y entran en los estomas ubicados en el envés de la hoja. Después de la germinación de las esporas, se desarrolla el apresorio y ocurre la penetración al cabo de 16 horas formando las vesículas de infección intracelular y las células epidermales. Después de 46 horas de inoculación de las plantas susceptibles se puede observar una necrosis en el sitio de inoculación. Es decir que durante este tiempo es posible detectar la aparición de la enfermedad en la planta (Jaramillo, 2004).

3.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

CMI es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación; la CMI es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos(Errecalde 2004).Las CMIs pueden ser determinadas mediante métodos de micro dilución en caldo, o métodos en medio sólido, basados en la difusión en agar, tales como difusión de discos, y tiras de Etest (Suárez, 2003).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del jugo de fique (*Furcraea*spp) fermentado con la levadura nativa *Candida guilliermondii* M2L contra *Phytophthora infestans* de la papa en condiciones *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar el medio a base de jugo de fique fermentado con *C. guilliermondii* M2L contra *P. infestans*.
- Determinar el efecto de la edad del inóculo, cantidad del inóculo, temperatura y agitación en el medio seleccionado contra *P. infestans*.
- Determinar *in vitro* la concentración mínima inhibitoria de jugo de fique fermentado con *C. guilliermondii*M2L.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DE JUGO DE FIQUE

Con la utilización de un molino de rodillos, se extrajo el jugo directamente de las pencas de fique de variedad Negra Común (*Furcraea gigantea*), procedente del municipio del Tambo (N). El jugo fue filtrado al vacío, centrifugado a 8.000 rpm durante 15 minutos y almacenado en congelación a -10°C con el propósito de evitar degradación del mismo.

5.2 MICROORGANISMO EMPLEADO

Para el desarrollo de este proyecto se empleó una cepa de levadura aislada de jugo de fique identificada por medio de pruebas API 20C AUX como *Candida Guilliermondii* M2L, seleccionada dado que sus metabolitos mostraron la mejor inhibición frente a *Phytophthora infestans* (Rodríguez *et al.*, 2010).

Esta levadura se activó en caldo nutritivo, y se incubó a 30°C por 24 horas, se repicó en medio YGC, y se realizó una tinción de Gram para garantizar la pureza de las cepas, una vez determinada su pureza se conservaron por triplicado en tubos inclinados de agar YGC.

Para todas las fermentaciones la levadura se activó nuevamente en caldo nutritivo; y se dejó en incubación a 30°C por 24 horas, ajustándose la absorbancia hasta 0,15 +/- 0,01. Para la preparación del inóculo, se tomó 1,5 mL del pre inóculo y se llevó a balones fondo plano de 125 mL que contenían 13,5 mL de jugo de fique y se incubó durante 24 horas a 30°C.

5.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *C. guilliermondii* M2L EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Para evaluar el crecimiento de *C. guilliermondii* M2L, se realizaron fermentaciones en balones de fondo plano de 250 mL con un volumen de fermentación de 150 mL del medio de cultivo inoculado previamente con 10% v/v de inóculo de la levadura, la fermentación se realizó con agitación constante de 90 rpm a 30°C; este procedimiento se aplicó para cada uno de los medios de cultivo. La composición de los medios se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo

Componentes	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Jugo de fique	135 mL	135 mL	135 mL
Sacarosa ^a		10% p/v	10% p/v
KH ₂ PO ₄ ^a			0.1% p/v
(NH ₄) ₂ SO ₄ ^a			0.5% p/v
MgSO ₄ .7H ₂ O ^a			0.05% p/v

Fuente: (Buitrago y Escobar, 2009)^a.

La medición del crecimiento de *C. guilliermondii* M2 se realizó por el método de turbidimetría; para ello se tomaron 5 mL de muestra del medio fermentativo y se realizaron lecturas de la absorbancia de la suspensión celular utilizando un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 600 nm. Se tomaron muestras cada doce horas a partir de los ensayos de fermentación hasta que las curvas de crecimiento se estabilizaron.

Además se utilizó el método de antrona para evaluar el consumo de sustrato por la levadura *C. guilliermondii* M2L: para ello se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugaron a 8.000 rpm por 10 minutos para precipitar el botón celular, se tomó del sobrenadante 0,5 mL y se le adicionaron 5mL de reactivo de antrona y 2mL de agua destilada estéril, se colocó en baño de hielo, posteriormente se llevó a baño maría durante 10 minutos, se retiraron los tubos y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625nm. Se tomaron muestras cada doce horas a partir de los ensayos de fermentación.

5.4 SELECCIÓN DEL MEDIO A BASE DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON *C. guilliermondii* M2L CONTRA *P. infestans*.

A los medios de cultivo fermentados con *C. guilliermondii* M2L, en el presente trabajo se les denomina bioinsumos. En la Cuadro 3 se muestra la composición de cada bioinsumo.

Cuadro 3. Composición de los bioinsumos.

Componentes	Bioinsumo M1	Bioinsumo M2	Bioinsumo M3	Bioinsumo Control
Medio 1	135 mL			135 mL
Medio 2		135 mL		
Medio 3			135 mL	
Inoculo de <i>C. guilliermondii</i>	15 mL	15 mL	15 mL	

Fuente: esta investigación.

Para la obtención de cada bioinsumo, se hicieron fermentaciones en balones de fondo plano de 250 mL, se tomaron 135 mL del medio de cultivo y se le adicionaron 15 mL de inóculo. Las fermentaciones se realizaron con agitación constante de 90 rpm a 30°C y se compararon con el bioinsumo Control compuesto por jugo de fique sin fermentar. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 20min a 15psi y 121°C, su pH se ajustó a 4.5.

Después de 4 días de fermentación se hicieron pruebas de antagonismo de los bioinsumos frente a *P. infestans*, calculando el porcentaje de inhibición.

5.4.1 Diseño experimental. Para el análisis estadístico, se creó un diseño completamente al azar (DCA) y se analizó mediante la utilización del programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.1, por el método de comparación de muestras múltiples, en el que se comparan la media del porcentaje de inhibición de los diferentes bioinsumos. El diseño experimental se realizó por triplicado. Se tomó como variable de respuesta el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*.

5.4.1.1 Porcentaje de inhibición. Para determinar el porcentaje de inhibición, se empleó el fitopatógeno *P. infestans* suministrado por el Grupo de Investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y se siguió el procedimiento utilizado por Álvarez *et al.* (2010). Se tomó como unidad experimental una caja de Petri que contenía agar tomate enmendado con 10.000 ppm de bioinsumo y sobre ella un disco de micelio de 1,17 cm de diámetro de *P. infestans*, se dejó por un periodo de incubación de 8 días a temperatura promedio de 18°C. Como parámetro de comparación se utilizó un testigo sin enmendar. Para medir el diámetro de las colonias de *P. infestans* crecidas en el medio agar tomate, se tomaron fotos de las unidades experimentales y por medio del programa

informático Image Processinganalysis in Java (ImageJ) se determinaron los diámetros.

Al cabo de los 8 días se determinó el porcentaje de crecimiento (PC) utilizando la relación propuesta por Riveros *et al.* (2003), con modificación.

$$PC = \frac{DMCM - 1,17\text{ cm}}{DMCA - 1,17\text{ cm}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde DMCM: Diámetro Medio de Colonia Creciendo en el tratamiento.

DMCA: Diámetro Medio de la Colonia sin Enmendar.

1,17cm: Diámetro del cilindro con micelio.

El valor medio de la colonia sin enmendar usado como testigo correspondió a 4,72 cm, con una desviación estándar de 0,002. Éste valor se empleó para todos los cálculos del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans* (Ecuación 1)

La modificación realizada a la fórmula propuesta por Riveros *et al.*(2003), corresponden a la sustracción del diámetro del cilindro con el micelio (1,17 cm) al diámetro medio de la colonia sin enmendar (DMCA).

Luego se calculó del porcentaje de inhibición (PI), para el análisis de resultados, con la Ecuación propuesta por Ticona *et al*, (1998).

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

5.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EDAD Y CANTIDAD DE INÓCULO; TEMPERATURA Y AGITACIÓN EN EL MEDIO SELECCIONADO CONTRA *P. infestans*.

5.5.1 Edad y cantidad de inóculo. El bioinsumo M2 utilizado por presentar mayor porcentaje de inhibición frente a *P. Infestans* se sometió a cambios en las variables edad y cantidad de inóculo y se fermentó durante 4 días.

Se determinaron los parámetros de la variable cantidad de inóculo de acuerdo a lo descrito por Crueger y Crueger (1993), quien dice que como regla general se usa hasta 10% v/v de inóculo para incrementar la formación de producto, por lo tanto se escogieron valores por debajo y por encima de este que fueron de 5 y 15% v/v

respectivamente, evaluando su efecto en el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*. Para la variable de edad de inóculo se tuvo en cuenta el estudio realizado por Buitrago y Escobar, (2009).

5.5.1.1 Diseño Experimental. Para determinar la influencia de las variables en el porcentaje de inhibición, se realizó un diseño factorial 2^2 con tres puntos centrales y tres replicas, se consideraron como variables independientes la edad y cantidad del inóculo. Los valores máximos y mínimos de estas variables se muestran en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Niveles del diseño factorial 2^2 para determinar la influencia de la edad y cantidad del inóculo en el porcentaje de inhibición.

Condiciones del inóculo	Parámetros a evaluar	
	Mínimo	Máximo
Edad del inóculo ^a	24h	48h
Cantidad de Inóculo	5%v/v	15%v/v

Fuente: (Buitrago y Escobar, 2009)^a.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en balones fondo plano de 250mL que contenían 135mL del jugo de fique suplementado con 10% p/v de sacarosa; con agitación constante de 90 rpm a 30°C. La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición de *P. infestans*. Para calcular el porcentaje de inhibición, se aplicó el procedimiento descrito en el epígrafe 5.4.1.1.

5.5.2 Temperatura y agitación. El bioinsumo M2 compuesto por la fermentación del medio 2 con 15% v/v de inóculo de 24 horas de edad de *C. guilliermondii* M2L, se sometió a cambios en las variables de temperatura y agitación, evaluando su efecto en el porcentaje de inhibición de *P. infestans*.

Para las variables temperatura y agitación se tuvo en cuenta las características de *C. guilliermondii*. Esta levadura es mesófila aerobia y crece a una temperatura entre 28 y 48°C (Carrillo, 2003).

5.5.2.1 Diseño experimental. Para determinar la influencia de las variables en el porcentaje de inhibición, se realizó un diseño factorial 2² con tres puntos centrales y tres replicas, se consideraron como variables independientes la temperatura y agitación. Los valores máximos y mínimos de estas variables se muestran en la Cuadro 5.

Cuadro 5. Niveles del diseño factorial 2² para determinar la influencia de la temperatura y agitación en el porcentaje de inhibición.

Condiciones de fermentación	Parámetros a evaluar	
	Mínimo	Máximo
Temperatura ^a	30°C	40°C
Agitación	90 rpm	110 rpm

Fuente: (Carrillo, 2003)^a.

La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición de *P. infestans*, siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 5.4.1.1.

5.6 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA CANTIDAD MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON *Candida guilliermondii* M2L CONTRA *P. infestans*.

Una vez determinadas las mejores condiciones de fermentación (cantidad de inóculo 15% v/v y edad del inóculo 24 horas; agitación 110rpm y temperatura 30°C), se procedió a encontrar la CMI realizando ensayos en medio sólido, para ello se enmendó el medio agar tomate con diferentes concentraciones del bioinsumo M2 optimizado en un rango de 10.000 a 45.000ppm (Vargas *et al.*,2010), este rango se estableció teniendo en cuenta que a 10.000 ppm hubo crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans* y hasta concentraciones de 45.000 ppm para tener certeza de que el crecimiento de patógeno se inhibió completamente. Las concentraciones del bioinsumo aplicadas al medio agar tomate se muestra en la Cuadro 6.

Cuadro 6. Concentraciones del bioinsumo aplicadas a la unidad experimental.

Nº Concentración	Concentración (ppm)
1	45.000
2	35.000
3	25.000
4	15.000
5	10.000

Fuente: esta investigación.

5.6.1 Diseño experimental. Para el análisis estadístico de la influencia de la concentración del bioinsumo M2 optimizado en la inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *P.infestans*, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) y se tomó como variable de respuesta el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* (epígrafe 5.4.1.1). Se estableció un nuevo rango exploratorio entre las dos concentraciones más bajas donde se produjo la máxima inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*.

Posteriormente se evaluaron concentraciones de 1.000 en 1.000 ppm dentro del rango encontrado como se muestra en la Cuadro 7, en el que se encontró la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración letal del bioinsumo M2 optimizado frente al fitopatógeno *P. infestans*.

Cuadro 7. Rango exploratorio para determinar la concentración mínima inhibitoria.

Nº Concentración	Concentración (ppm)
1	24.000
2	23.000
3	22.000
4	21.000
5	20.000
6	19.000
7	18.000
8	17.000
9	16.000
10	15.000

Fuente: esta investigación.

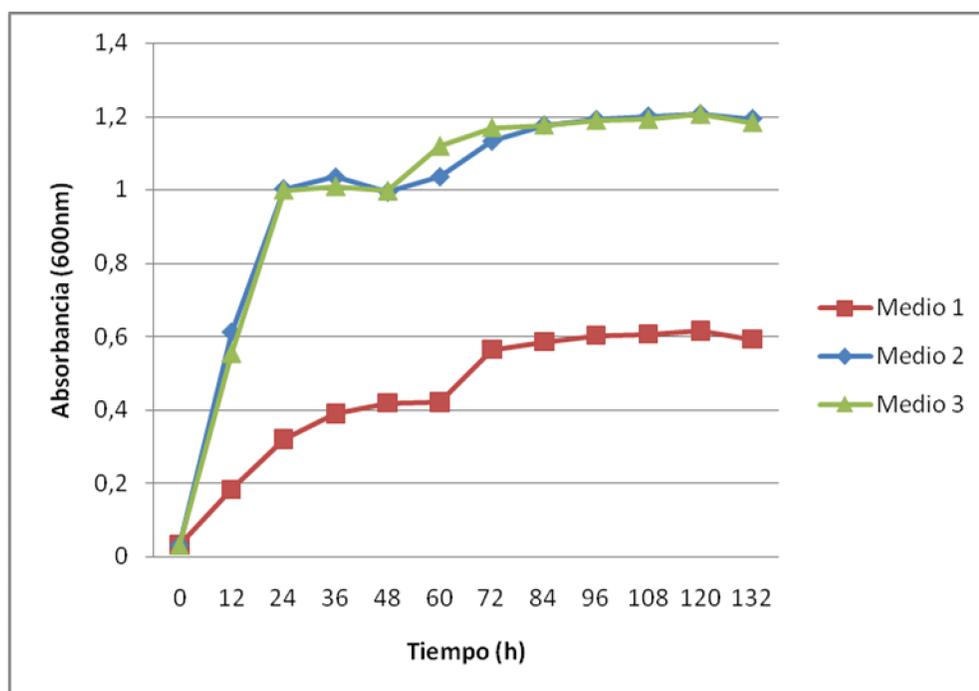
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *C. guilliermondii* M2L EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

Se evaluó el crecimiento de *C. guilliermondii* M2L en los diferentes medios de cultivo y con los resultados obtenidos se fijó el tiempo de fermentación.

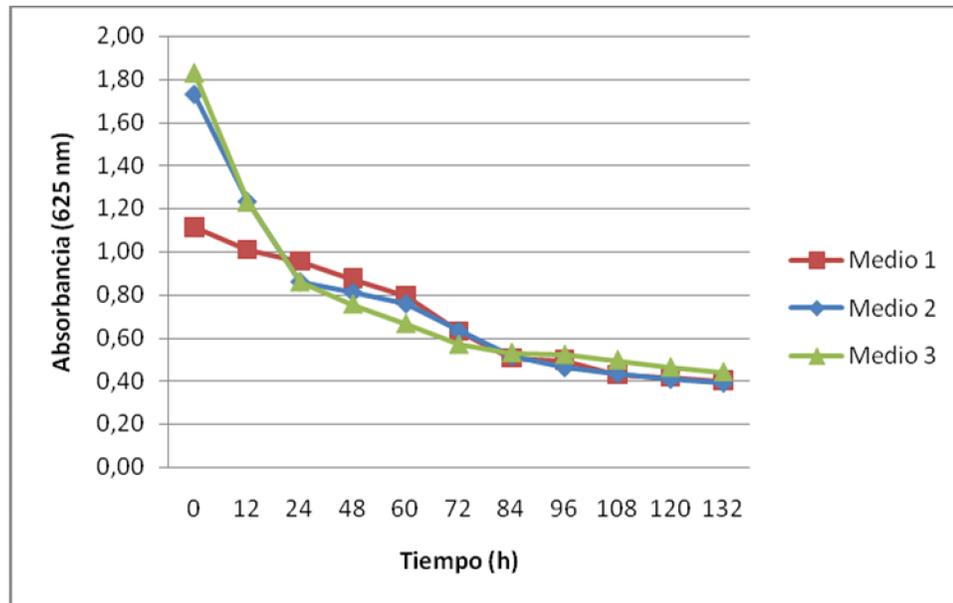
En la Figura 1 y 2, se observa el comportamiento de la levadura *C. guilliermondii* M2L en los diferentes medios de cultivo.

Figura 1. Curva de crecimiento de *Candida guilliermondii* M2L en el medio 1, medio 2 y medio 3.



Fuente: esta investigación.

Figura 2. Consumo de sustrato de la levadura *C. guilliermondii* M2L en el medio 1, medio 2 y medio 3.



Fuente: esta investigación.

El crecimiento de *C. guilliermondii* M2L en los medios de cultivo 1, 2 y 3 (Figura 1), aumenta a medida que la levadura consume el sustrato (Figura 2)

En la Figura 1 se observa que *C. guilliermondii* M2L en cada medio de cultivo no mostró fase de latencia, probablemente porque las condiciones de fermentación a las que se sometió *C. guilliermondii* M2L le permitieron una adaptación al medio en un periodo inferior a doce horas, tiempo al cual se hicieron las mediciones.

Como se observa en la Figura 1, la fase exponencial para *C. guilliermondii* M2L en el medio 1 se mantuvo hasta aproximadamente las 48 horas, al cabo de este tiempo inicio una fase de adaptación que llegó hasta las 60 horas e inició una nueva fase exponencial que se extendió hasta las 72 horas, iniciando una fase estacionaria que se mantuvo hasta las 120 horas.

El comportamiento de *C. guilliermondii* M2L en el medio 2 y en el medio 3 fue muy similar; la fase exponencial se extendió hasta las 24 horas comenzando una fase de adaptación con duración aproximada de 24 horas e inició nuevamente una fase exponencial que dura hasta las 72 horas, llegando a una fase estacionaria que se extiende aproximadamente hasta las 120 horas.

El comportamiento diáuxico presentado por *C. guilliermondii* M2L en los diferentes medios se presentó posiblemente por la composición del jugo de fique en el que se encuentran diferentes fuentes de carbono (MAVDT *et al.*, 2006) de las cuales los microorganismos tienden a utilizar aquella que les proporcione mayor rendimiento energético (Harrison & Rose, 1984). Cuando ésta se acaba hay un tiempo de adaptación y vuelve a crecer utilizando ahora una fuente de energía alternativa (Fiechter *et al.*, 1981).

Aunque no se conocen con exactitud la composición fisicoquímica del jugo de fique se sabe por caracterizaciones hechas por MAVDT *et al.* (2006), que la concentración de azúcares presente en el jugo es inferior al 10%. Además se conoce que el rango óptimo de concentración de azúcares en el que se produce mayor crecimiento de las levaduras se encuentra entre 10 y 18% (Ríos, *et al.*, 2005), por lo que concentraciones de azúcares por debajo del rango óptimo impiden un buen crecimiento de la levadura dado que los compuestos carbonados los utiliza tanto como fuente de energía como de carbono (Stewart & Russel, 1991), siendo esta la razón que explicaría el bajo crecimiento de *C. guilliermondii* M2L en el medio 1 en comparación con los otros dos medios que se suplementaron con sacarosa y en donde la levadura tuvo mayor crecimiento como se observa en la Figura 1.

Por otra parte, como se observa en la Figura 2, el valor más alto de absorbancia se dio en el medio 3 ya que éste fue suplementado con sacarosa y sales, seguido por el medio 2 suplementado solo con sacarosa y por último el medio 1 compuesto solo por jugo de fique. El consumo de azúcares por parte de *C. guilliermondii* M2L fue mayor a las primeras 24 horas en los medios 2 y 3 en comparación con el consumo de azúcares por parte de la levadura en el medio 1, mostrando un buen crecimiento de *C. guilliermondii* M2L cuando hubo mayor consumo de azúcares (Figura 1 y 2).

Con base al comportamiento presentado por *C. guilliermondii* M2L en cada uno de los medios de cultivo (Figura 1), se determinó el tiempo de fermentación para obtener un bioinsumo que inhiba el crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*. Jiménez (2010), en su revisión de literatura sobre el efecto bactericida y/o fungicida de los metabolitos producidos por *C. guilliermondii*, menciona que los metabolitos responsables de la inhibición de diferentes patógenos, se empiezan a acumular en el medio de cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial (inicio de la fase estacionaria). Además Brizuela *et al.* (1998), menciona que la producción de metabolitos secundarios se da al final de la fase exponencial y

durante la fase estacionaria cuando algún nutriente del medio se ha agotado. En base a estos dos argumentos se fijó como tiempo de fermentación 96 h.

6.2 SELECCIÓN DEL MEDIO A BASE DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON *Candida guilliermondii* M2L CONTRA *Phytophthora infestans*.

La selección del medio a base de jugo de fique fermentado con *C. guilliermondii* M2L (bioinsumo), se hizo por medio de la evaluación del efecto antagónico de *P. infestans*, utilizando como variable de respuesta el porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans*.

Los resultados correspondientes a las medias del porcentaje de inhibición obtenidos tras hacer las pruebas de antagonismo frente a *P. infestans* se muestran en la Cuadro 8.

Cuadro 8. Medias del porcentaje de inhibición (PI) presentado por los bioinsumos

Experimento	Media del PI (%)	Desviación Estándar
Bioinsumo M1	30,62	1,38
Bioinsumo M2	92,63	0,65
Bioinsumo M3	92,14	1,56
Bioinsumo Control	4,67	0,71

Fuente: esta investigación.

El análisis de varianza (Cuadro 9) muestra la variabilidad del porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. Infestans* debido a los tratamientos y al error experimental. Este análisis indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 4 ensayos, ya que el p-valor es inferior a 0,05 con un nivel de confianza del 95,0%, indicando que la composición del bioinsumo influye en el porcentaje de inhibición.

Cuadro 9. ANOVA para las medias del porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* según el bioinsumo aplicado.

Fuente	Sumas de cuadrados.	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tratamientos	17769,2	3	5923,07	4513,68	0,0000
Error	10,498	8	1,31225		
Total (Corr.)	17779,7	11			

Fuente: esta investigación.

Para determinar que medias son significativamente diferentes entre sí y cuales no en la Cuadro 10 se muestra la prueba de múltiples rangos utilizando la prueba de comparación LSD de Fisher.

Cuadro 10. Prueba LSD de Fisher para las medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans* según el bioinsumo aplicado, a un 95% de nivel de confianza.

Tratamientos	Muestra	Media del PI (%)	Grupos homogéneos
Bioinsumo Control	3	4,67	X
Bioinsumo M1	3	30,62	X
Bioinsumo M2	3	92,63	X
Bioinsumo M3	3	92,14	X

Fuente: esta investigación.

En la Cuadro 10, se observa que existen tres grupos no homogéneos, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias, además que entre los bioinsumo M2 y M3 no hay diferencias estadísticamente significativas, porque hay un solapamiento entre las medias del porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*.

Aunque con el bioinsumo M2 y el bioinsumo M3 se obtuvieron resultados similares en el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*, se descartó la utilización del bioinsumo M3 por el costo que implica su desarrollo, ya que la adición de componentes diferentes a la sacarosa incrementan costos tanto de producción como de operación.

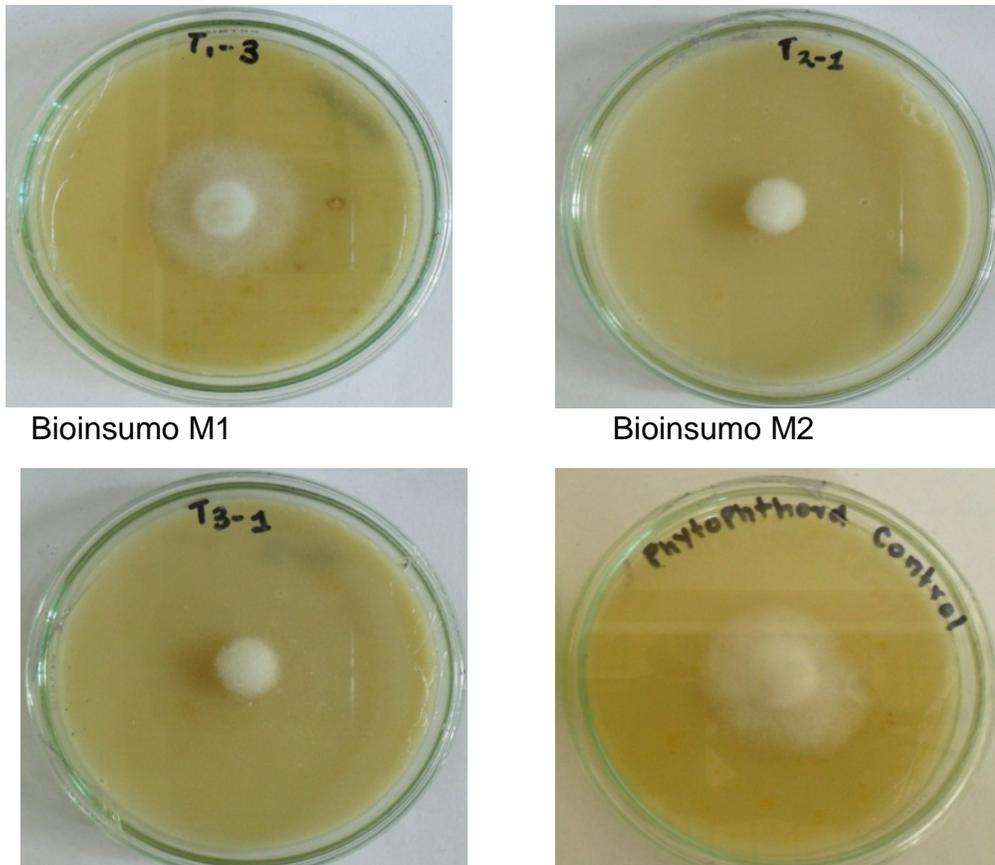
Al momento de comparar los resultados del porcentaje de inhibición del bioinsumo M2 y del bioinsumo Control en un medio agar tomate enmendado con 10.000 ppm de bioinsumo, se observa un incremento cercano al 88%, lo que demuestra que el jugo de fique suplementado con 10% p/v de sacarosa favorece el crecimiento de *C. guilliermondii* M2L, intensificando el potencial biocida del jugo de fique.

El bioinsumos M2 presentó un alto porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* siendo muy similar al porcentaje de inhibición producido por el bioinsumo M3, la razón que podría explicar estos resultados está ligada al crecimiento presentado por *C. guilliermondii* M2L en el medio 2 y en el medio 3, puesto que según Madigan *et al.* (2004), la producción de metabolitos primarios tiene lugar en paralelo con el crecimiento del microorganismo y para obtener una buena formación de metabolitos secundarios es necesario que en la fase de crecimiento exponencial se desarrolle una alta concentración de biomasa, puesto que las vías metabólicas de los metabolitos secundarios arrancan del metabolismo primario, por lo que un retraso en el crecimiento celular afectaría la formación de los metabolitos secundarios.

El aumento en el potencial biocida del jugo de fique está influenciado por la fermentación con la levadura *C. guilliermondii* M2L. Este hecho puede sustentarse en base en que *C. guilliermondii* ha presentado potencial biocida frente a diferentes patógenos como lo demuestran varios estudios, entre los que se encuentra el realizado por Saligkariaset *al.*(2002), quienes demostraron que *C.guilliermondii* (cepas 101 y U.S 7) tiene potencial biocida frente a *Botrytis cinérea* eficaz para reducir la pudrición de los cítricos causado por *Penicillium*spp. y *Pichiamembranefaciens*. Además en el estudio realizado por McLaughlin *et al.* (1992), demostraron que *C. guilliermondii* (cepa A42) fue efectiva para el control de *B. cinérea* en uvas, manzanas y duraznos. Otro estudio que demuestra el potencial biocida de la levadura *C. guilliermondii* es el realizado por Rodríguez *et al.* (2010), quienes demostraron que la levadura *C. guilliermondii* M2L aislada del jugo de fique presentó actividad antagonica frente al fitopatógeno *P. Infestans*.

En la Figura 3 se muestran los registros fotográficos del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans* según el bioinsumo aplicado.

Figura 3. Sensibilidad del fitopatógeno *P. infestans* según el bioinsumo aplicado.



Bioinsumo M1

Bioinsumo M2

Bioinsumo M3 Bioinsumo Control

Fuente: esta investigación.

6.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EDAD Y CANTIDAD DE INÓCULO; TEMPERATURA Y AGITACIÓN EN EL MEDIO SELECCIONADO CONTRA *P. Infestans*.

Con el fin de optimizar las propiedades inhibitorias del bioinsumo M2 frente al fitopatógeno *P. infestans*, se evaluó el efecto de las variables de fermentación: edad y cantidad del inóculo, temperatura y agitación en el porcentaje de inhibición. Los resultados de los diseños de experimentos para la selección de la mejor combinación de estas variables se muestran a continuación.

6.3.1 Evaluación del efecto antagónico para edad y cantidad de inóculo. En la Cuadro 11 se presentan los valores de las medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans*, empleado como criterio de selección para las variables edad y cantidad de inóculo.

Cuadro 11. Medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans* según la edad y cantidad de inóculo.

Experimento	Media del PI (%)	Desviación Estándar
T 1	94,19	0,45
T 2	96,75	0,96
T 3	91,13	0,85
T 4	86,65	0,09
T 5	89,76	0,23

T1: edad inóculo 24h, cantidad 5% v/v; T2: edad inóculo 24h, cantidad 15% v/v; T3: edad inóculo 36h, cantidad 10% v/v; T4: edad inóculo 48h, cantidad 5% v/v; T5: edad inóculo 48h, cantidad 15% v/v.

Fuente: esta investigación.

El análisis de varianza de la Cuadro 12, muestra que el efecto de edad y cantidad de inóculo sobre el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* son significativos cuando se evalúan de forma independiente con un p-valor inferior a 0,05; pero la interacción de los dos no es significativa al tener un p-valor superior a 0,05.

Cuadro 12. ANOVA para las medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans* según la edad y cantidad de inóculo

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A: Edad	158,246	1	158,246	318,47	0,0000
B: Cantidad	24,0635	1	24,0635	48,43	0,0001
AB	0,23213	1	0,23213	0,47	0,5115
Bloques	0,575038	2	0,287519	0,58	0,5802
Error Total	4,47209	9	0,496898		
Total (corr.)	187,589	14			

Fuente: esta investigación

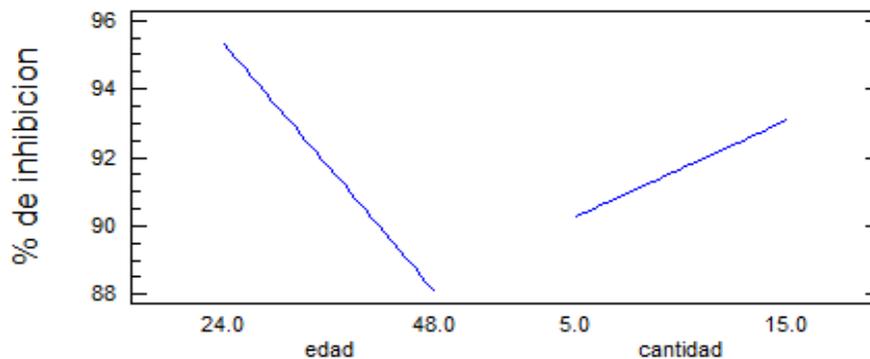
El modelo cuenta con una correlación ajustada $R^2 = 97,616$, lo que significa que el diseño tiene un buen ajuste, permitiendo hacer un análisis confiable sobre las variables implicadas.

El modelo matemático que describe el porcentaje de inhibición fue simplificado al remover la interacción AB ya que esta interacción no presentó diferencias significativas; este modelo se muestra en la ecuación 3. Esta ecuación es la que modela de forma adecuada el porcentaje de inhibición según los resultados obtenidos tras cada experimento, permitiendo predecir los resultados del porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* sin experimentación adicional.

$$\% \text{ de inhibición} = 100,592 - 0,325799 * \text{edad} + 0,199767 * \text{cantidad} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

En la Figura 4 se observa que el efecto de la cantidad de inóculo es positivo en el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. Infestans* cuando es mayor a 5% v/vy la edad del inóculo afecta negativamente al porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. Infestans* cuando es superior a 24 horas.

Figura 4. Efecto de las variables edad y cantidad de inóculo sobre el porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans*.



Fuente: esta investigación.

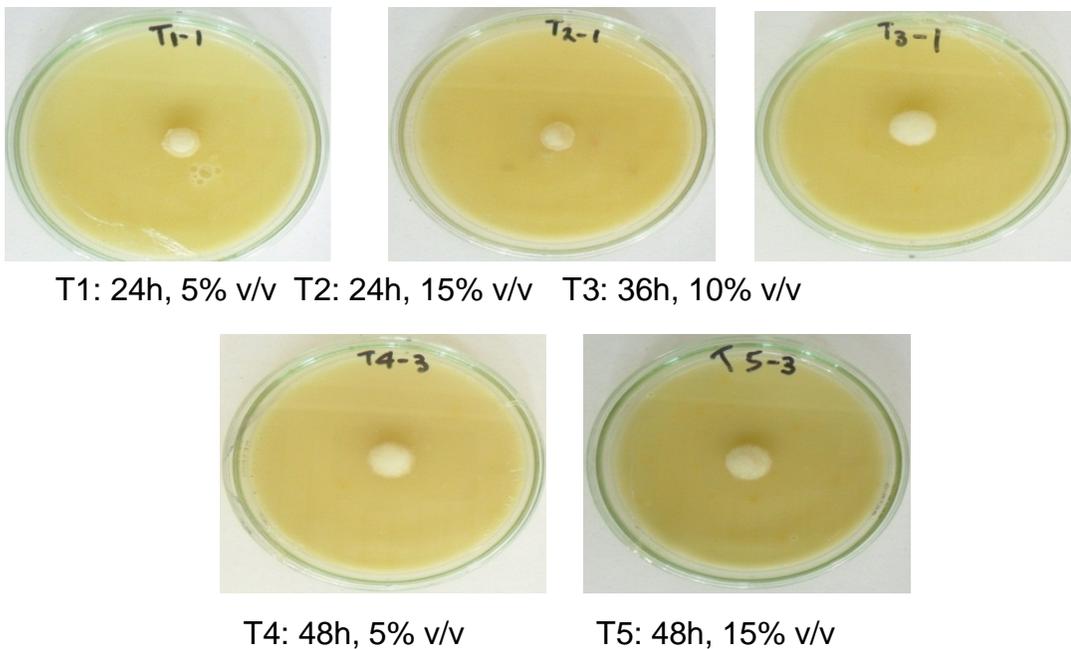
Como se observa en la Figura 4, se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*, cuando el medio 2 se fermentó con un inóculo de *C.guilliermondii* M2L de 24 horas de edad, en comparación con los inóculos de 36 y 48 horas de edad. Este comportamiento probablemente depende de la cantidad de sustancias tóxicas acumulables en los inóculos con tiempo de incubación de 36

horas o más; en este sentido se ha establecido que concentraciones de metabolitos tóxicos provenientes de fermentaciones previas inhiben el crecimiento celular en el nuevo medio de cultivo y por tanto la producción de metabolitos (Scragg, 1997).

Por otra parte, el volumen de inóculo puede variar ligeramente de acuerdo con la composición del medio de cultivo (Crueger&Crueger, 1993), con los datos obtenidos en el presente trabajo, el inóculo de 15% v/v presentó un efecto superior en comparación con los nódulos de 5 % y 10%. Este aspecto se puede explicar porque en el inóculo de 15% hubo mayor cantidad de células viables en comparación con los otros inóculos, en concurrencia bajo esta condición se presume que existe una mayor población de microorganismos y un aumento significativo en la producción de metabolitos con actividad antagónica.

En la Figura 5 se muestran los registros fotográficos del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*, dependiendo de cada tratamiento.

Figura 5. Sensibilidad del fitopatógeno *P. infestans* al bioinsumoM2 según la edad y cantidad de inóculo



Fuente: esta investigación.

6.3.2 Evaluación del efecto antagónico para temperatura y agitación. Una vez establecidas las condiciones edad (24 horas) y cantidad (10% v/v) de inóculo con las que se obtiene mayor porcentaje de inhibición; se evaluó el efecto de las variables de fermentación temperatura y agitación en el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*. Los resultados obtenidos después de realizar las pruebas *in vitro* se muestran en la Cuadro 13.

Cuadro 13. Medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. Infestans* según temperatura y agitación.

Experimento	Media del PI (%)	Desviación Estándar
T 1	96,58	0,73
T 2	99,72	0,11
T 3	96,21	1,01
T 4	91,33	1,15
T 5	93,04	0,70

T1: 30°C y 90rpm; T2: 30°C y 110rpm; T3: 35°C y 100rpm; T4: 40°C y 90rpm; T5: 40°C y 110rpm.
Fuente: esta investigación.

El análisis de varianza de la Cuadro 14 muestra que el efecto de temperatura y agitación sobre el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* son significativos cuando se evalúan de forma independiente con un p-valor inferior a 0,05, pero la interacción de los dos no es significativa al tener un p-valor superior a 0,05.

Cuadro 14. ANOVA para las medias del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans* según temperatura y agitación.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A: Temperatura	106,774	1	106,774	112,69	0,0000
B: Agitación	17,6249	1	17,6249	18,60	0,0020
AB	1,52867	1	1,52867	1,61	0,2359
Bloques	0,842378	2	0,421189	0,44	0,6545
Error Total	8,52781	9	0,947534		
Total (corr.)	135,297	14			

Fuente: esta investigación.

El modelo cuenta con una correlación ajustada $R^2 = 93,697$, lo que significa que el diseño cuenta con un buen ajuste, permitiendo hacer un análisis confiable sobre las variables implicadas.

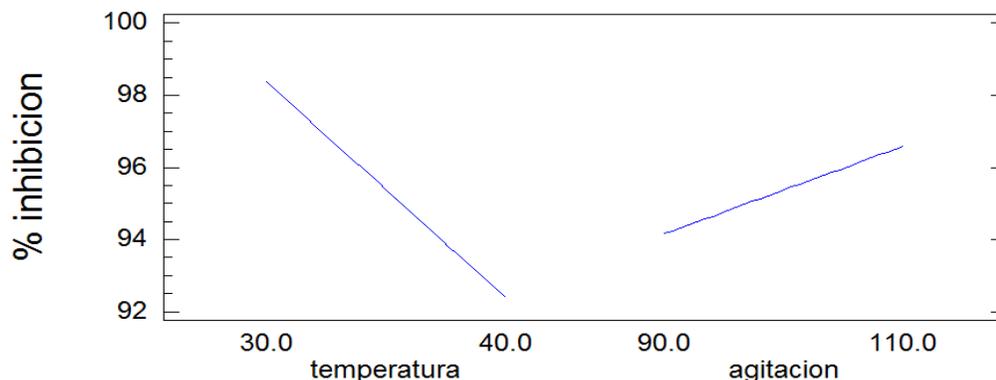
El modelo matemático que describe el porcentaje de inhibición fue simplificado al remover la interacción AB ya que esta interacción no presentó diferencias significativas. El modelo se muestra en la ecuación 4.

$$\% \text{ inhibición} = 79,1528 + 0,11725 * \text{temperatura} + 0,371033 * \text{agitación} \quad (\text{Ecuación 4})$$

La ecuación 4, es la que modela de forma adecuada el porcentaje de inhibición según los resultados obtenidos tras cada experimento, permitiendo predecir los resultados del porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* sin experimentación adicional.

En la Figura 6 se observa que el efecto de la temperatura es negativo en el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. Infestans* cuando es mayor a 30°C y la agitación afecta positivamente al porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. Infestans* cuando es superior a 90 rpm.

Figura 6. Efecto de las variables temperatura y agitación sobre el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*.



Fuente: esta investigación.

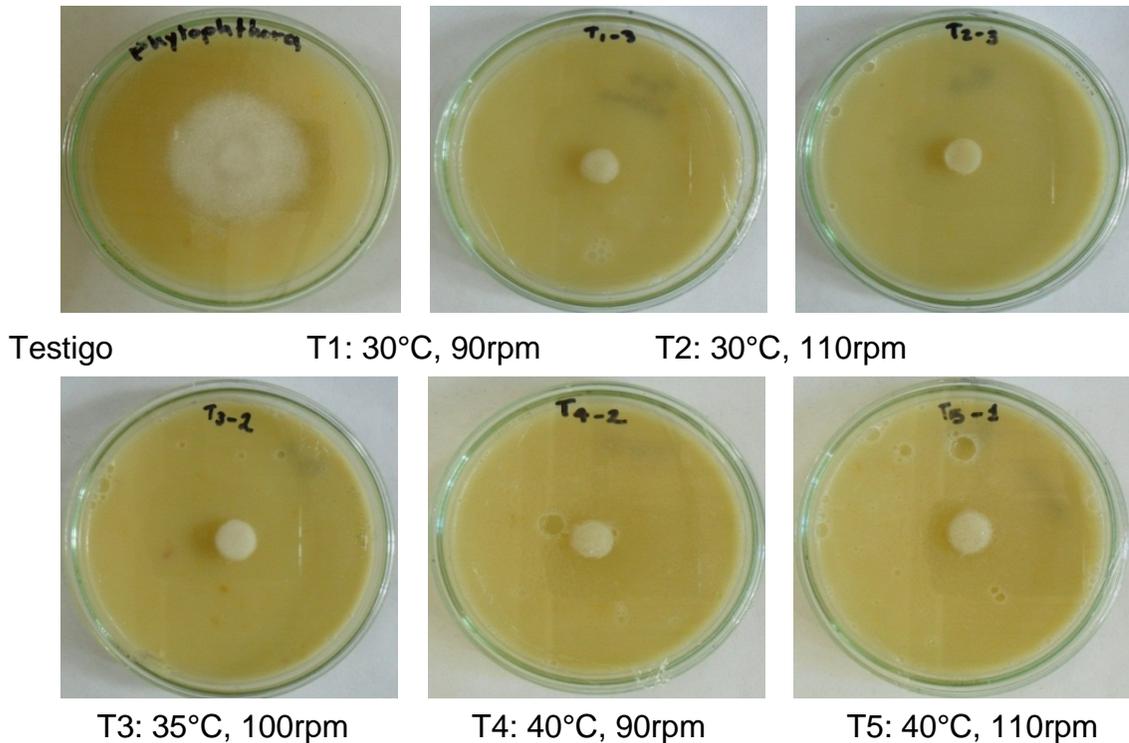
Con los resultados obtenidos se determinó que al evaluar el bioinsumo M2, con unas condiciones de edad de inóculo de 24 horas y cantidad de inóculo de 15% v/v, la mejor combinación de las variables de fermentación temperatura y agitación están dadas a 30°C y 110rpm, obteniendo el más alto porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* con un valor de 99,72%.

Una temperatura de 30°C es similar a la reportada por Oviedo *et al.* (2009), quienes evaluaron la producción de etanol resultado de la fermentación de cascaras de plátano con *C. guilliermondii* (cepa 101), encontrando que la temperatura óptima para la mayor producción de etanol se encontró dentro del rango de 28 a 30°C; igualmente coincide con los resultados obtenidos por Buitrago y Escobar (2009), quienes hicieron fermentaciones con *C. guilliermondii* U32 para obtener mayor cantidad de biomasa, encontrando que la temperatura óptima de fermentación fue de 30°C. Estos resultados se atribuyen a que la temperatura trabajada está dentro del rango en el cual la levadura *C. guilliermondii* se desarrolla (Carrillo, 2003).

Por otra parte durante la fermentación el medio de cultivo se debe mantener en continua agitación para permitir el intercambio de gases entre el medio y la atmósfera interior, esto con el fin de incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno y nutrientes desde el medio a las células, ya que debido al continuo movimiento se evita que las células creen áreas estancadas con bajos niveles de oxígeno y nutrientes, además se impide la formación de agrupaciones de células o agregados de micelios y se aumenta la velocidad de transferencia de productos metabólicos de las células al medio, facilitando el crecimiento de los microorganismos (Brown *et al.*, 1989). Razones por las que se podría explicar que a mayor agitación (110 rpm) *C. guilliermondii* M2L genera metabolitos que presentan actividad antifúngica, dado que según Carrillo (2003), ésta levadura se desarrolla mejor en condiciones aerobias. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Herazo *et al.* (2008), en el cual hubo mayor crecimiento de *C. guilliermondii* (cepa 101) y mayor producción de xitol cuando la agitación fue superior a 100 rpm.

En la Figura 7 se muestran los registros fotográficos del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*, dependiendo de cada tratamiento.

Figura 7. Sensibilidad del fitopatógeno *P. infestans* al bioinsumo M2 según temperatura y agitación.



Fuente: esta investigación.

Evaluadas las condiciones de fermentación para optimizar el bioinsumo M2, se determinó que la mejor combinación de las variables de fermentación con las que se alcanza un porcentaje de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* superior al 99% en condiciones *in vitro* son: edad de inóculo 24 horas, cantidad de inóculo 15% v/v, temperatura 30°C y agitación 110 rpm. Este porcentaje de inhibición del fitopatógeno se determinó por medio del crecimiento micelial de las colonias de *P. infestans* sembradas en cajas de petri con medio agar tomate enmendado con 10.000 ppm del bioinsumo M2 optimizado.

6.4 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA CANTIDAD MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE JUGO DE FIQUE FERMENTADO CON *Candida guilliermondii* M2L CONTRA *P. infestans*.

La CMI fue determinada en el bioinsumo M2 optimizado (15% v/v de inóculo de 24 horas de edad de *C. guilliermondii* M2L; fermentado a 30°C y 110 rpm). En la Cuadro 15 se muestran los resultados de la media del porcentaje de inhibición del

fitopatógeno *P. infestans* en medio agar tomate enmendado con diferentes concentraciones del bioinsumo M2 optimizado (45.000, 35.000, 25.000, 15.000 y 10.000ppm).

Cuadro 15. Media del porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans*, presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango de 10.000 a 45.000 ppm.

Nº Concentración	Concentración (ppm)	Media del PI (%)
1	45.000	100
2	35.000	100
3	25.000	100
4	15.000	99,98
5	10.000	99,72

Fuente: esta investigación.

En la Cuadro 16 se observa que existen diferencias significativas entre los grupos sobre el porcentaje de inhibición, ya que tienen un p-valor inferior a 0,05 con un nivel de confianza del 95%.

Cuadro 16. ANOVA para porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno *P. infestans*, presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango de 10.000 a 45.000 ppm.

Fuente	Sumas de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente - F	P-Valor
Entre grupos	0,18067	4	0,04517	211,72	0,0000
Intra grupos	0,002133	10	0,0002133		
Total (Corr.)	0,1828	14			

Fuente: esta investigación.

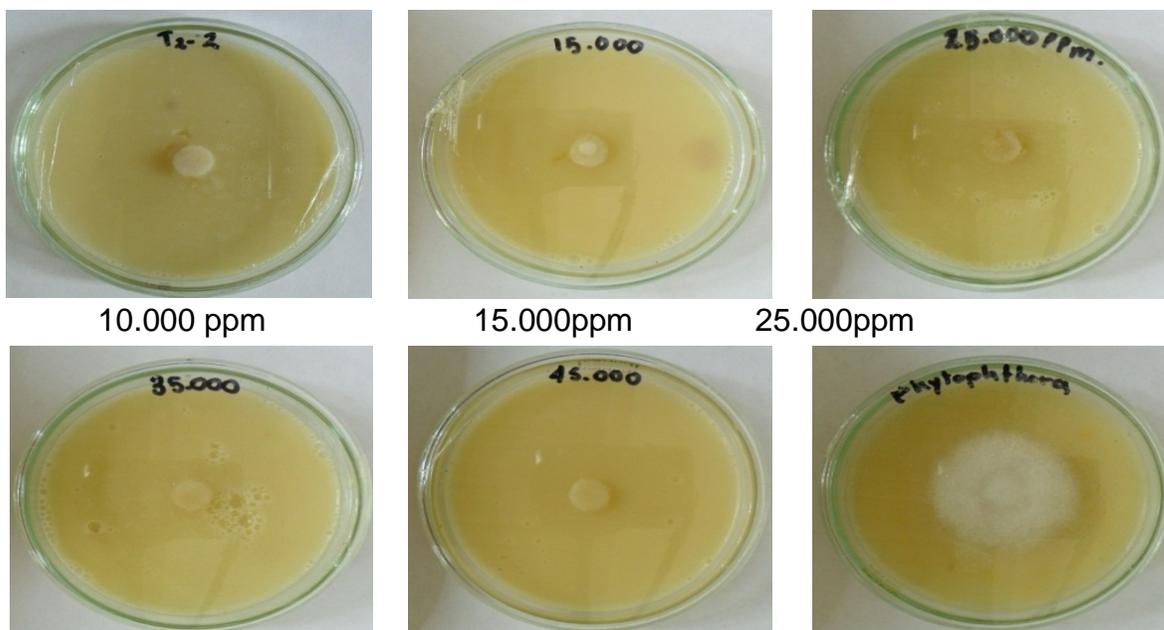
En la Cuadro 17 se muestran la prueba de múltiples rangos en la que se observa que hay diferencias significativas entre la concentración de 10.000 y 15.000 ppm, ya que no hay solapamiento entre las medias de los tres grupos; para las concentraciones de 25.000 en adelante existe un solapamiento entre los grupos ya que se alcanza un porcentaje de inhibición del patógeno *P. infestans* del 100%.

Cuadro 17. Prueba de múltiples rangos para el porcentaje de inhibición (PI) del patógeno *P. infestans*, presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango de 10.000 a 45.000 ppm.

Concentración	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5 (10.000 ppm)	3	99,72	X
4 (15.000 ppm)	3	99,98	X
3 (25.000 ppm)	3	100,0	X
2 (35.000 ppm)	3	100,0	X
1 (45.000 ppm)	3	100,0	X

De la Cuadro 17, se aprecia que el primer rango en donde se alcanzó el máximo porcentaje de inhibición de *P. infestans*, estuvo entre 15.000 y 25.000 ppm, encontrándose dentro de este rango la CMI. En la figura 8 se muestra el registro fotográfico del crecimiento micelial de *P. infestans*, dependiendo de cada tratamiento.

Figura 8. Evaluación de la sensibilidad del patógeno *P. infestans* presentado por el bioinsumo M2 optimizado para las concentraciones dentro del rango inicial de de 15.000 a 45.000 ppm.



Fuente: esta investigación.

Se determinó la CMI explorando el rango entre 15.000 a 25.000 ppm que fueron las dos concentraciones más bajas donde se produjo la máxima inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*. Este ensayo se realizó utilizando concentraciones que incrementaron de 1.000 en 1.000 ppm. Los resultados de las medias del porcentaje de inhibición se muestran en la Cuadro 18.

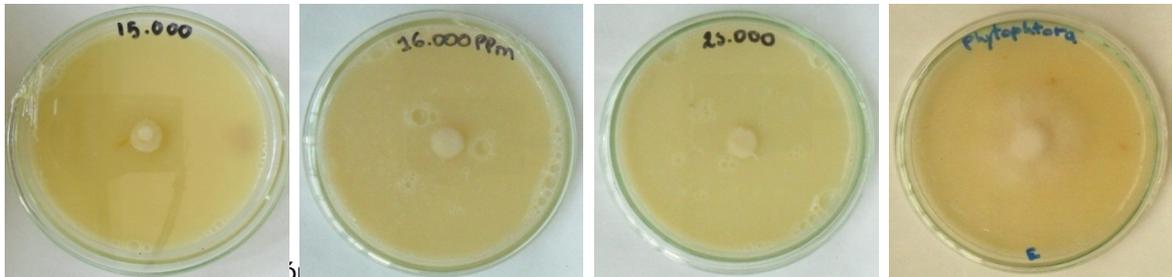
Cuadro 18. Medias de los porcentajes de inhibición del fitopatógeno *P. infestans* presentados por el bioinsumo M2 optimizado para las distintas concentraciones dentro del rango de 15.000 a 25.000ppm.

Nº Concentración	Concentración (ppm)	Media del PI (%)
1	15.000	99,98
2	16.000	100
3	17.000	100
4	18.000	100
5	19.000	100
6	20.000	100
7	21.000	100
8	22.000	100
9	23.000	100
10	24.000	100
11	25.000	100

Fuente: esta investigación.

Los resultados anteriores muestran que a partir de una concentración de 16.000 ppm (No. 2) las medias de los porcentajes de inhibición del fitopatógeno *P. infestans*, son iguales hasta la concentración de 25.000 ppm (No. 11). Por tanto se hizo necesario hacer un análisis cualitativo mediante la metodología propuesta por Jerez *et al.* (2011), analizando el disco de *P. infestans* visualmente; como criterio de determinación de la CMI, se observó la ausencia de crecimiento micelial sobre el disco sembrado en la caja de Petri y se determinó que al enmendar el medio agar tomate con 16.000 ppm del bioinsumo M2 optimizado, se inhibe totalmente el crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*. En la Figura 9 se muestra los registros fotográficos del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*, de cuatro tratamientos.

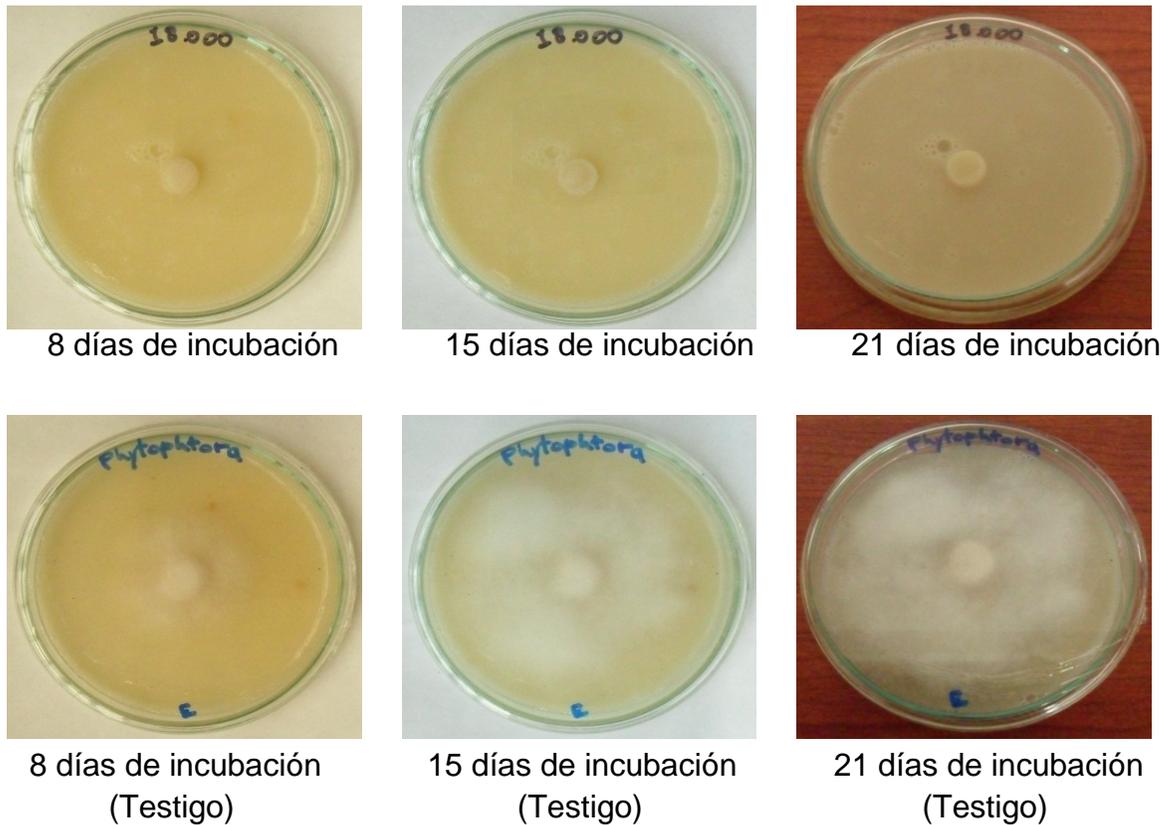
Figura 9. Sensibilidad del patógeno *P. infestans* al bioinsumo M2 optimizado dentro del rango de 15.000 a 25.000 ppm.



La concentración en la cual el bioinsumo M2 optimizado tiene efecto letal frente al fitopatógeno *P. infestans* estuvo en el rango de 15.000 a 25.000 ppm, para establecer esta concentración, se hizo un análisis cualitativo mediante la metodología propuesta por Jerez *et al.* (2011), analizando el disco de *P. infestans* visualmente; como criterio de determinación de la concentración letal se observó que el disco sembrado en la caja de Petri estuviera completamente seco, por lo tanto se determinó que al enmendar el medio agar tomate con 18.000 ppm del bioinsumo M2 optimizado causó efecto letal del fitopatógeno *P. infestans*.

Con el fin de confirmar que la concentración letal del bioinsumo M2 optimizado fuera de 18.000 ppm se dejó 14 días adicionales de incubación del fitopatógeno *P. infestans*, transcurrido este tiempo se observó que el disco se mantuvo completamente seco, confirmando ésta como la concentración letal del bioinsumo frente al fitopatógeno *P. infestans*, tal como se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Comparativo de la sensibilidad del patógeno *P. infestans* en medio agar tomate enmendado con 18.000 ppm del bioinsumo M2 optimizado frente al testigo después de 8, 15 y 21 días de incubación.



Fuente: esta investigación.

El jugo de fique es una sustancia que se caracteriza por tener propiedades fungicidas, insecticidas y herbicidas, al poseer gran cantidad de metabolitos secundarios a los que se les atribuye efecto antagónico contra *P. infestans* (Preciado & Rangel, 2006) y que al ser enriquecido con 10% de sacarosa y fermentado con *C. guilliermondii* M2L incrementa su potencial antagónico frente al fitopatógeno *P. infestans*. Este hecho puede sustentarse en base en que *C. guilliermondii* ha presentado potencial bioicida frente a diferentes patógenos como lo demuestran varios estudios, entre los que se encuentra el realizado por Rodríguez *et al.* (2010), quien demostró que la levadura *C. guilliermondii* M2L produce metabolitos con actividad antagónica frente al fitopatógeno *P. infestans*. Otro estudio que demuestra el potencial bioicida de la levadura *C. guilliermondii* es el realizado por Jimenez (2010), quien investigó que algunos metabolitos

producidos por la levadura *C. guilliermondii* poseen actividad antagónica frente a diferentes patógenos.

El estudio desarrollado en la presente investigación permite contribuir al desarrollo de nuevas alternativas que ayuden a mejorar los insumos de origen biológico para el control del fitopatógeno *P. infestans*, siendo una buena opción para la producción agrícola de la papa, al sustituir fungicidas químicos por bioinsumos.

Estos resultados podrían contribuir en la generación de productos de control biológico de enfermedades como *P. infestans*, a partir de jugo de fique suplementado con sacarosa y fermentado con *C. guilliermondii* M2L, disminuyendo los impactos negativos en el medio ambiente generados en el proceso de obtención de fibra de fique y dando valor agregado a los subproductos derivados del mismo.

Las concentraciones encontradas de la inhibición causada por el bioinsumo al fitopatógeno *P. infestans* en condiciones *in vitro*, son una aproximación para el cálculo de la dosis de aplicación del bioinsumo en campo para el control de la enfermedad tizón tardío de la papa.

7. CONCLUSIONES

Existe mayor efecto de inhibición del crecimiento del fitopatógeno *PhytophthoraInfestans* cuando el jugo de fique se fermenta con *Candidaguilliermondii* M2L.

Bajo condiciones *in vitro* se determinó que el bioinsumo M2 obtenido de la fermentación del jugo de fique suplementado con 10% p/v de sacarosa (medio 2) con *C guilliermondii* M2L presentó un efecto de inhibición frente al fitopatógeno *P.infestans* del 92.63% a una concentración de 10.000ppm.

El porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial del fitopatógeno *P. infestans*, fue superior al 99% cuando el bioinsumo M2 se optimizó con una combinación entre edad y cantidad de inóculo de 24horas y 15% v/v respectivamente y una combinación de temperatura y agitación de 30°C y110rpm respectivamente.

La concentración mínima de inhibición del bioinsumo frente al fitopatógeno *P. infestans* fue de 16.000ppm y la concentración letal de 18.000ppm.

8. RECOMENDACIONES

Los estudios realizados se deben complementar con otras variables de control como pH y aireación en la fermentación y la interacción entre las mismas, además de la evaluación de los parámetros tratados en diferentes rangos para evidenciar cambios sustanciales. Se deben contemplar el análisis de costos y su perspectiva a una futura escala industrial.

Complementar la investigación con la identificación de los metabolitos secundarios producidos por la levadura *Candidaguilliermondii* M2L en un medio diferente al jugo de fique, que tengan efecto contra *Phytophthora infestans*.

Probar el efecto inhibitorio del jugo de fique fermentado con *C. guilliermondii* M2L en otro tipo de patógenos.

Confirmar la identificación de la levadura *Candidaguilliermondii* M2L empleando otros métodos fenotípicos y genotípicos.

Evaluar en campo el bioinsumo y su efecto frente al tizón tardío de la papa.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, J. & Serna, E. (2004). Optimización del proceso de extracción de material orgánico procedente de fique (*Furcraea* sp.) y observación del efecto biofungicida. *Revista Desarrollo de una Herramienta Informática para el Análisis del Ciclo de Vida y la Evaluación de Desempeño Ambiental*, 1,

Álvarez, D., Delgado, D., Salazar, C., & Hurtado, A. (2010). Sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary al extracto de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) y fungicidas sistémicos. Memorias para optar al título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Arnason, J., Philogene B. & Morand P. (1989). *Insecticides of Plant Origin*. Washington: American Chemical Society.

Arroyave, P. & Velásquez, D. (2001). *Aprovechamiento integral de Furcraea macrophylla* Backer. Memoria para optar al título de Ingeniero de Procesos. Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad de EAFIT, Medellín, Colombia.

Benavides, C., Bacca, E., & Ortiz, B. (2009). Estudio fitoquímico cualitativo del jugo de dos variedades de fique del departamento de Nariño. Informe de investigación. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto.

Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*.

Brown, C., Campbell, I. & Priest, F. (1989). *Introducción a la Biotecnología* (pp 120-131). Zaragoza: Ed ACRIBIA, S.A.

Buck, J. (2003). Combinations of fungicides with phylloplane yeast for improved control of *Botrytis cinerea* on Geranium seedlings. *Journal Pathology*.

Buitrago, J., y Escobar, A. (2009). Aplicación de levadura *Candida* spp. Como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Memorias para optar al título de Microbiólogo Industrial, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Carrillo, L. (2003). Levaduras. *Microbiología Agrícola*. Buenos Aires, Argentina.

Colombia; Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA (2000). *Manual Técnico: Manejo Integrado del Cultivo de la Papa*. Bogotá: Autores.

Colombia; Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM & Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente -DAMA (2002). *VI Fase de Seguimiento de Efluentes Industriales y Corrientes Superficiales de Bogotá*. Bogotá: Autores.

Colombia; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Territorial – MADR (2004). *Agenda Prospectiva de Investigación en la Cadena Productiva Agroindustrial de Fique a Partir de Sistemas de Inteligencia Tecnológica*. Bogotá: Autores.

Colombia; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Territorial – MADR (2009). *Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Productiva de Fique en Colombia*. Bogotá: Autores.

Colombia; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – MAVDT, Ministerio de Agricultura & Desarrollo Territorial – MADR, Departamento Nacional de Planeación (2006). *Guía Ambiental del Subsector Fiquero (2ª Ed.)*. Bogotá: Autores.

Colombia; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – MAVDT, Federación Colombiana de Productores de Papa – FEDEPAPA (2004). *Guía Ambiental Para el Cultivo de la Papa*. Bogotá: Autores.

Cooper, T. (1982). *Nitrogen metabolism in S. cerevisiae*. En *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*. 1ª ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratories, New York.

Crueger, W., & Crueger, A. (1993). *Manual de Microbiología Industrial (1ª Ed.)*. Zaragoza: Acribia S.A.

Custodio, J. (2009). *Microbiología y Parasitología: Aislamientos, observación e identificación de hongos – Aislamiento de Hongos Patógenos, Observación e identificación de sus estructuras*. Lima: Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo.

Díaz, A., Flórez, J. & Cotes, A. (2005). Optimización de un Medio de Cultivo para la Producción de la levadura *Pichia Onychis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*,

Errecalde, J. (2004). Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo: Incidencia del Desarrollo de Resistencias en Salud Pública. La Plata, Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata.

Erwin, D. & Ribeiro O. (1996). Phytophthora diseases world wide. *Journal Plant Pathology*,

Fiechter, A., Fuhrmann, G. & Kapelli, O. (1981) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in Microbial Physiology*,

Gómez, H. (2002, noviembre). *Evaluación del extracto de fique en el desarrollo in vitro de Colletotrichum gloeosporoides (Penz) Penz & Sacc. y Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary*. Ponencia presentada en el Cuarto Congreso Nacional de Frutas de Clima Frio Moderado, Medellín, Colombia.

Haettner, H. (1986). *Bioquímica de las levaduras*. Madrid: Ed. Aguilar.

Harrison, J. & Rose, A. (1983). *The yeast* (2^a Ed.). Londres, Inglaterra: Academic Press.

Herazo, I., Ruiz, D., y Arrazola, G. (2008). Bioconversión de xilosa a xilitol por *Candida guilliermondii* empleando cascarilla de arroz (*Oriza sativa*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*.

Jaramillo, S. (2004). Monografía sobre *Phytophthora Infestans* (Mont.) de Bary. Facultad de Ciencias agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Jerez, P., Fernández, A., Illnait M., Perurena, M., Rodríguez, & Martínez, G. (2011) Estudio comparativo de medición entre lecturas visuales espectrofotométricas en pruebas de susceptibilidad *in vitro* de aislamientos de *Candida*. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*.

Jiménez, L. (2010). Análisis sistemático de literatura sobre el efecto bactericida y/o fungicida de los subproductos obtenidos del metabolismo de *Candida guilliermondii*

en cultivos de tomate. Memoria para optar al título de Microbiólogo Industrial, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Jones, R. & Greenfields, P. (1981). *A review of yeast ionic nutrition. Process. Biochem.*

Kirsop, B. (1987). Maintenance of yeast cultures. En: *Yeast Biotechnology* (2ª Ed.) (pp.250). Ed Allen and Uwin, London.

Latorre, L. & Pantoja, A., (2011). *Evaluación de tratamientos térmicos para la inactivación de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa en el jugo de fique en el jugo de fique (Furcraea gigantea Vent.) producido en el departamento de Nariño.* Memoria para optar al título de Ingeniero Agroindustrial, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Leveau J. & Bouix M. (2000). *Microbiología Industrial: los microorganismos de interés industrial* (pp 529-559). Zaragoza: Ed. ACRIBIA, S.A.

López, C. (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*.

McLaughlin, R., Wilson, C., Droby, S., Ben-arie, S. & Chalutz, E. (1992) Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with yeast *Kloeckeraapiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Disease*.

Madigan, M., Martiniko, J., y Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos* (10ª ed). Madrid, España: Pearson.

Maldonado, L., Delgado, M. & García, C. (2004). *Estudio de la Estructura Genética de las poblaciones de Phytophthora infestans en las Regiones Productoras de Papa en Colombia* (Manuscrito no publicado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Martínez, A., & Caicedo, T. (2002). *Bioensayo de toxicidad de los jugos de fique en peces, en el municipio de Tambo* (Nariño). Memoria para optar al título Especialista en salud ambiental, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Odds, F. (1988). *Candida and candidiasis* (2^a Ed.). Londres, Inglaterra: BailliereTindall.

Oviedo, L., Lara C., Mizger, M., (2009) Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano *Musa (AAB simmonds)* en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*.

Prats, G. (2008). Micología. En *Microbiología Clínica* (pp. 90-91). Ed. Medica: Panamericana.

Preciado, D & Rangel, E. (2006). Extracción de un biofungicida a partir de jugo de fique (*Furcraeaspp*). Tesis para optar al título de Ingeniero Químico, Facultad de ingeniería química, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

Restrepo, A., Aristizabal, B., González, A., Jiménez, M., Gómez, B., Mcewen, J. & Cano, L. (2004). *Características de las conidias de Paracoccidioides brasiliensis*. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). *Revista Biomedica Digital*.

Ríos, C., Fajardo, M., Pérez, M., & Juan Carlos. (2005). *Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel Apis mellifera*. Ponencia presentada en el Primer Congreso Cubano y Latinoamericano de Apicultura, La Habana, Cuba.

Riveros, F., Sotomayor, R., Rivera, V., Secor, G., & Espinoza, B. (2003). Resistencia de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary a Metalaxyl en Cultivo de Papas en el norte de Chile. *Agricultura técnica Chile*, 63 (2).

Rodríguez, V., Otero, I., Fernández, P., & Hurtado, A. (2010). Microorganismos del jugo de Fique con Actividad Antagónica frente al Patógeno *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Memorias Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Armenia*. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, Armenia, Colombia.

Rojas, M. (2008). *Caracterización fisicoquímica del jugo de fique (Furcraeaspp.), elaboración y evaluación de un biofungicida útil en el control agroecológico de la gota (Phytophthora infestans) en la papa*. Memoria para optar al título de Ingeniero Agroindustrial, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Saligkarias, I., Gravanis, F. & Epton, H. (2002). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. a study on mode of action. *Biological Control*.

Schurr, A. & Yagil, E. (1981). *Regulation and characterization of acid and alkaline phosphatase in yeast* (pp.65). *J. Gen. Microbiology*.

Scragg, A. (1997). *Biotecnología para ingenieros: Sistemas biológicos en proceso tecnológico*. Balderas, México: Limusa, Noguera Editores.

Stewart, G. & Russel, I. (1991). *Biochemical and genetic control of sugar and carbohydrate metabolism in yeast* (1ª Ed.). Londres, Inglaterra: Allen and Uwin.

Suárez, S. (2003). *Determinación de actividad biocida en inhibidores de corrosión, mediante ensayos biológicos*. Memoria para optar al título de Bióloga Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F, México.

Ticona, V., Nieva, M., Irahola, S. & Gimenez, T. (1998). Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotóxicos como indicadores de potenciales antitumorales. *Biofarbo*.

Uribe, L. (2007). *Caracterización Fisiológica de levaduras aisladas de la filosfera de mora*. Memoria para optar al título de Microbióloga Industrial, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Vargas, I., Rosas, E., Cortez, O., Burgos, A. & Sánchez, R. (2010). *Capacidad Antifúngica de los Extractos Hidroalcoólicos de Cuatro Plantas Silvestres sobre Hongos Fitopatógenos y Micotoxigénicos del Maíz*. Ponencia presentada en el Séptimo Congreso del Noroeste y Tercer Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología, Hermosillo, México.

Villalba, M., Vélez, T., Arias, M. & Arrázola G. (2009). Producción de xilitol a partir de cascarilla de arroz utilizando *Candida guilliermondii*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 62, 4897-4905.

Wilson, C. & Wisniewski, M. (1994). Preface. En: *Biological of postharvest disease theory and practice. Annual Review of Phytopathology* (pp 323). USA: CRC Press.

Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkhi, T., Benarie, R. & Droby, S. (2000). Biological Control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* Rots on Table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*.