

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Antagonismo de aislados bacterianos procedentes de la Cueva de los Tayos  
frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum***

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**JOSSELYN VIVIANA SUÁREZ LOZADA**

**Quito, 2020**



Certifico que la disertación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Josselyn Viviana Suárez Lozada ha sido concluida con conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Directora de la disertación

Quito, 2 de marzo de 2020

A mis padres, mi hermano y amigos que siempre supieron apoyarme.

## **AGRADECIMIENTOS**

El mayor agradecimiento a la Dra. Iliana Alcocer por el tiempo, la paciencia, apoyo y todo su esfuerzo invertido para la realización de este trabajo.

Gracias a la Mtr. Jeniffer Yáñez, a la Dra. María Eugenia Ordóñez y al Mtr. Bolívar Salas por facilitar los equipos e instalaciones para llevar a cabo este estudio.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que supieron ayudar con las inquietudes planteadas a lo largo de este trabajo.

A mi amigos y compañeros por su ayuda y apoyo.

A mi familia por el constante apoyo, el esfuerzo y los consejos que me permitieron seguir adelante.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a través de Proyectos PUCE con el proyecto "Resistencia a colistina en aislados clínicos y muestra de origen avícola y porcino (Q5NV0017-11NV 529010100), por el financiamiento del estudio.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1 CUEVA DE LOS TAYOS.....	3
3.2 BACTERIAS CON POTENCIAL ANTIFÚNGICO .....	4
3.2.1 <i>Bacillus pumilus</i> .....	4
3.2.2 <i>Bacillus licheniformis</i> .....	4
3.2.3 <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....	4
3.2.4 <i>Brevibacillus parabrevis</i> .....	4
3.3 BIOCONTROL .....	5
3.4 <i>Botrytis cinerea</i> .....	5
3.4.1 CONTROL DE <i>Botrytis cinerea</i> .....	6
3.5 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	6
3.5.1 CONTROL DE <i>Fusarium oxysporum</i> .....	7
3.6 OBJETIVOS .....	8
3.6.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 MUESTREO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN LA CUEVA DE LOS TAYOS.....	9
4.2 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS .....	9
4.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	10
4.4 VARIABLES DE ESTUDIO .....	10
4.5 PRUEBA DE ANTAGONISMO.....	10
4.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1 PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN VITRO</i> FRENTE A <i>Botrytis cinerea</i> .....	14
5.1.1 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus pumilus</i> .....	14
5.1.2 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus licheniformis</i> .....	15
5.1.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....	15
5.1.4 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Brevibacillus parabrevis</i> .....	21
5.1.5 Análisis estadístico de la prueba de antagonismo frente a <i>Botrytis cinerea</i> .....	21

5.2	PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN VITRO</i> FRENTE A <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
5.2.1	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus pumilus</i> .....	24
5.2.2	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus licheniformis</i> .....	26
5.2.3	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....	26
5.2.4	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Brevibacillus parabrevis</i> .....	26
5.2.5	Análisis estadístico de la prueba de antagonismo frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	31
6.	DISCUSIÓN .....	33
6.1	INTERACCIÓN ANTAGÓNICA DE LAS BACTERIAS FRENTE A HONGOS.....	33
6.2	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN ENSAYOS DE ANTAGONISMO .....	34
6.3	PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN VITRO</i> FRENTE A <i>Botrytis cinerea</i> .....	34
6.3.1	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus pumilus</i> .....	34
6.3.2	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus licheniformis</i> .....	35
6.3.3	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....	36
6.3.4	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Brevibacillus parabrevis</i> .....	37
6.4	PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN VITRO</i> FRENTE A <i>Fusarium oxysporum</i> .....	38
6.4.1	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus pumilus</i> .....	38
6.4.2	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus licheniformis</i> .....	38
6.4.3	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....	39
6.4.4	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE <i>Brevibacillus parabrevis</i> .....	39
7.	CONCLUSIONES .....	41
8.	REFERENCIAS.....	42
9.	ANEXOS .....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de inoculación de cada aislamiento bacteriano en Agar Papa Dextrosa (PDA) .....	11
Figura 2. Traspaso del hongo patógeno a la placa de Agar Papa Dextrosa (PDA) .	12
Figura 3. Porcentaje de inhibición de los cuatro aislados expuestos a 21 °C, 25 °C y 28 °C frente a <i>Botrytis cinerea</i> .....	14
Figura 4. Observación de antagonismo de <i>Bacillus pumilus</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C).....	17
Figura 5. Observación de antagonismo de <i>Bacillus licheniformis</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C).....	18
Figura 6. Observación de antagonismo de <i>Lysinibacillus fusiformis</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C).....	19
Figura 7. Observación de antagonismo de <i>Brevibacillus parabrevis</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C).....	22
Figura 8. Porcentaje de inhibición de los cuatro aislados bacterianos expuestos a 21 °C, 25 °C y 28 °C frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
Figura 9. Observación de antagonismo de <i>Bacillus pumilus</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C) .....	25
Figura 10. Observación de antagonismo de <i>Bacillus licheniformis</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C). .....	27
Figura 11. Observación de antagonismo de <i>Lysinibacillus fusiformis</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C). .	28
Figura 12. Observación de antagonismo de <i>Brevibacillus parabrevis</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C). .	30

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Porcentaje promedio de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> .....	20
Tabla 2.	Análisis de varianza del efecto antagónico de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> con <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
Tabla 3.	Prueba post hoc Tukey con respecto al factor bacteria en relación a <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
Tabla 4.	Prueba post hoc Tukey con respecto al factor temperatura en relación a <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
Tabla 5.	Porcentaje promedio de inhibición micelial de los cuatro aislados bacterianos frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	29
Tabla 6.	Análisis de varianza del efecto antagónico de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> con <i>Fusarium oxysporum</i> .....	31
Tabla 7.	Prueba post hoc Tukey con respecto al factor bacteria en relación a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	32
Tabla 8.	Prueba post hoc Tukey con respecto al factor temperatura en relación a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	32

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis microbiológico de ambientes por sedimentación y análisis de superficies por hisopado en DISerLAB.....	45
Anexo 2. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , primera réplica .....	46
Anexo 3. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , segunda réplica .....	47
Anexo 4. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , tercera réplica.....	48
Anexo 5. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , cuarta réplica.....	49
Anexo 6. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> , quinta réplica.....	50
Anexo 7. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> , primera réplica .....	51
Anexo 8. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> , segunda réplica.....	52
Anexo 9. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> , tercera réplica .....	53
Anexo 10. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> , cuarta réplica .....	54

Anexo 11. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> , quinta réplica .....	55
--	----

## 1. RESUMEN

La Cueva de los Tayos se encuentra ubicada al sureste del Ecuador, en la provincia de Morona Santiago. Su acceso es limitado por diversos factores que se establecen en la zona, de manera que se dificulta la investigación científica. En noviembre de 2018, el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE, formó parte de una expedición exploratoria a esta cueva, liderada por el M. Sc. Santiago Burneo, en la que se colectaron muestras de suelo, agua, ambiente y pared con la finalidad de identificar la diversidad microbiana presente en la Cueva y los potenciales usos biológicos de los microorganismos encontrados. Se identificaron 37 aislados bacterianos a través de Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Fueron seleccionadas cuatro bacterias con potencial actividad antifúngica: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis*. Se realizaron ensayos de antagonismo microbiano basados en la capacidad inhibitoria de los aislados bacteriano frente al crecimiento fúngico de dos hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* en tres temperaturas: 21 °C, 25 °C y 28 °C; considerando el rango de temperaturas óptimas de los organismos analizados. Se encontró que *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus parabrevis* presentaron antagonismo medio y antagonismo positivo con *Botrytis cinerea*, a las tres temperaturas a excepción de *Bacillus pumilus*, ya que, solamente presentó antagonismo positivo a 25 °C y a 28 °C. Por otro lado, se obtuvo que *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus parabrevis* presentaron antagonismo medio para *Fusarium oxysporum* a 21 °C y 25 °C, respectivamente. Finalmente, *Lysinibacillus fusiformis* se caracterizó por ser un antagonista negativo con porcentaje de inhibición menor al 10% para *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas, mientras que para *Fusarium oxysporum* fue una antagonista bajo a 21 °C y 25 °C, y un antagonista negativo a 28 °C. Se concluye que *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus parabrevis* son efectivas controlando a *Botrytis cinerea* y con respecto a *Fusarium oxysporum*, se observó que *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus parabrevis* son eficientes para el control de este hongo. Por último, se reportó que *Lysinibacillus fusiformis* no tuvo efecto antagónico eficiente contra los dos hongos.

Palabras clave: antagonismo bacteriano, temperatura, hongos patógenos, Cueva de los Tayos, bacterias antagonistas.

## 2. ABSTRACT

The Tayos Cave is located in southeastern Ecuador, in Morona Santiago province. Its access is limited due to several factors of the area, making it difficult to conduct scientific research. In November 2018, Santiago Burneo M. Sc. led an exploratory expedition with the Laboratory of Microbiology from the School of Biological Sciences of PUCE to this cave. There, samples of soil, water, and environment were collected with the main purpose of identifying microbial diversity in the cave, and their possible biological uses. There were 37 bacteria identified through matrix-assisted desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Four bacteria with possible antifungal activity were selected: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Brevibacillus parabrevis*. Microbial antagonism assays for inhibitory capacity of bacterial isolates were tested against fungal growth for two phytopathogenic fungi: *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*; at three optimal temperatures: 21 °C, 25 °C and 28 °C. *Bacillus pumilus* showed antagonism towards *Botrytis cinerea* at 25 °C and 28 °C; the remaining species (*Bacillus licheniformis* and *Brevibacillus parabrevis*), however, showed an effective antagonism at the three temperatures tested. Meanwhile, *Bacillus licheniformis* and *Brevibacillus parabrevis* presented medium antagonism towards *Fusarium oxysporum* at 21 °C and 25 °C, respectively. Finally, *Lysinibacillus fusiformis* was characterized as a negative antagonist with an inhibition percentage less than 10% for *Botrytis cinerea* at the three optimal temperatures tested. As opposed to its biological activity towards *Fusarium oxysporum*, categorizing it as a low antagonist at 21 °C and 25 °C and a negative antagonist at 28 °C. In conclusion, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Brevibacillus parabrevis* are effective antagonists against *Botrytis cinerea*. As to *Fusarium oxysporum*, *Bacillus licheniformis* and *Brevibacillus parabrevis* were the ones who better controlled its growth. Finally, it was found that *Lysinibacillus fusiformis* had no antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*.

Keywords: bacterial antagonism, temperature, pathogenic fungi, Tayos cave, antagonistic bacteria.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 CUEVA DE LOS TAYOS

La Cueva de los Tayos se encuentra ubicada en la selva tropical al sureste de Ecuador, en la provincia de Morona Santiago. Esta cueva se caracteriza por ser de formación kárstica; es decir, se constituye principalmente de piedra caliza. Esta piedra se forma por el contacto de agua y piedras carbonatadas y sulfatadas, dando lugar a rocas estalactitas y estalagmitas. La Cueva de los Tayos tiene una profundidad de 201 m y 4800 m de largo. Su nombre se debe a un ave nocturna, *Steatornis caripensis*, que habita en esta cueva, conocida comúnmente como tayo o pájaro aceitoso (Constantin, Toulkeridis, Moldovan, Villacís y Addison, 2018).

Los organismos que habitan en cuevas han desarrollado adaptaciones especiales para poder vivir en condiciones de oscuridad, alta humedad, variaciones de temperatura, entre otras. Estas condiciones no se observan en otros hábitats, haciendo de las cuevas lugares excepcionales para la investigación biológica.

Son pocos los reportes con un análisis biológico completo de su diversidad y mucho menos un análisis microbiológico; principalmente, porque la cueva tiene un acceso limitado tanto por su ubicación, entorno y por el control gubernamental que se establece en la zona, lo que limita también la investigación geológica, arqueológica, biológica, entre otras (Constantin et al., 2018).

En noviembre de 2018, el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE, formó parte de una expedición multidisciplinaria a la Cueva de los Tayos, organizada por el M. Sc. Santiago Burneo; con la finalidad de identificar la diversidad microbiana presente en la cueva. Se identificaron 37 cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron cuatro bacterias Gram positivas, con potencial antifúngico: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis*.

## 3.2 BACTERIAS CON POTENCIAL ANTIFÚNGICO

### 3.2.1 *Bacillus pumilus*

Bacilo Gram positivo aerobio, comúnmente aislado de suelo y otros ambientes como alimentos y muestras clínicas. La morfología colonial es variable, ya que, puede ser rugosa e irregular con márgenes ondulados pero la mayoría son lisas y opacas. El tamaño de las colonias es de 0,6- 0,7 por 2,0- 3,0  $\mu\text{m}$ . Esta bacteria puede crecer a una temperatura mínima entre 5 °C y 15 °C hasta una temperatura máxima entre 40 °C a 50 °C. Con respecto a su actividad antifúngica se ha reportado que esta especie puede degradar la quitina (Logan y Vos, 2015a).

### 3.2.2 *Bacillus licheniformis*

Bacilo Gram positivo anaerobio facultativo, comúnmente aislado de suelo. Las colonias son de forma redonda a irregular, con un diámetro entre 2 a 4 mm. Estas son de color blanquecino y puede volverse cremoso o marrón. En medios enriquecidos con carbohidratos que contienen hierro, las colonias son mucosas y de color rojizo. Además, presentan un margen ondulado. Esta bacteria puede crecer en un rango de temperatura entre 15 °C a 55 °C. Con respecto a la actividad antifúngica, al igual que *B. pumilus*, también posee la capacidad de degradar la quitina (Logan y Vos, 2015a).

### 3.2.3 *Lysinibacillus fusiformis*

Bacilo Gram positivo aerobio estricto, comúnmente aislado del suelo. Las colonias son opacas y lisas. Esta bacteria crece entre 17 °C a 37 °C (Logan y Vos, 2015a). En relación a la actividad antifúngica, se ha visto que esta bacteria es eficaz controlando a una amplia gama de patógenos fúngicos de plantas, mediante la producción de quitinasas (Singh et al., 2012).

### 3.2.4 *Brevibacillus parabrevis*

Bacilo Gram positivo aerobio estricto, produce colonias planas, lisas y de color gris amarillento. El tamaño de estas es de 0,5- 0,9  $\mu\text{m}$  por 2,0- 4,0  $\mu\text{m}$ . La

temperatura de crecimiento se encuentra entre 15 °C a 50 °C y es aislado mayormente de muestras clínicas (Logan y Vos, 2015b).

Se ha reportado que las especies del género *Brevibacillus* han sido una fuente de péptidos antimicrobianos, siendo así usadas en el ámbito clínico y como agentes del biocontrol (Panda et al., 2014).

### **3.3 BIOCONTROL**

El biocontrol se define como el uso de organismos vivos para suprimir la población de un organismo plaga específica haciéndola menos abundante o menos dañina (Haek y Eilenberg, 2018).

El antagonismo es una técnica derivada del biocontrol que se usa principalmente para describir a microorganismos que atacan a patógenos de plantas y se define como la inhibición, deterioro o muerte de un organismo por acción de otro (Pérez, Gonzales y Muñoz, 2014).

De esta forma, existen diferentes tipos de interacciones entre el antagonista y el patógeno, como por ejemplo la producción de antimicrobianos para matar a los competidores (antibiosis), otra manera es la de parasitar al patógeno (micoparasitismo) y también la competencia por nutrientes o espacio, así suprimiendo a este (Haek y Eilenberg, 2018).

Se ha visto la necesidad de reemplazar a los fungicidas sintéticos con técnicas alternativas como el biocontrol, ya que, los residuos de estos químicos son tóxicos para humanos y para el medio ambiente (Chen, Wang, Gao, Gao y Zhang, 2019).

### **3.4 *Botrytis cinerea***

Las especies del género *Botrytis* son responsables de grandes pérdidas de cultivos económicamente importantes. La mayoría de especies presentan un rango de hospederos limitados, ya que, atacan a pocas plantas ya sean

monocotiledóneas o dicotiledóneas. Por otro lado, *B. cinerea* infecta a monocotiledóneas, dicotiledóneas, también a gimnospermas, pteridofitas, briofitas y macroalgas. Por lo que *B. cinerea* es la especie más importante y común dentro del género *Botrytis* (Fillinger y Elad, 2016).

*Botrytis cinerea* es un hongo patógeno necrotrófico, agente causal del moho gris en más de 1000 especies de plantas que representa pérdidas económicas de más de 1000 millones de euros a nivel mundial. Este hongo ocasiona deterioro posterior a la cosecha de frutas, como las uvas, fresas, tomate, manzana, rosas, entre otras. Las epidemias de este hongo ocurren generalmente en campos abiertos, huertos e invernaderos con alta humedad (Fillinger y Elad, 2016).

Una característica importante de *B. cinerea*, es que no es específico del tipo de hospedero y la virulencia varía en diferentes hospederos de plantas. Debido a que este hongo posee un amplio espectro de hospederos, así causando pérdidas significativas, ha sido considerado como el segundo patógeno fúngico más importante a nivel mundial (Chen et al., 2019).

#### **3.4.1 CONTROL DE *Botrytis cinerea***

El control de *B. cinerea* está vinculado principalmente a pesticidas químicos, además del manejo cultural como limitar la humedad alrededor de la planta, también extractos vegetales y antagonistas (Fillinger y Elad, 2016).

El manejo cultural también incluye la reducción en la densidad de la siembra, el manejo del dosel para permitir mayor ventilación, calentamiento solar de invernaderos, evitar la cosecha en días lluviosos, entre otros. Sin embargo, una combinación de tratamientos puede llegar a ser más efectivo, es decir, el manejo cultural y un uso mínimo de fungicidas (Fillinger y Elad, 2016).

### **3.5 *Fusarium oxysporum***

El género *Fusarium* posee varias especies patógenas de importancia a nivel mundial de plantas, animales y también de humanos. Con respecto a los cultivos

de importancia económica estas especies tienen graves efectos como clorosis, necrosis, caída prematura de las hojas y marchitez de la planta (Khan, Maymon y Hirsch, 2017).

Las especies de *Fusarium* presentan una alta especificidad del hospedero y se han identificado más de 120 *formae speciales*, es decir formas específicas del hospedero. Dentro de este género *F. oxysporum* es una de las especies que registra mayores pérdidas económicas (Michielse y Rep, 2009).

*Fusarium oxysporum* es un hongo saprófito que se encuentra en el suelo y en la rizósfera de las plantas. Este hongo penetra la raíz de la planta y provoca la pudrición y también invade el sistema vascular. Cuando penetra los vasos del xilema, provoca el marchitamiento de la planta, ya que, no permite el movimiento de agua en los haces vasculares (Fravel, Olivain y Alabouvette, 2003).

### **3.5.1 CONTROL DE *Fusarium oxysporum***

El manejo de *F. oxysporum* se lleva a cabo por dos técnicas. La primera y mayormente usada es la fumigación química del suelo antes de sembrar las plantas, en donde se usan químicos con el bromuro de metilo, que es perjudicial y tóxico para el medio ambiente (Fravel et al., 2003).

La segunda es el manejo de este hongo por el cultivo de variedades resistentes de plantas a través del fitomejoramiento; sin embargo, una desventaja de esta técnica es el tiempo que se requiere para el desarrollo de estas variedades, además la resistencia no es permanente, ya que, el patógeno siempre está evolucionando y supera la resistencia de la planta hospedero. De esta forma los fungicidas sintéticos siguen siendo la manera más barata, fácil y efectiva de usar (Khan et al., 2017).

## 3.6 OBJETIVOS

### 3.6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antagonista de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis*, bacterias procedentes de la Cueva de los Tayos, frente a dos hongos fitopatógenos, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* a diferentes temperaturas.

### 3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficiencia de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis*, bacterias procedentes de la Cueva de los Tayos, para el control de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.
- Determinar la mejor temperatura del efecto antagónico de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.
- Realizar el análisis estadístico de datos.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 MUESTREO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN LA CUEVA DE LOS TAYOS**

El muestreo fue realizado por la M. Sc. Camila Cilveti y el Ph.D. Jaime Costales en la Cueva de los Tayos. Durante la expedición realizada del 14 al 16 de noviembre de 2018. Se tomaron muestras de ambiente, suelo, agua e hisopados de las paredes en zonas conocidas como Sumidero, Daylight, Domo y Bosque de estalagmitas y estalactitas.

Las muestras fueron enviadas para análisis microbiológico de ambientes por sedimentación y análisis de superficies por hisopado en DISerLAB donde se usaron técnicas estándares para recuento de mohos y levaduras, recuento de mesófilos aerobios, recuento de bacterias fijadoras de Nitrógeno, número más probable de coliformes totales y *E. coli*. El reporte de este análisis se encuentra adjunto (Anexo 1). Las placas con crecimiento bacteriano fueron nuevamente encaminadas al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas para la identificación de las bacterias. Para esto se procedió a reactivar en Agar Sangre y la incubación se realizó a 37 °C por 24 horas (DIPCO, 1945). Posteriormente, cada colonia bacteriana se reisló en agar nutriente para la identificación de las especies por espectrometría de masas (MALDI- TOF). Esta prueba fue realizada por el Dr. Henry Parra de URANTICORP en Guayaquil, Ecuador.

### **4.2 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS**

Las cepas fueron conservadas en agar nutriente con crecimiento por 24 h a 37 °C en tubos 10x120 mm con tapa de caucho hermética. Estos cultivos son mantenidos en recipientes cerrados a temperatura ambiente. Adicionalmente, las cepas también fueron conservadas por congelamiento. Para esto, las cepas fueron cultivadas en 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 37 °C por 24 h. Se adicionó 30% de glicerol estéril, así se obtuvo alícuotas de 1ml fueron transferidas a microtubos estériles, en seis copias, para ser congeladas, tres copias a -20 °C y

tres copias a -85 °C. De esta manera se estableció una bacterioteca en temperatura ambiente y otra en congelamiento.

#### **4.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

En este estudio se usaron cuatro cepas bacterianas de la Cueva de los Tayos de suelo, identificadas como *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis*. Con números de CBQCA 5588, 5589, 5599 y 5613, respectivamente.

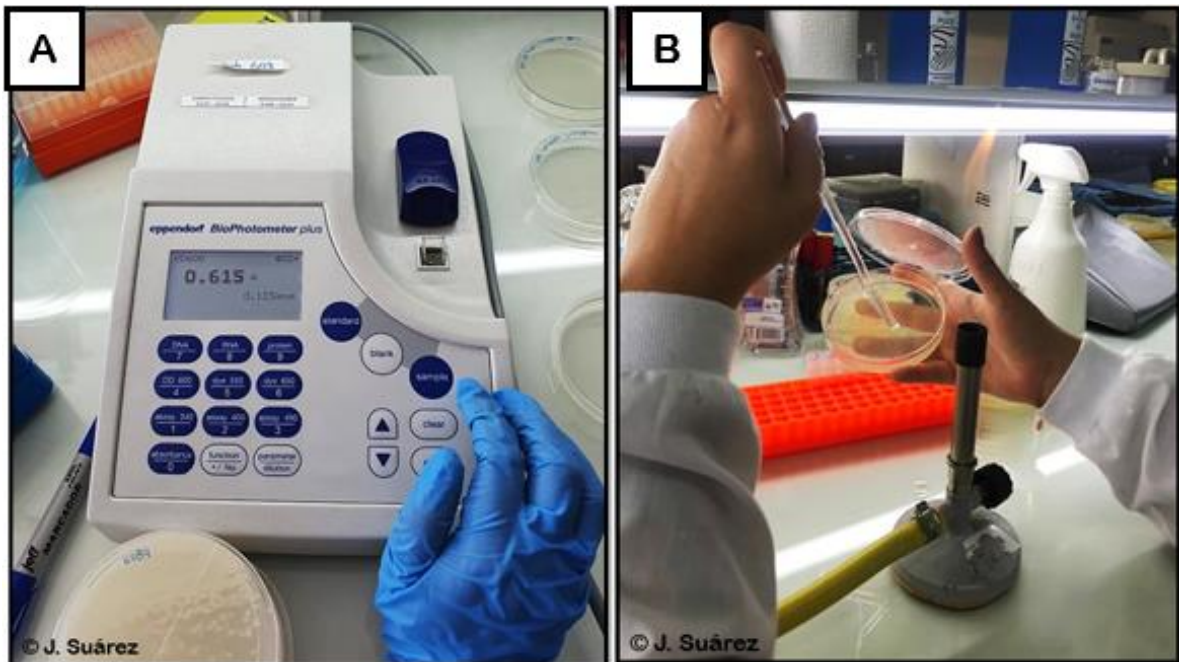
Con respecto a los hongos, *F. oxysporum* fue donado por la Mtr. Jeniffer Yáñez, docente de la PUCE. Mientras que *B. cinerea* aislado de botones de rosa fue proporcionado por la Lcda. Vismeli Santana del DISerLAB.

#### **4.4 VARIABLES DE ESTUDIO**

Para la determinación del efecto de la temperatura en la acción antagonista de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, se probaron a tres diferentes temperaturas: 21 °C, 25 °C y 28 °C, debido a que las bacterias y los hongos usados en este estudio, presentan un óptimo crecimiento dentro de este rango de temperatura (Fillinger y Elad, 2016; Logan y Vos, 2015a). Para lo cual *B. cinerea* y *F. oxysporum* se probaron a 25 °C (temperatura ambiente), 21 °C y 28 °C.

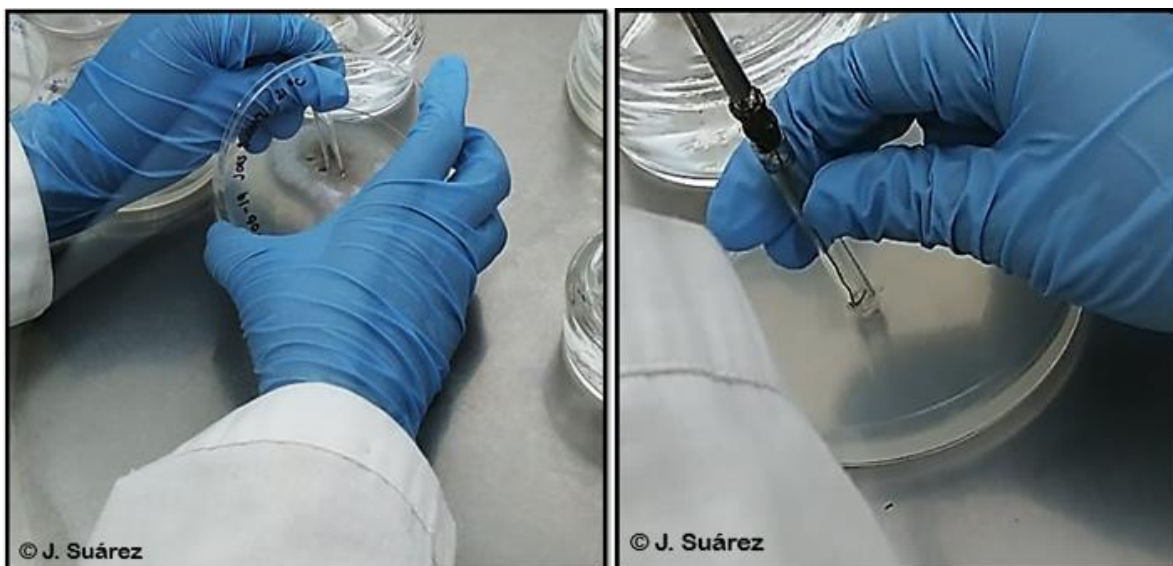
#### **4.5 PRUEBA DE ANTAGONISMO**

Los hongos fitopatógenos, *B. cinerea* y *F. oxysporum*, se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubaron durante siete días a 21 °C, 25 °C y 28 °C. En el caso de las bacterias, estas se cultivaron en Infusión de Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) por 24 horas, sometidas a agitación de 150 rpm en un agitador con baño María a 30 °C. La concentración de bacterias se ajustó a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, tomando de referencia el tubo 0,5 de la escala Mc Farland (Rojas, Sánchez, Rosales y Lugo, 2017), con una absorbancia entre un rango de 0,616 y 0,632 (Figura 1).



**Figura 1. Proceso de inoculación de cada aislamiento bacteriano en Agar Papa Dextrosa (PDA).** A, medida para establecer la concentración bacteriana ajustada a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, tomando como referencia el tubo 0,5 de la escala Mc Farland; B, distribución uniforme de cada aislado bacteriano en la placa de PDA con la ayuda de un asa de Drigalsky.

Posteriormente se sembró por superficie 100  $\mu$ l de cada cultivo bacteriano y con la ayuda de un asa de Drigalsky en la placa de PDA (Figura 1). Se dejó secar durante 10 min. A continuación se colocó un cilindro de 4 mm de cada hongo (Figura 2), que inicialmente fue cultivado en PDA, con la ayuda de un obturador de vidrio (Rojas et al., 2017; Silva, 2018).



**Figura 2. Traspaso del hongo patógeno a la placa de Agar Papa Dextrosa (PDA).** La placa de PDA contenía previamente la cepa bacteriana y el traspaso se realizó con la ayuda de un obturador de vidrio de 4 mm

Las placas se incubaron a las tres temperaturas indicadas anteriormente (21, 25 y 28 °C). Se realizaron 5 repeticiones por cada temperatura. Se determinó la acción antagonista de las bacterias usadas a través de la medición del diámetro del crecimiento del hongo patógeno en presencia del aislado bacteriano. Las lecturas de las pruebas de antagonismo se realizaron diariamente por 11 días. El porcentaje de inhibición se midió con la siguiente fórmula:

*% de inhibición del crecimiento*

$$= \frac{(\text{área micelial de control} - \text{área micelial con tratamiento})}{\text{área micelial de control}} \times 100$$

(Martínez et al., 2014).

De acuerdo al porcentaje de inhibición obtenido en los ensayos, se clasificaron a las bacterias según Constanza et al. (2011), como antagonista:

- **Negativo:** ausencia de inhibición o un porcentaje menor al 10% y un crecimiento fúngico similar al tratamiento control.
- **Bajo:** zona de inhibición con un porcentaje entre el 10-39% y una disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

- **Medio:** zona de inhibición con un porcentaje entre el 40-69% y una disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.
- **Positivo:** zona de inhibición marcada con un porcentaje entre el 70-100%.

En este estudio, se escogieron a los antagonistas medios y positivos como efectivos para el control de estos dos hongos patógenos.

#### 4.6 ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías y una prueba post hoc Tukey mediante el software estadístico R, J. Anzieta (comunicación personal, 6 de septiembre de 2019).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES *IN VITRO* FRENTE A *Botrytis cinerea*

La prueba con *B. cinerea* reportó que *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. parabrevis*, fueron los antagonistas mayormente efectivos a las tres temperaturas a excepción de *B. pumilus* que es eficiente solamente a 25 °C y a 28 °C, mas no a 21 °C (Figura 3).

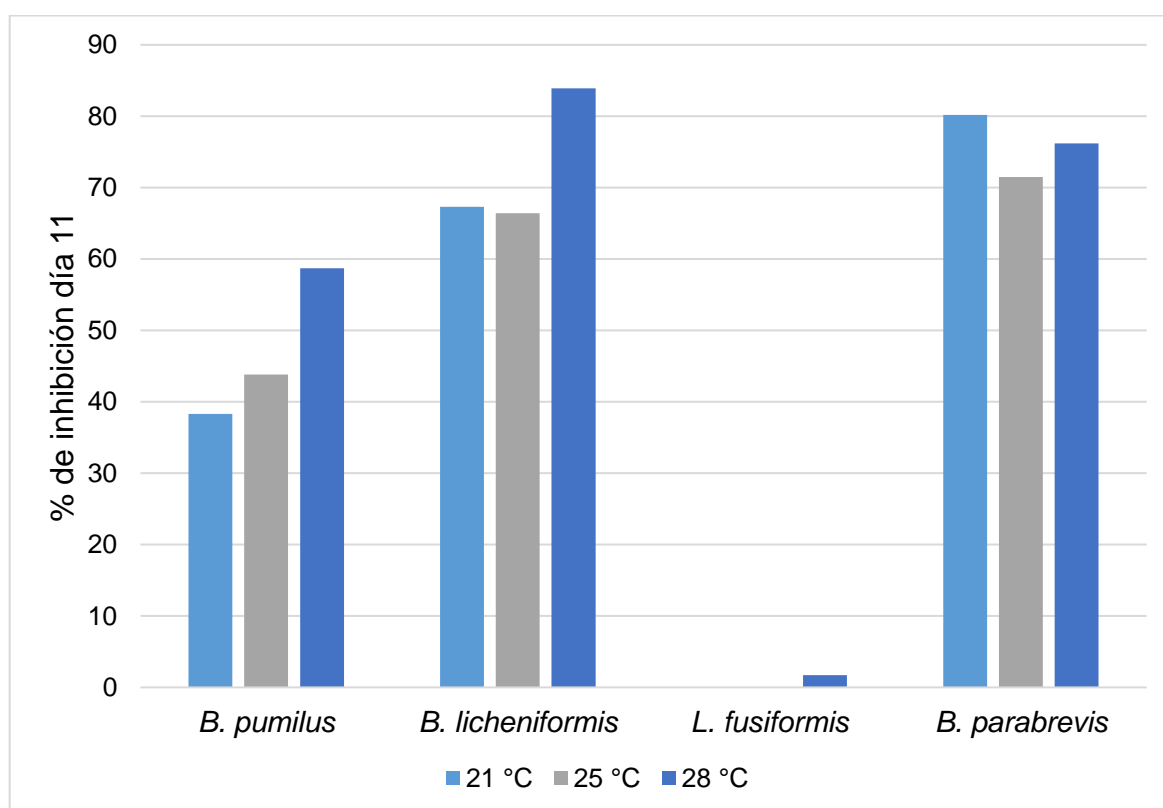


Figura 3. Porcentaje de inhibición de los 4 aislados expuestos a 21 °C, 25 °C y 28 °C frente a *Botrytis cinerea*

#### 5.1.1 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus pumilus*

Como se mencionó anteriormente, *B. pumilus* presentó un porcentaje de inhibición efectivo a dos de las tres temperaturas probadas, siendo antagonista medio a 25 °C y a 28 °C, con porcentajes de 43,8% y 58,7% respectivamente.

Mientras que a 21 °C es un antagonista bajo con un porcentaje de 38,3% (Figura 3).

De esta forma se puede observar que a la mejor temperatura que actúa *B. pumilus* es a 28 °C y en la Figura 4 (C4) se puede notar, como se inhibe el crecimiento de *B. cinerea*, comparando con el control (Figura 4, C5).

### **5.1.2 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus licheniformis***

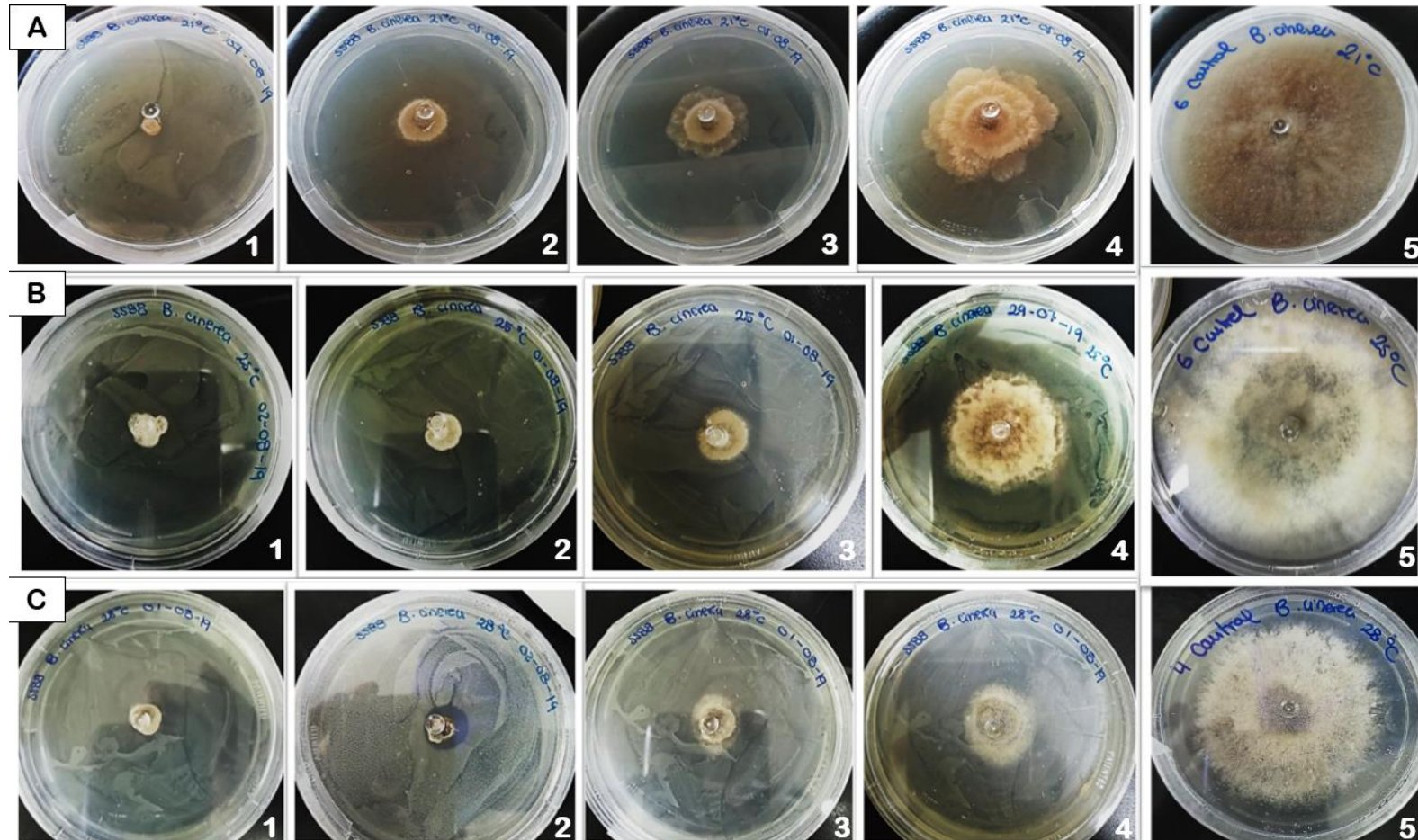
En relación a *B. licheniformis*, se observa que a las tres temperaturas probadas fue un antagonista efectivo, siendo positivo a los 28 °C con un porcentaje del 83,9%, y en relación a las otras bacterias, este fue el porcentaje más alto que se obtuvo para el control del crecimiento de *B. cinerea* en general. Sin embargo, a 21 °C y 25 °C, *B. licheniformis* es un antagonista medio, con un porcentaje de inhibición del 67,3% y 66,4%, respectivamente (Figura 3).

De esta forma se puede observar en la Figura 5 (C4), que *B. licheniformis* a 28 °C, presenta una alta inhibición contra *B. cinerea*, siendo así, una bacteria efectiva.

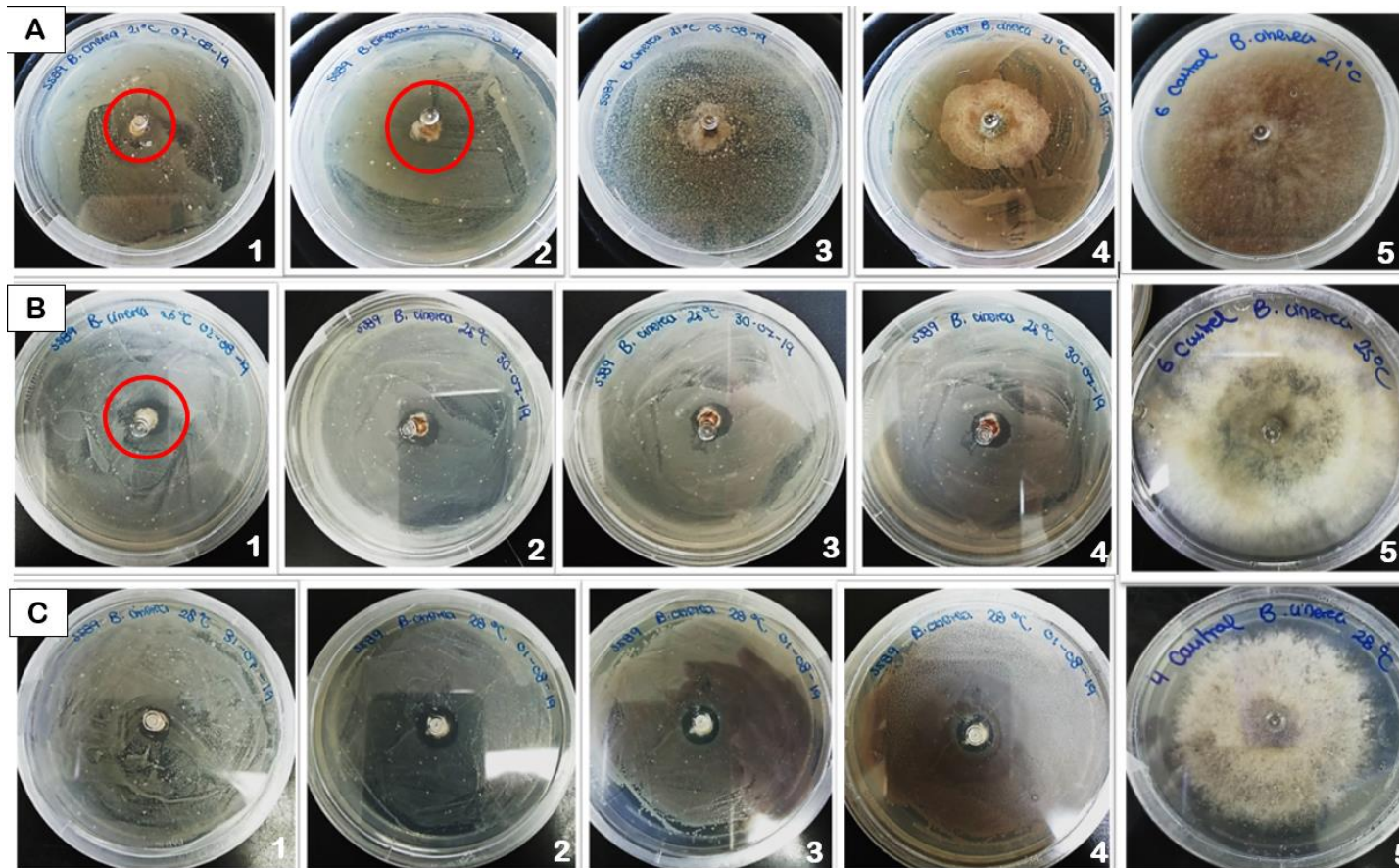
### **5.1.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Lysinibacillus fusiformis***

Por otro lado *Lysinibacillus fusiformis* no fue un antagonista efectivo controlando a *B. cinerea*, ya que, a 21 °C 25 °C y 28 °C es un antagonista negativo con un porcentaje de 0% para 21 °C y 25 °C, mientras que para 28 °C con un 1,7% (Figura 3).

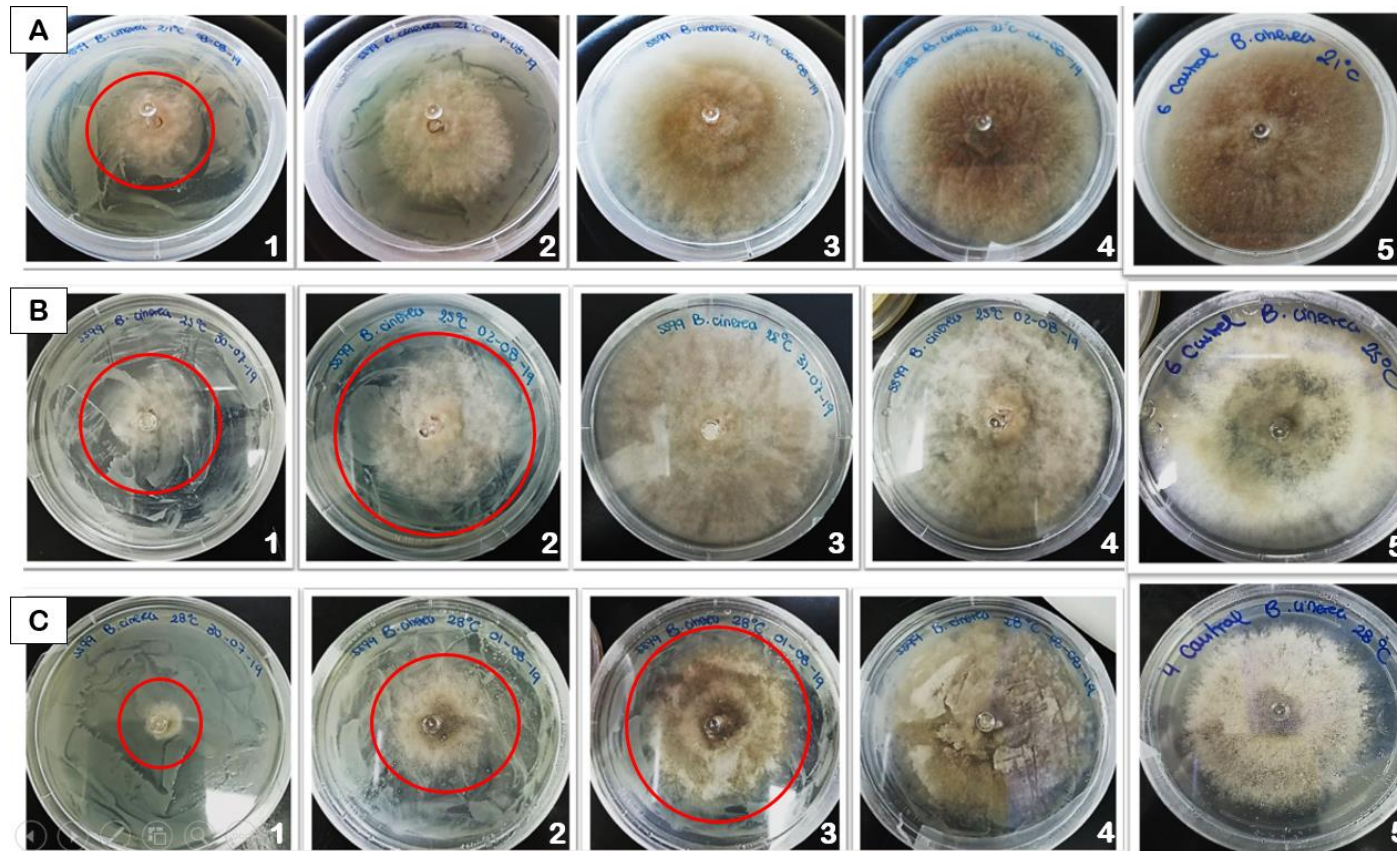
De esta forma se observa una ausencia de inhibición (Figura 6, A4, B4 y C4), debido a que, el crecimiento de la colonia del hongo patógeno fue similar a la del tratamiento control (Figura 6, A5, B5, C5), además esto se evidencia en las medidas del diámetro en la Tabla 1.



**Figura 4. Observación de antagonismo de *Bacillus pumilus* frente a *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas probadas. A, *Bacillus pumilus* expuesto a 21 °C; B, *Bacillus pumilus* expuesto a 25 °C; C, *Bacillus pumilus* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11.**



**Figura 5. Observación de antagonismo de *Bacillus licheniformis* frente a *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas probadas.** A, *Bacillus licheniformis* expuesto a 21 °C; B, *Bacillus licheniformis* expuesto a 25 °C; C, *Bacillus licheniformis* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11. En círculo rojo se señala el crecimiento del hongo donde se dificulta ver por efecto de condensación en la tapa de la placa Petri.



**Figura 6. Observación de antagonismo de *Lysinibacillus fusiformis* frente a *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas probadas.** A, *Lysinibacillus fusiformis* expuesto a 21 °C; B, *Lysinibacillus fusiformis* expuesto a 25 °C; C, *Lysinibacillus fusiformis* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11. En círculo rojo se señala el crecimiento del hongo donde se dificulta ver por efecto de condensación en la tapa de la placa Petri.

**Tabla 1. Porcentaje promedio de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Breviacillus parabrevis* sobre *Botrytis cinérea***

Bacteria	Tempe- ratura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	50,5±17,7	81,1±5,5	82,9±4,4	84,4±5,6	81,9±4,5	75,3±3,7	71,8±2,5	67,3±4,8	52,0±18,7	45,9±18,6	38,3±11,3	Bajo
	25	35,0±20,8	70,3±11,2	77,7±5,1	83,8±4,2	82,6±2,5	80,7±4,0	74,8±6,3	72,3±9,2	65,0±13,2	59,1±18,6	43,8±21,7	Medio
	28	15,3±15,5	63,1±12,5	64,8±15,2	75,3±3,1	76,7±6,5	76,6±12,5	74,8±16,1	75,9±16,2	73,0±16,0	68,7±18,8	58,7±22,1	Medio
<i>B. licheniformis</i>	21	29,5±25,4	73,6±3,3	79,5±2,1	82,3±4,4	80,7±5,3	79,3±5,3	76,0±7,8	73,6±8,8	70,1±10,3	68,7±11,4	67,3±12,9	Medio
	25	12,9±10,8	69,4±6,0	75,4±5,9	81,5±5,1	80,5±8,9	79,1±8,5	73,7±10,9	67,0±8,4	64,0±14,7	63,3±14,1	66,4±18,4	Medio
	28	1,8±4,1	49,9±13,4	61,4±12,9	71,2±8,3	78,1±2,8	81,0±2,1	81,8±1,6	82,7±1,6	84,3±2,3	84,2±2,3	83,9±1,9	Positivo
<i>L. fusiformis</i>	21	54,7±16,4	67,2±9,7	52,0±16,7	40,3±9,3	30,1±6,8	8,5±10,2	1,2±2,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	Negativo
	25	49,1±17,6	72,9±11,3	64,3±15,7	45,9±5,2	19,5±12,6	8,9±10,9	1,2±2,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	Negativo
	28	30,7±25,6	64,0±14,7	42,6±15,7	45,0±26,1	22,3±15,5	9,7±6,0	8,8±6,8	6,8±9,3	8,9±8,6	5,2±7,2	1,7±2,6	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	28,7±17,7	71,3±6,2	80,9±1,9	85,1±1,0	85,4±1,8	83,5±3,2	83,3±3,3	83,3±3,3	83,1±3,0	81,9±4,0	80,2±3,9	Positivo
	25	13,3±18,8	62,0±13,4	77,5±3,5	83,4±2,6	83,3±2,3	82,1±3,4	75,3±10,1	73,6±13,7	73,4±13,6	72,9±13,4	71,5±13,1	Positivo
	28	8,0±17,9	55,7±8,3	63,2±4,6	74,9±3,7	79,9±3,2	81,8±4,3	83,1±4,5	76,3±7,3	74,7±7,8	76,2±11,6	76,2±11,7	Positivo

#### 5.1.4 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Brevibacillus parabrevis*

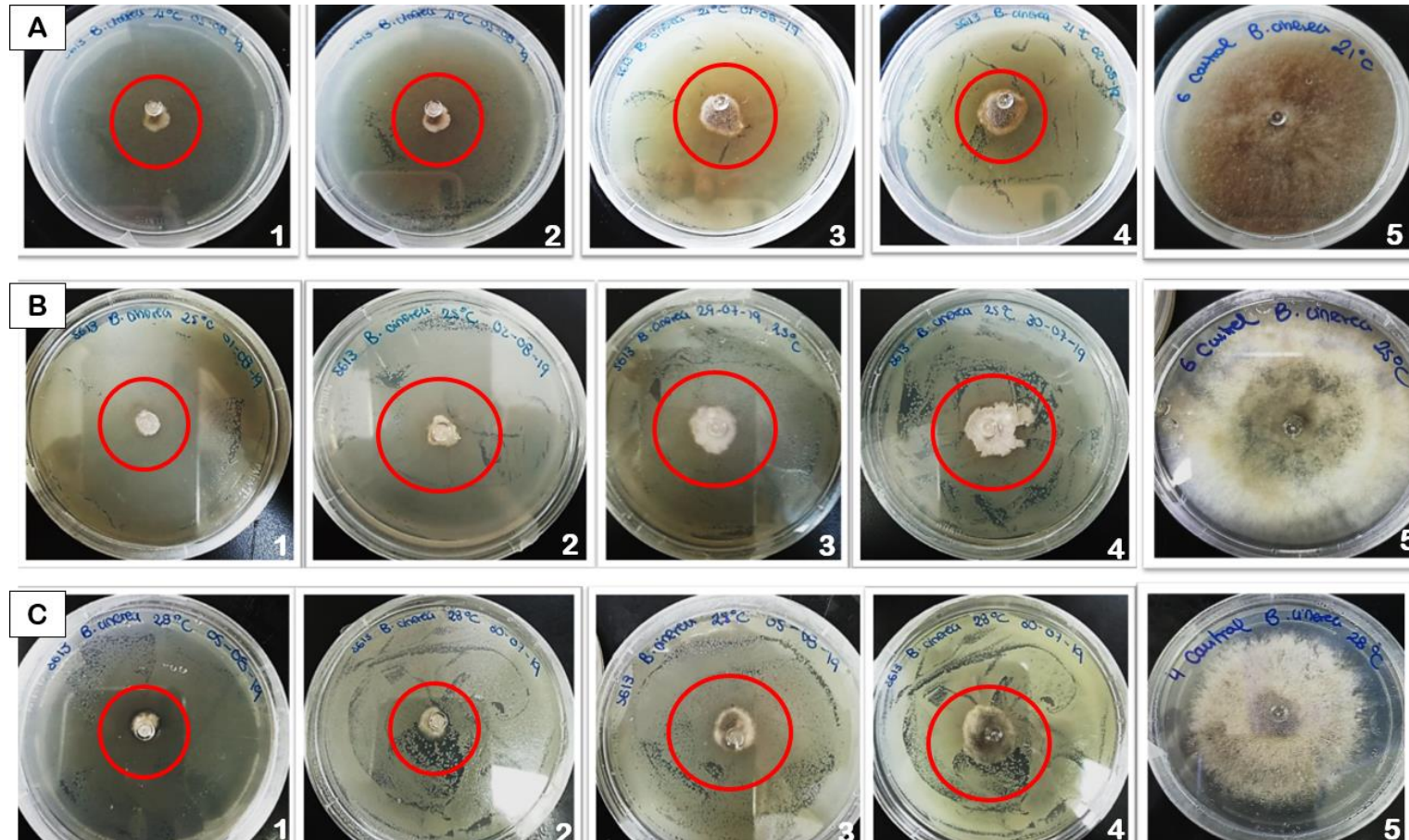
Se obtuvo que *B. parabrevis* fue un antagonista positivo a las tres temperaturas probadas. A 21 °C, la bacteria exhibió un porcentaje de inhibición del 80,2%, mientras que a 25 °C un porcentaje del 71,5% y a 28 °C un porcentaje del 76,2%. Debido a que *B. parabrevis* fue un antagonista positivo, a las tres temperaturas probadas, se considera efectiva, al momento de controlar *B. cinerea*. Además, se puede observar en la Figura 7, A4, B4 y C4 la alta inhibición que produce esta bacteria frente a *B. cinerea*, en comparación del control A5, B5 y C5.

#### 5.1.5 Análisis estadístico de la prueba de antagonismo frente a *Botrytis cinerea*

A partir del análisis de varianza (ANOVA) realizado, se obtuvo que tanto las bacterias como las diferentes temperaturas, usadas en este estudio, son estadísticamente significativas. Las bacterias fueron el factor mayormente significativo con un valor de P de  $<2e-16$ . Estos resultados nos indican que el factor bacteria y el factor temperatura son importantes al momento de controlar a *B. cinerea*. Sin embargo, la interacción entre estos dos factores no muestra diferencias significativas (Tabla 2).

En cuanto a la prueba post hoc Tukey realizada con respecto al factor bacteria (Tabla 3), se observó que *B. licheniformis* y *B. parabrevis* presentaron el mismo efecto mayormente positivo contra *B. cinerea*. Por otro lado, *B. pumilus* mostró un efecto diferente, a pesar de que también se la considera efectiva. No obstante, *L. fusiformis* tuvo un efecto diferente a las otras bacterias, sin embargo fue completamente negativo.

Con respecto a la prueba de Tukey en relación al factor temperatura (Tabla 4), se determinó que 21 °C y 25 °C exhibieron un mismo efecto en el antagonismo efectuado para *B. cinerea*, mientras que 28 °C tuvo un efecto diferente, sin embargo, un poco más efectivo.



**Figura 7. Observación de antagonismo de *Brevibacillus parabrevis* frente a *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas probadas.** A, *Brevibacillus parabrevis* expuesto a 21 °C; B, *Brevibacillus parabrevis* expuesto a 25 °C; C, *Brevibacillus parabrevis* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11. En círculo rojo se señala el crecimiento del hongo donde se dificulta ver por efecto de condensación en la tapa de la placa Petri.

**Tabla 2. Análisis de varianza del efecto antagónico de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* con *Botrytis cinerea***

Origen de las variaciones	Df	Pr(<F)
Bacteria	3	<2e-16 ***
Temperatura	2	0,0126 *
Error	54	
Total	59	

Df, grados de libertad; Pr(<F), valor p

**Tabla 3. Prueba post hoc Tukey con respecto al factor bacteria en relación a *Botrytis cinerea***

BACTERIA	TUKEY
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	a
<i>Bacillus licheniformis</i>	a
<i>Bacillus pumilus</i>	a
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	b

a, b, efectos ordenados de acuerdo a su importancia y efectividad

**Tabla 4. Prueba post hoc Tukey con respecto al factor temperatura en relación a *Botrytis cinerea***

TEMPERATURA	TUKEY
28	a
25	b
21	b

a, b, efectos ordenados de acuerdo a su importancia y efectividad

## 5.2 PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES *IN VITRO* FRENTE A *Fusarium oxysporum*

Con respecto a *F. oxysporum* no se obtuvo ningún antagonista positivo. Sin embargo, se puede observar que *B. licheniformis* y *B. parabrevis* fueron las bacterias efectivas siendo antagonistas medios a 21 °C y 25 °C, respectivamente.

### 5.2.1 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus pumilus*

En relación a *B. pumilus* se puede observar que a las tres temperaturas se comporta como antagonista bajo. A 21 °C se obtuvo un porcentaje del 21,9% y a 28 °C un 21,6% de inhibición, mientras que a 25 °C presentó un 26,4% (Figura 8). De esta forma se considera a *B. pumilus* como un mal controlador de *F. oxysporum*. Además, se puede observar que existe una disminución en el crecimiento de la colonia fúngica (Figura 9).

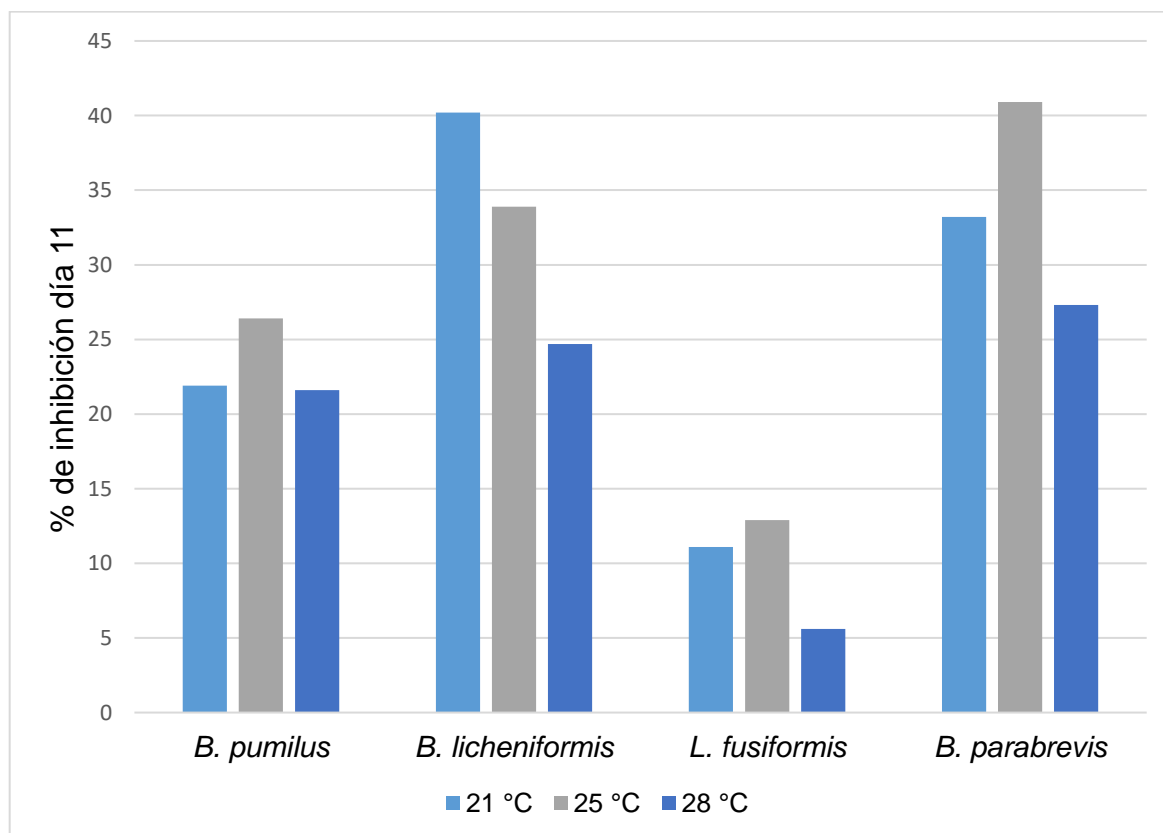
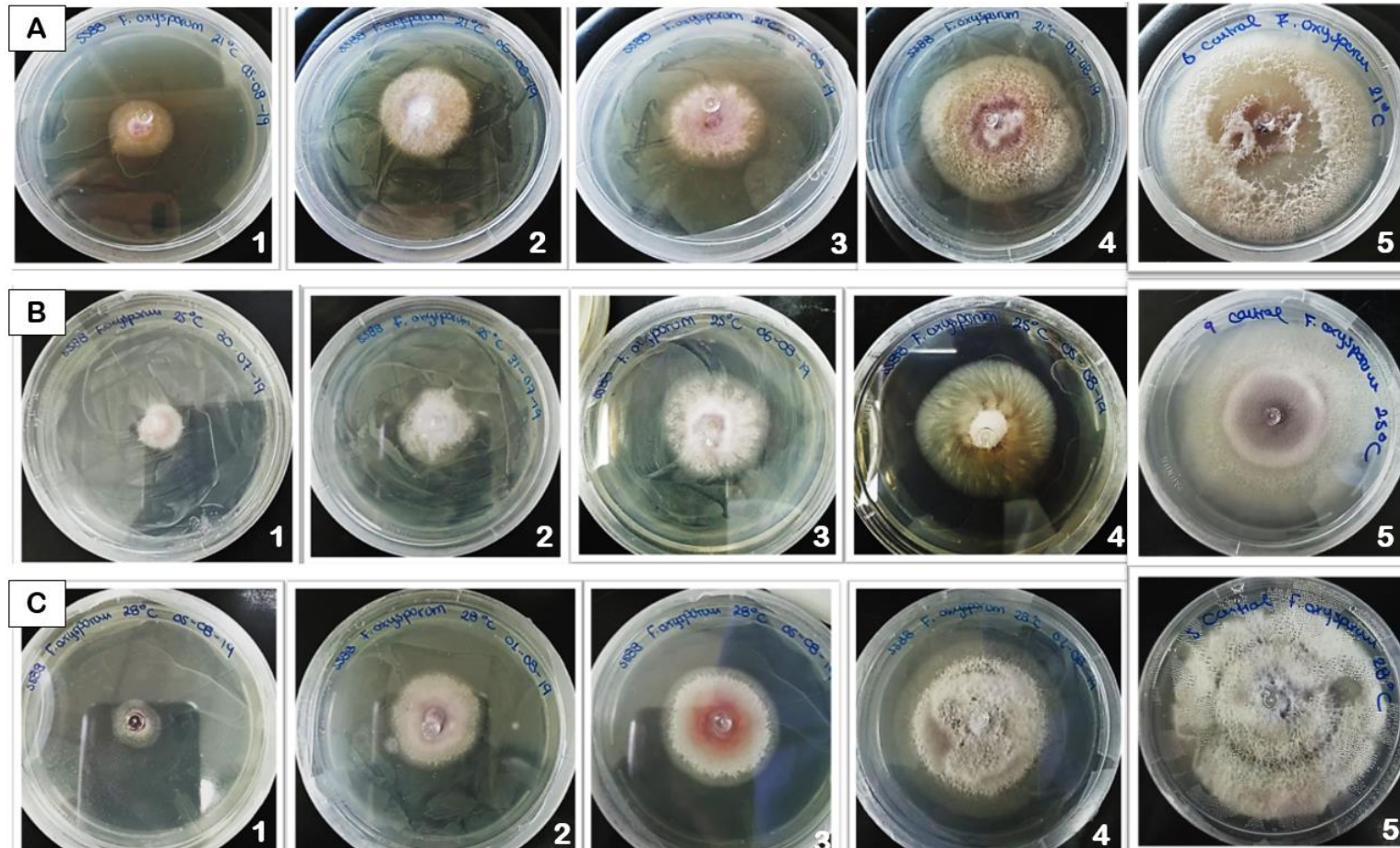


Figura 8. Porcentaje de inhibición de los 4 aislados bacterianos expuestos a 21 °C, 25 °C y 28 °C frente a *Fusarium oxysporum*



**Figura 9. Observación de antagonismo de *Bacillus pumilus* frente a *Fusarium oxysporum* a las tres temperaturas probadas. A, *Bacillus pumilus* expuesto a 21 °C; B, *Bacillus pumilus* expuesto a 25 °C; C, *Bacillus pumilus* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11**

### 5.2.2 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus licheniformis*

*B. licheniformis* se presentó como un antagonista medio a 21 °C con un 40,2% de inhibición. Por otro lado, fue un antagonista bajo a 25 °C y a 28 °C, con un 33,9% y 24,7% de inhibición, respectivamente (Figura 8). Sin embargo, se puede observar que si existe una pequeña inhibición micelial (Figura 10). Asimismo, cabe recalcar que a 21 °C, se obtuvo el porcentaje mínimo para que sea un antagonista medio.

### 5.2.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Lysinibacillus fusiformis*

*L. fusiformis* al igual que *B. cinerea* es la bacteria menos eficiente, en comparación de las otras bacterias, al momento de controlar *F. oxysporum*. Debido a que a 21 °C y a 25 °C se comporta como un antagonista bajo con un porcentaje de 11,1% y 12,9% de inhibición, respectivamente. Mientras que a 28 °C es un antagonista negativo con un porcentaje del 5,6% de inhibición (Figura 8).

Además se puede observar (Figura 11) que, el crecimiento de la colonia fúngica es similar a la del tratamiento control (Tabla 5). De esta forma se deduce que *L. fusiformis* no es óptima para el control de hongos patógenos.

### 5.2.4 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Brevibacillus parabrevis*

Por último, *B. parabrevis* fue una bacteria efectiva solamente a los 25 °C, siendo un antagonista medio con un 40,9% de inhibición. A 21 °C y 28 °C es un antagonista bajo con un 33,2% y 27,3% respectivamente (Figura 8).

A pesar de que en la Figura 12, se observa una zona de inhibición considerable, esto se debe a que todo el micelio no es visible, a consecuencia de que este crecía débilmente.

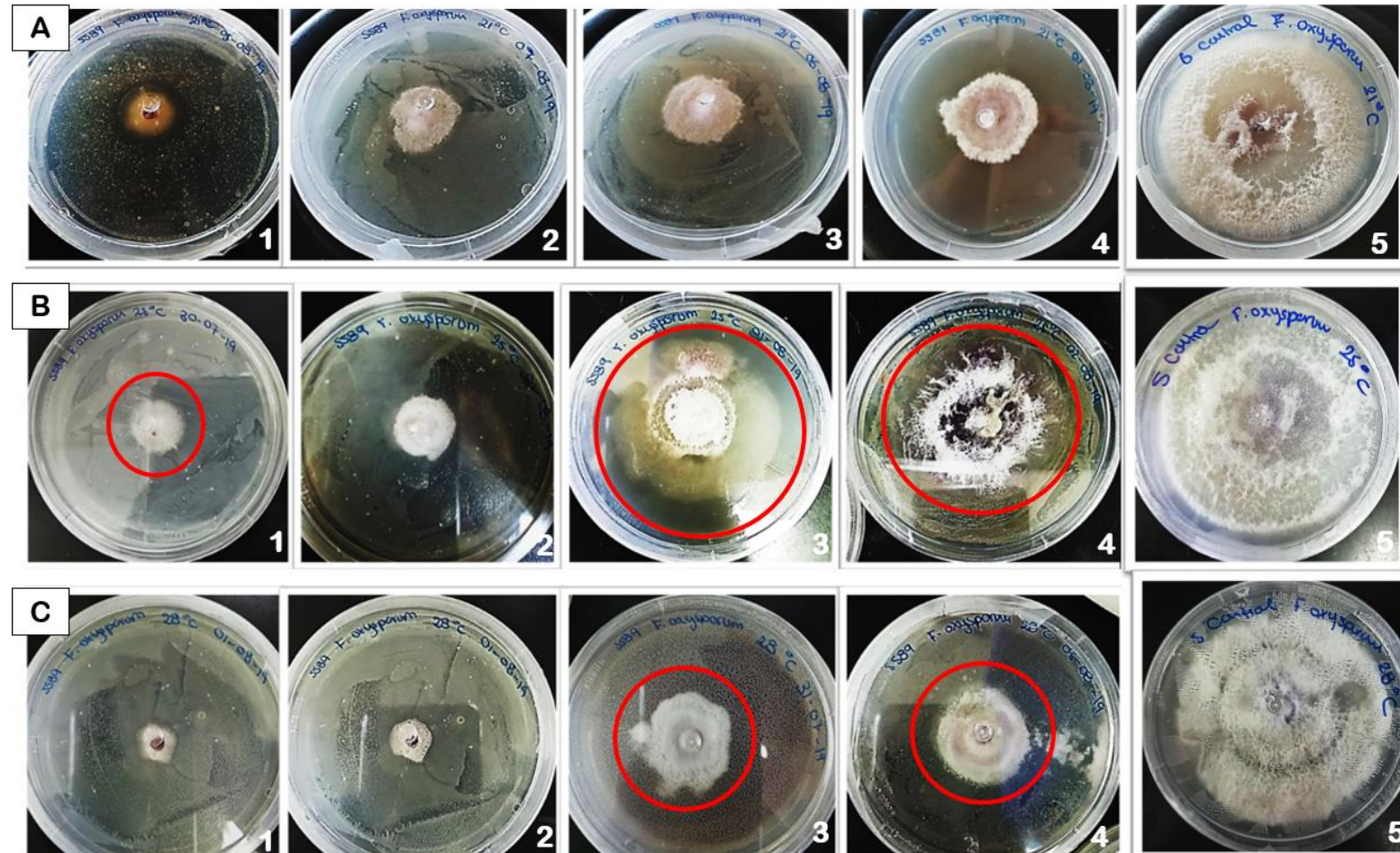
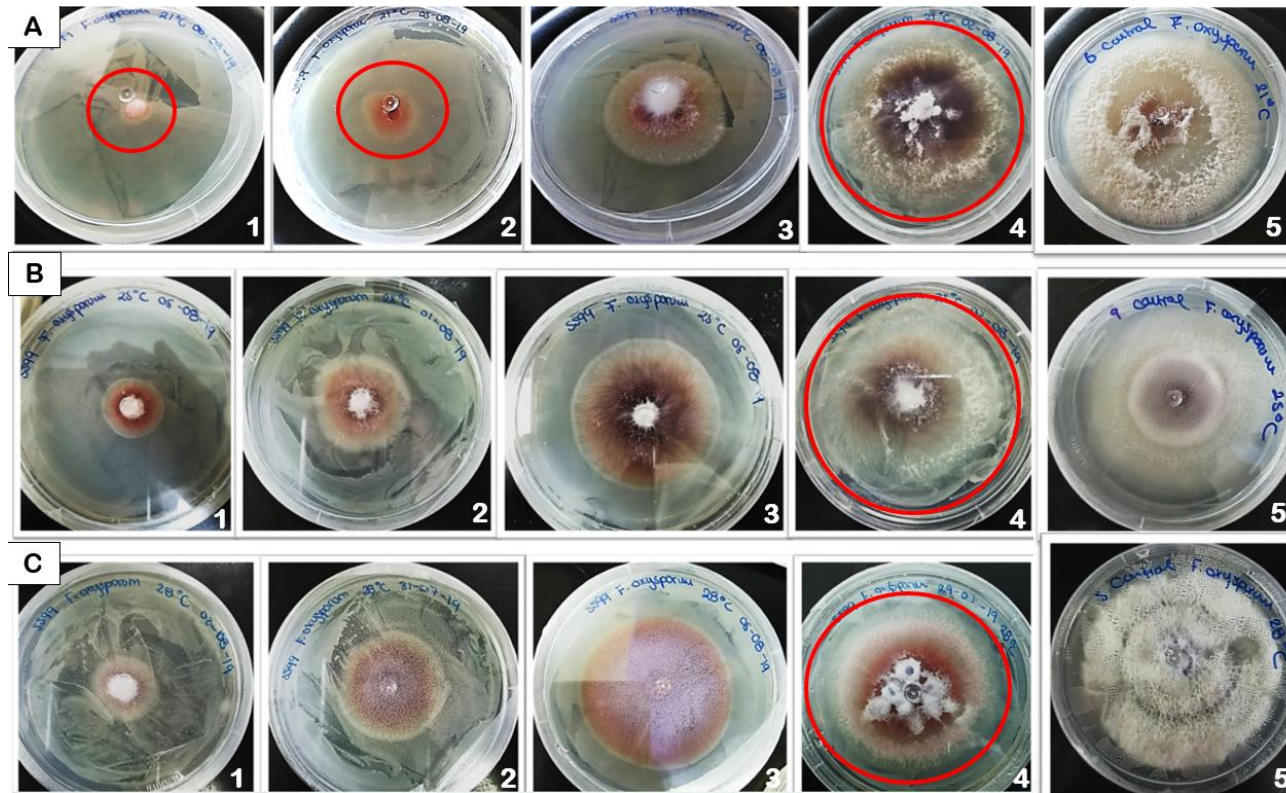


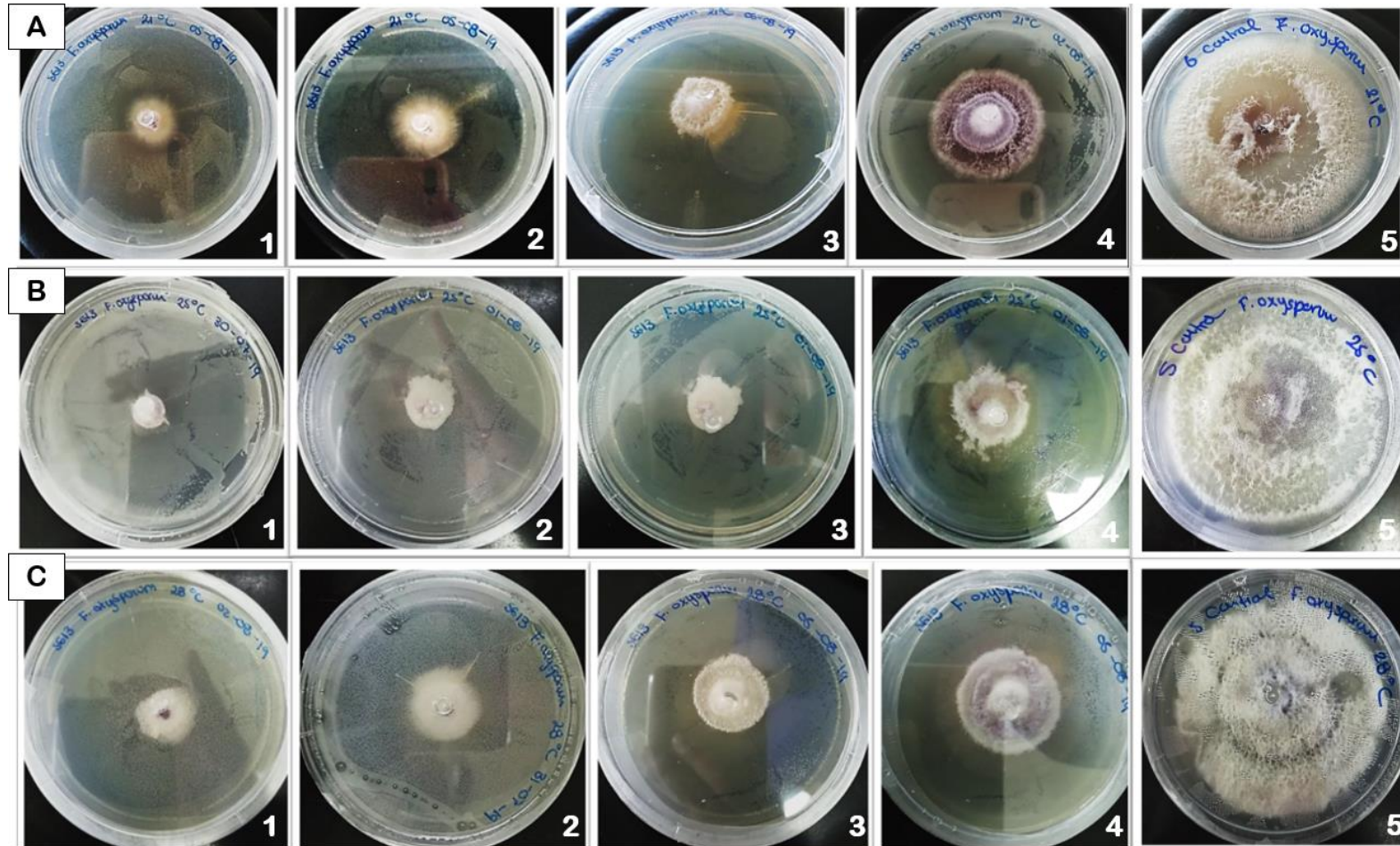
Figura 10. Observación de antagonismo de *Bacillus licheniformis* frente a *Fusarium oxysporum* a las tres temperaturas probadas. A, *Bacillus licheniformis* expuesto a 21 °C; B, *Bacillus licheniformis* expuesto a 25 °C; C, *Bacillus licheniformis* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11. En círculo rojo se señala el crecimiento del hongo donde se dificulta ver por efecto de condensación en la tapa de la placa Petri.



**Figura 11. Observación de antagonismo de *Lysinibacillus fusiformis* frente a *Fusarium oxysporum* a las tres temperaturas probadas.** A, *Lysinibacillus fusiformis* expuesto a 21 °C; B, *Lysinibacillus fusiformis* expuesto a 25 °C; C, *Lysinibacillus fusiformis* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11. En círculo rojo se señala el crecimiento del hongo donde se dificulta ver por efecto de condensación en la tapa de la placa Petri.

**Tabla 5. Porcentaje promedio de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Breviacillus parabrevis* sobre *Fusarium oxysporum***

Bacteria	Tempe- ratura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	53,8±13,1	34,3±17,7	35,8±14,9	39,3±10,0	29,1±8,2	26,4±8,6	24,5±8,9	23,6±9,8	19,3±12,1	18,7±11,3	21,9±6,5	Bajo
	25	42,2±14,0	38,8±15,9	50,0±6,1	39,6±18,4	40,5±10,6	40,0±17,7	31,7±16,3	27,6±9,7	20,7±16,2	23,1±15,3	26,4±8,1	Bajo
	28	42,7±11,0	43,6±6,4	42,4±6,3	24,7±8,3	27,6±9,9	24,7±8,0	29,3±9,3	33,1±20,5	26,4±23,6	24,2±23,4	21,6±16,5	Bajo
<i>B. licheniformis</i>	21	14,8±25,5	24,1±13,4	42,8±8,0	42,1±16,1	41,9±17,9	46,3±17,7	39,4±11,4	37,2±10,0	34,3±13,0	34,4±13,8	40,2±8,7	Medio
	25	12,5±12,5	33,5±12,4	37,9±16,5	40,2±12,5	43,5±17,2	42,4±18,6	36,7±17,0	38,1±11,6	34,1±9,2	31,0±10,2	33,9±15,3	Bajo
	28	8,8±12,2	42,2±8,7	50,6±21,9	40,5±17,8	37,0±18,9	40,5±19,1	35,9±21,1	31,3±22,2	27,7±23,2	24,8±22,3	24,7±24,0	Bajo
<i>L. fusiformis</i>	21	55,2±13,3	36,0±25,8	39,5±27,3	28,2±4,2	21,7±6,3	21,2±4,7	21,8±4,1	16,4±7,9	15,1±14,0	12,6±12,1	11,1±10,3	Bajo
	25	47,3±19,4	42,1±8,8	30,2±8,0	20,6±5,9	23,4±6,2	19,2±6,0	19,0±8,4	11,4±11,3	11,2±8,1	11,8±3,3	12,9±3,3	Bajo
	28	51,9±12,0	32,0±26,5	21,8±14,6	26,0±15,4	26,4±20,8	28,6±22,2	17,9±11,8	16,1±6,4	13,4±6,3	9,4±10,9	5,6±8,4	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	10,0±12,4	20,3±17,0	37,6±13,0	46,9±13,6	40,7±14,8	45,6±15,4	46,3±11,2	44,1±4,7	30,6±16,1	28,6±19,5	33,2±16,4	Bajo
	25	12,8±12,9	29,6±19,7	36,5±7,3	35,9±10,8	39,4±16,4	39,5±22,8	41,1±23,1	44,2±11,6	38,4±9,7	36,6±13,6	40,9±11,8	Medio
	28	9,5±13,4	30,7±15,5	41,9±10,5	36,8±20,1	27,9±22,7	30,6±24,4	29,5±19,1	31,7±22,4	29,2±12,9	28,9±11,2	27,3±15,2	Bajo



**Figura 12. Observación de antagonismo de *Brevibacillus parabrevis* frente a *Fusarium oxysporum* a las tres temperaturas probadas. A, *Brevibacillus parabrevis* expuesto a 21 °C; B, *Brevibacillus parabrevis* expuesto a 25 °C; C, *Brevibacillus parabrevis* expuesto a 28 °C; (1) enfrentamiento día 3, (2) enfrentamiento día 5, (3) enfrentamiento día 7, (4) enfrentamiento día 11, (5) control día 11.**

### 5.2.5 Análisis estadístico de la prueba de antagonismo frente a *Fusarium oxysporum*

A partir del análisis de varianza realizado, al igual que con *B. cinerea*, se obtuvo que tanto las bacterias como las diferentes temperaturas, usadas en este estudio, son estadísticamente significativas. Las bacterias fueron el factor mayormente significativo con un valor de P de 1,01e-05. Estos resultados nos indican que el factor bacteria y el factor temperatura son importantes al momento de controlar a *F. oxysporum*. Sin embargo la interacción entre estos dos factores no muestra diferencias significativas (Tabla 6).

En cuanto a, la prueba post hoc Tukey realizada con respecto al factor bacteria (Tabla 7), se observó que *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. parabrevis* presentaron el mismo efecto contra *F. oxysporum*, sin embargo este, no es tan alto. Por otro lado, *L. fusiformis* mostró un efecto diferente, siendo bajo, con respecto a las otras bacterias.

Con respecto a la prueba de Tukey en relación al factor temperatura (Tabla 8), se determinó que 21 °C exhibió un efecto similar a 25 °C y 28 °C en el antagonismo efectuado para *F. oxysporum*, a pesar de que 25 °C presentó un mejor efecto que las otras temperaturas.

**Tabla 6. Análisis de varianza del efecto antagónico de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* con *Fusarium oxysporum***

Origen de las variaciones	Df	Pr(<F)
Bacteria	3	1.01e-05 ***
Temperatura	2	0.0238 *
Error	54	
Total	59	

Df, grados de libertad; Pr(<F), valor P

**Tabla 7. Prueba post hoc Tukey con respecto al factor bacteria en relación a *Fusarium oxysporum***

BACTERIA	TUKEY
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	A
<i>Bacillus licheniformis</i>	A
<i>Bacillus pumilus</i>	b
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	c

a, b, c, efectos ordenados de acuerdo a su importancia y efectividad

**Tabla 8. Prueba post hoc Tukey con respecto al factor temperatura en relación a *Fusarium oxysporum***

TEMPERATURA	TUKEY
25	a
21	ab
28	b

a, b, efectos ordenados de acuerdo a su importancia y efectividad

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 INTERACCIÓN ANTAGÓNICA DE LAS BACTERIAS FRENTE A HONGOS

Las interacciones antagonistas han sido explotadas en el área de control biológico y la mayoría de estudios se basan en que los antagonistas afectan a los patógenos. Sin embargo, las respuestas de los patógenos hacia los agentes de biocontrol, han recibido poca atención (Duffy, Schouten y Raaijmakers, 2003).

Las relaciones antagónicas entre bacterias y hongos son las más conocidas y la manera más común de limitar el crecimiento fúngico por parte de las bacterias es la producción de sustancias antibióticas (Mille-Lindblom, Fischer y Tranvik, 2006).

Las bacterias poseen una gran diversidad y cantidad de estos antimicrobianos. Por ejemplo, la pirrolnitrina, que es producida por especies de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Serratia*, posee actividad contra fitopatógenos de importancia económica como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahlie* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Duffy et al., 2003).

*Bacillus* es uno de los principales géneros bacterianos productores de antibióticos de amplio espectro, como péptidos, lipopéptidos, aminoglucósidos y sideróforos (Sansinenea y Ortiz, 2011).

Con respecto al género *Lysinibacillus*, se ha visto que el mecanismo principal para inhibir el crecimiento de hongos patógenos es la producción de quitinasa y  $\beta$ -glucanasa, entre otras enzimas (Kavroulakis et al., 2010). Por otro lado, el género *Brevibacillus* inhibe el crecimiento de hongos patógenos a través de la producción de una amplia variedad de metabolitos para el biocontrol (Panda et al., 2014).

No obstante, los patógenos a modo de defensa, degradan la sustancia tóxica liberada por el organismo antagonista pero la degradación es lenta o ineficaz. De esta forma cuando los patógenos son expuestos a organismos antagonistas,

también pueden desarrollar alguna resistencia, pero es muy lenta o no se desarrolla (Duffy et al., 2003).

## **6.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN ENSAYOS DE ANTAGONISMO**

La temperatura fue un factor principal en nuestro estudio ya que en algunos casos si se observan diferencias significativas. En la literatura se menciona que la temperatura juega un papel importante al momento de controlar un patógeno debido a que va a depender del antagonista, ya que se ha visto que en algunos casos a temperaturas bajas algunos antagonistas no pueden desarrollarse de manera correcta. Mientras que otros antagonistas funcionan mejor a bajas temperaturas (Mari, Guizzardi y Pratella, 1996).

De esta forma, los antagonistas inhiben el crecimiento de los patógenos, ya sea secretando sustancias antibióticas o compitiendo por espacio o nutrientes (Mari et al., 1996).

## **6.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES *IN VITRO* FRENTE A *Botrytis cinerea***

### **6.3.1 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus pumilus***

*B. pumilus* tuvo efecto antagónico sobre *B. cinerea* siendo un antagonista medio a 25 °C y a 28 °C con un porcentaje de 43,8% y 58,7%, respectivamente. A 21 °C, *B. pumilus* fue un antagonista bajo con un porcentaje del 38,3%. En un estudio realizado por Mari et al. (1996), señalan que *Bacillus pumilus* es uno de los principales biocontroladores de *B. cinerea* en la pera, con un porcentaje de inhibición mayor al 75% a 20 °C, siendo la única temperatura analizada en ese estudio.

Según la literatura se sabe que la temperatura juega un papel importante al momento de controlar un patógeno, ya que, algunos antagonistas a temperaturas bajas no poseen la capacidad de desarrollarse y alcanzar la concentración óptima

para un efectivo control (Mari et al., 1996). De esta forma se podría explicar porque *B. pumilus* fue mayormente efectiva a 25 °C y a 28 °C.

Es importante recalcar que en el estudio de Mari et al. (1996), *B. pumilus* fue una bacteria endófito y se menciona que su actividad antifúngica se debe mayormente a la competencia por nutrientes, más que a la producción de sustancias antibióticas. Esto puede llegar a ser importante, ya que se ha visto que antes de que inicia la germinación de algunos hongos como *B. cinerea*, estos pasan por una fase saprofitica temporal, de esta forma son más sensibles a la competencia por nutrientes.

Sin embargo, se ha reportado la producción de sustancias extracelulares como polímeros que provocan la inhibición de la germinación y alargamiento de la hifa germinativa (Duffy et al., 2003). También se sabe, que *B. pumilus* secreta quitinasas y son efectivas contra varios patógenos, ya que, lisan la pared celular de quitina de hifas maduras, conidios y esclerocios (Ghasemi et al., 2010).

### **6.3.2 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus licheniformis***

*B. licheniformis* presentó un efecto antagónico positivo a 28 °C con un porcentaje del 83,9%, mientras que a 21 °C y a 25 °C se comportó como un antagonista medio con un porcentaje de 66,4% y 67,3% respectivamente. En un estudio realizado por Mehetre y Kale (2011), resalta que *B. licheniformis* puede ser usada para el control de hongos patógenos a temperaturas mayores en comparación de otros antagonistas como *Trichoderma* spp, debido a que este antagonista solo puede funcionar óptimamente hasta una temperatura máxima de 25 °C. Por esta razón se podría explicar que *B. licheniformis* haya funcionado mejor a 28 °C.

Además, en estudios previos (Haidar et al., 2016; Lee et al., 2006), se comprobó que *B. licheniformis* es un buen agente de control biológico y aún más con *B. cinerea*. Se ha reportado que esta bacteria secreta varias sustancias extracelulares, que han sido usadas en la industria de la fermentación por muchos años. Además, se ha visto que también estas sustancias poseen actividad

antifúngica, como péptidos, biosurfactantes, quitinasa y lacasa (Tang, Hai y Li, 2012).

Adicionalmente, se sabe que *B. licheniformis* inhibe el crecimiento a *B. cinerea* por medio de la formación de biofilm, por competencia de hierro, producción de compuestos orgánicos volátiles (COV), enzimas que degradan la pared celular y antibióticos lipopeptídicos. Con respecto a la producción de compuestos volátiles, se ha reportado que *B. licheniformis* produce cetona, alcohol, aldehído, olefina, éster, alcano y fenol. Estos compuestos son nuevos agentes para el control de hongos, y lo más importante es que son seguros para el ser humano y el medio ambiente, además de que no tiene algún efecto negativo en las plantas hospedadas (Chen et al., 2019).

La producción de biofilm, juega un papel muy importante en *B. licheniformis*, ya que, se considera su principal mecanismo de antagonismo contra hongos patógenos. El biofilm actúa como barrera física y química al momento de controlar a los patógenos (Herrera, Grossi, Zawoznik y Groppa, 2016).

La producción de antibióticos lipopeptídicos, como iturinas, fenicinas y surfactinas, solamente tienen efectos inhibitorios sobre los hongos patógenos más no en la planta. Además, estos antibióticos pueden controlar a los patógenos fúngicos por largos periodos, ya que son estables (Chen et al., 2019).

Estos son los principales modos de acción que presenta *B. licheniformis* al momento de inhibir el crecimiento de hongos patógenos.

### **6.3.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Lysinibacillus fusiformis***

*L. fusiformis* presentó actividad antagónica solamente a 28 °C con un 1,7%, ya que a 21 °C y a 25 °C no se observó inhibición. A pesar de los resultados obtenidos en nuestro estudio, se ha reportado que *L. fusiformis* posee actividad antifúngica contra una amplia gama de patógenos fúngicos de plantas. La producción de quitinasa es el principal mecanismo, al degradar las paredes celulares fúngicas. Además, posee otra característica importante, al ser un

promotor de crecimiento de las plantas, llegando a ser un óptimo biocontrolador (Singh et al., 2012).

No obstante, se ha visto que las quitinasas son activas en un amplio rango de temperatura y pH, dependiendo de la fuente de bacterias de las que se han aislado (Bhattacharya, Nagpure y Gupta, 2008). De esta forma se podría explicar nuestros resultados, ya que, las temperaturas que se probaron en este estudio pudieron no ser las óptimas para que este aislado bacteriano secrete quitinasa.

#### **6.3.4 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Brevibacillus parabrevis***

*B. parabrevis* tuvo efecto antagónico positivo a las tres temperaturas probadas con un porcentaje del 80,2% a 21 °C, 71,5% a 25 °C y 76,2% a 28 °C. En la literatura se indica que, las especies del género *Brevibacillus* son potenciales agentes del biocontrol y han sido efectivos controlando a insectos, nematodos. Además, con respecto a la actividad antifúngica se tiene pocos reportes de *B. parabrevis*; sin embargo, existe un mayor registro de *B. laterosporus* y *B. brevis* (Panda et al., 2014). Por lo cual no hay estudios del efecto de la temperatura en el efecto antagónico de *B. parabrevis*.

Algunos péptidos antimicrobianos como la edeína, gramicidina S, tirocidinas, laterocidinas, entre otros, han sido mayormente reportados de las especies de *Brevibacillus* mencionadas anteriormente. Sin embargo, el único péptido reportado para *B. parabrevis* es la tirocidina (Yang y Yousef, 2018). La tirocidina, posee una potente actividad antifúngica, provocando anormalidades morfológicas en el micelio (Lee y Kim, 2015). De esta forma, se presume que este péptido antimicrobiano influyó en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* ya que este fue un antagonista positivo.

## 6.4 PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES *IN VITRO* FRENTE A *Fusarium oxysporum*

### 6.4.1 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus pumilus*

*B. pumilus* tuvo un efecto antagónico bajo con un porcentaje de 21,9% a 21 °C y 21,6% a 28 °C, mientras que a 25 °C un porcentaje de 26,4%. Siendo ineficaz controlando a *F. oxysporum*, a pesar de que en la literatura se indica que las especies del género *Bacillus* antagonizan directamente a los patógenos fúngicos al competir por nichos y por nutrientes esenciales o también por producir compuestos tóxicos, como ya se mencionó anteriormente con respecto a *B. cinerea* (Khan et al., 2017).

No obstante otra forma de inhibir el crecimiento de hongos patógenos es la producción de sideróforos por parte de las bacterias como es el caso de *B. pumilus* frente a *F. oxysporum*, promoviendo así el crecimiento de las plantas de dos maneras, la primera es el suministro de hierro a la planta y la otra es quitar este nutriente a los hongos (Khan et al., 2017).

Aunque también se ha reportado que *B. pumilus* inhibe el crecimiento micelial de *F. oxysporum* por medio de metabolitos antifúngicos extracelulares (Gheorghe et al., 2008).

### 6.4.2 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Bacillus licheniformis*

*B. licheniformis* tuvo un efecto antagónico medio a 21 °C con un porcentaje del 40,2%, mientras que a 25 °C y a 28 °C el efecto antagónico fue bajo con porcentajes de 33,9% y 24,7%, respectivamente.

*B. licheniformis* ha sido usada para el control biológico de *F. oxysporum* por su producción de enzimas quitinolíticas y su presencia en la rizosfera de cultivos es beneficiosa, debido a que, suprime a los hongos patógenos de las plantas cerca de la zona de la raíz. Esto se da por la capacidad de degradar las paredes celulares fúngicas ricas en quitina lo que conlleva a otros efectos secundarios como la

inhibición de la germinación de esporas, puntas hifales y alargamiento del tubo germinal (Gomaa, 2012).

Además, factores como la temperatura influyen en la cantidad de quitinasa que puede producir la bacteria y se ha visto que *B. licheniformis* produce la mayor cantidad de quitina a 30 °C (Gomaa, 2012). Sin embargo, en este estudio se puede observar que a menor temperatura (21 °C) se produce una mejor inhibición del crecimiento micelial. La temperatura no es el único factor que influye en la inhibición del crecimiento micelial puede también deberse al pH, las condiciones de incubación, la presencia de iones metálicos, entre otros. Factores que son importantes para la buena producción de la quitina (Gomaa, 2012).

No obstante, se ha identificado una proteína denominada F2 que es eficiente inhibiendo a *F. oxysporum* (Tang-Bing et al., 2012).

#### **6.4.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Lysinibacillus fusiformis***

*L. fusiformis* presentó una actividad antagónica baja y negativa ya que a 21 °C y a 25 °C exhibió un porcentaje del 11,1% y el 12,9%, respectivamente; mientras que a 28 °C un porcentaje del 5,6%. A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, como ya se mencionó anteriormente con respecto a *B. cinerea*, en la literatura se menciona que *L. fusiformis* tiene enzimas quitinolíticas siendo así efectiva contra patógenos fúngicos y entre ellos *F. oxysporum*, uno de los más importantes. Además, se evidenció que *L. fusiformis* presentó un porcentaje mayor al 60% siendo efectiva para el control de *F. oxysporum* (Singh et al., 2012).

Asimismo, se indica que el efecto de factores físicos y nutricionales como fuentes de carbono y nitrógeno influyen en la producción de estas enzimas (Singh et al., 2012).

#### **6.4.4 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE *Brevibacillus parabrevis***

*B. parabrevis* exhibió un efecto antagónico medio a 25 °C con un 40,9%, mientras que a 21 °C y a 28 °C un porcentaje de 33,2% y 27,3%, respectivamente.

Como ya se mencionó anteriormente, no se tiene un registro de los mecanismos que intervienen al momento de controlar a los hongos patógenos por medio de *B. parabrevis* (Panda et al., 2014). Sin embargo, de igual manera que con *B. cinerea*, puede ser que la tirocidina haya influido al momento de controlar a *F. oxysporum* (Lee y Kim, 2015).

## 7. CONCLUSIONES

1. *Brevibacillus parabrevis*, proveniente de la Cueva de los Tayos, presentó el mayor efecto antagónico al momento de controlar a *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C).
2. *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis* y *B. parabrevis* fueron antagonistas efectivos contra *Botrytis cinerea* a las tres temperaturas probadas (21 °C, 25 °C y 28 °C), a excepción de *B. pumilus* que fue eficiente solamente a 25 °C y 28 °C, mas no a 21 °C.
3. *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus parabrevis* fueron eficientes a 21 °C y 25 °C, respectivamente, controlando a *Fusarium oxysporum*.
4. *Lysinibacillus fusiformis* no fue una bacteria antagonista efectiva con *Botrytis cinerea* ni contra *Fusarium oxysporum*.

## 8. REFERENCIAS

- Bhattacharya, D., Nagpure, A. y Gupta, R. (2008). Bacterial chitinases: Properties and potential. *Critical reviews in biotechnology*, 27, 21-28. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/07388550601168223>
- Chen, X., Wang, Y., Gao, Y., Gao, T. y Zhang, D. (2019). Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *The Plant Pathology Journal*, 35(5), 425-436. Recuperado de <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0064>
- Constanza, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Bautista, D., González, L. y Guevara, M. (2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. NOVA. *Publicación Científica en ciencias biomédicas*, 8 (13). Recuperado de [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA13\\_ARTORIG6.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA13_ARTORIG6.pdf)
- Constantin, S., Toulkeridis, T., Moldovan, O. T., Villacís, M. y Addison, A. (2018). Caves and karst of Ecuador – state-of-the-art and research perspectives. *Physical Geography*, 1–24. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/02723646.2018.1461496>
- Duffy, B., Schouten, A. y Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 501-538. Recuperado de <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>
- Fillinger, S. y Elad, Y. (2016). *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. New York: Springer International Publishing. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Fravel, D., Olivain, C. y Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>
- Gheorghe, A., Jecu, L., Voicu, A., Popea, F., Rosu, A. y Roseanu, A. (2008). Biological control of phytopathogen microorganisms with antagonist bacteria. *Chem Eng Trans*, 14, 509-516. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/b45c/891f331f41aa160e05d63b4017ca2af7106d.pdf>

- Ghasemi, S., Ahmadian, G., Babaeian, N., Rahimian, H., Ghandili, S., Dehestani, A. y Shariati, P. (2010). Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1437-1443. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-010-0318-6>
- Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *Journal of Microbiology*, 50(1), 103–111. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>
- Haek, A. y Eilenberg, J. (2018). Natural enemies: an introduction to biological control. Cambridge: University of Cambridge Press.
- Haidar, R., Deschamps, J., Roudet, C., Calvo, E., Bruez, E., Rey, P. y Fermaud, M. (2016). Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biological control*, 92, 55-65. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.003>
- Herrera, S. D., Grossi, C., Zawoznik, M. y Groppa, M. D. (2016). Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological research*, 186, 37-43.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Besi, M. I., Katsou, P., Damaskinou, A., Ehaliotis, C. y Papadopoulou, K. K. (2010). Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant and Soil*, 333(1-2), 233-247.
- Khan, N., Maymon, M. y Hirsch, A. (2017). Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*- based antimicrobials. *Microorganisms*, 5(4), 75. Recuperado de <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>.
- Lee, D. y Kim, B. (2015). Antimicrobial cyclic peptides for plant disease control. *Plant pathology journal*, 31(1), 1-11. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356600/>
- Lee, J., Lee, S., Kim, C., Son, J., Song, J., Lee, K., Kim, H., Jung, S. y Moon, B. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological control*. 37(3), 329-337. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.01.001>

- Logan, N. A. y Vos, P. De. (2015a). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–163. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Logan, N. A. y Vos, P. De. (2015b). *Brevibacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–22. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00550>
- Mari, M., Guizzardi, M. y Pratella, G. C. (1996). Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 7(1), 30–37. Recuperado de <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0060>
- Mehetre, S. T. y Kale, S. P. (2011). Comparative efficacy of thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis* (NR1005) and antagonistic fungi, *Trichoderma harzianum* to control *Pythium aphanidermatum*-induced damping off in chilli (*Capsicum annum* L.). *Archives of phytopathology and plant protection*, 44(11), 1068-1074.
- Mille-Lindblom, C., Fischer, H. J. y Tranvik, L. (2006). Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos*, 113(2), 233-242. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14337.x>
- Martínez, S., Rojas, D., Hernández, R., Prieto, C., Orozco, M., Peña, J. y Santoyo, G. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 24(12), 1349–1362. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.940846>
- Michielse, C. y Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311–324. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>
- Panda, A. K., Bisht, S. S., DeMondal, S., Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G. y Panigrahi, A. K. (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: A short review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105(4), 623-639. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-013-0099-7>
- Pérez, R., Gonzales, T. y Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3). Recuperado de

- <http://reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>
- Rojas, M., Sánchez, D., Rosales, K. y Lugo, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 9. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522017000200005yscript=sci\\_arttextytlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522017000200005yscript=sci_arttextytlng=pt)
- Sansinenea, E. y Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33(8), 1523-1538.
- Silva, A. (2018). *Acción in vitro de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos conjuntos contra Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Singh, R., Kumar, D., Solanki, M., Singh, P., Srivastva, A., Kumar, S., Kashyap, P., Saxena, A., Singhal, P. y Arora, D. (2012). Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. *Journal of basic microbiology*, 52, 1-10. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/jobm.201100590>
- Tang, C., Hai, C. y Li, J. (2012). Isolation and partial characterization of an antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules*, 17(6), 7336-7347. Recuperado de <https://doi.org/10.3390/molecules17067336>
- Tejera, B., Heydrich, M. y Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de protección Vegetal*, 2(27). Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttextypid=S1010-27522012000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttextypid=S1010-27522012000200008)
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. y Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Yang, X. y Yousef, A. (2018). Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World journal of microbiology and biotechnology*, 34, 57. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-018-2437>

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis microbiológico de ambientes por sedimentación y análisis de superficies por hisopado en DISerLAB



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador



**DISerLAB**  
**PUCE**

Diagnóstico, Investigación  
Servicios, Laboratorios

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca  
E-MAIL: [diserlab@puce.edu.ec](mailto:diserlab@puce.edu.ec)  
RUC: 1790105601001  
Telef: 2991727  
Fax: 2991726  
Quito - Ecuador

#### RESULTADOS DE LA MUESTRA N°: M1, Ambiente Sumidero Suelo Muestra 1

-Recuento de Mesófilos Aerobios:	114 UFC / 5 minutos de exposición.
-Recuento de Coliformes Totales:	122 UFC / 5 minutos de exposición.
-Recuento de Mohos:	1 UFC / 5 minutos de exposición.
-Recuento de Levaduras:	Menor a 1 UFC / 5 minutos de exposición.

#### Resultado válido sólo para la muestra analizada

#### ABREVIACIONES:

N°:	Léase Número
PUCE:	Léase Pontificia Universidad Católica del Ecuador
PT:	Léase Procedimiento Técnico
DIS:	Léase DISerLAB
MAA:	Léase Microbiología de Aguas y Alimentos
°C:	Léase Grados Centígrados
%:	Léase Por Ciento
UFC:	Léase Unidades Formadoras de Colonia
V.A:	Léase Volumen Aspirado

#### INFORMACIÓN:

La muestra analizada: N°: M1, llega al laboratorio luego de 4 días a partir de la toma de muestra; las cajas con medios de cultivo se encuentran selladas en fundas plásticas y transportadas en cooler hasta su entrega en el laboratorio.

  
Magister Elena Grandá M.  
RESPONSABLE  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.



SELLO DEL LABORATORIO

**Anexo 2. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Botrytis cinerea*, primera réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	30,0	75,0	75,8	75,0	76,5	76,5	69,4	67,1	60,0	55,3	52,9	Medio
	25	0,0	65,5	73,8	80,0	81,2	81,2	67,1	62,4	54,1	45,9	45,9	Medio
	28	0,0	44,4	61,5	74,4	79,6	82,8	84,1	83,3	75,3	67,1	49,4	Medio
<i>B. licheniformis</i>	21	20,0	75,0	81,8	85,0	83,5	83,5	78,8	69,4	65,9	65,9	62,4	Medio
	25	12,5	75,9	80,3	80,0	81,2	72,9	62,4	54,1	38,8	38,8	36,5	Bajo
	28	0,0	33,3	53,8	72,1	77,8	81,3	82,6	83,3	85,9	85,9	85,9	Positivo
<i>L. fusiformis</i>	21	60,0	72,5	45,5	25,0	37,6	24,7	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	25	50,0	86,2	72,1	41,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	28	50,0	72,2	30,8	25,6	11,1	1,6	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	40,0	70,0	81,8	85,0	85,9	78,8	78,8	78,8	78,8	76,5	76,5	Positivo
	25	12,5	48,3	75,4	81,3	81,2	77,6	77,6	77,6	77,6	77,6	72,9	Positivo
	28	0,0	44,4	61,5	76,7	81,5	84,4	85,5	63,9	62,4	57,6	57,6	Medio

**Anexo 3. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Botrytis cinerea*, segunda réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasificación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	33,3	85,3	85,2	88,6	84,7	69,4	69,4	62,4	24,7	24,7	24,7	Bajo
	25	42,9	52,9	73,3	78,7	80,0	81,2	81,2	81,2	81,2	81,2	78,8	Positivo
	28	20,0	70,0	80,0	79,5	79,2	81,0	75,0	73,8	88,2	87,1	85,9	Positivo
<i>B. licheniformis</i>	21	0,0	73,5	77,0	82,3	72,9	72,9	72,9	72,9	69,4	69,4	69,4	Medio
	25	28,6	61,8	68,3	73,3	65,0	67,1	67,1	67,1	67,1	67,1	67,1	Medio
	28	0,0	70,0	77,1	79,5	83,0	84,5	82,8	83,1	87,1	87,1	85,9	Positivo
<i>L. fusiformis</i>	21	33,3	55,9	26,2	43,0	32,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	25	42,9	55,9	36,7	41,3	16,3	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	28	20,0	80,0	57,1	65,9	49,1	5,2	0,0	0,0	16,5	12,9	5,9	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	0,0	61,8	82,0	86,1	82,4	82,4	82,4	82,4	82,4	81,2	78,8	Positivo
	25	0,0	47,1	76,7	81,3	82,5	81,2	77,6	77,6	76,5	75,3	72,9	Positivo
	28	0,0	65,0	65,7	72,7	77,4	75,9	78,1	78,5	74,1	74,1	74,1	Positivo

**Anexo 4. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Botrytis cinerea*, tercera réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	58,3	87,5	84,6	88,6	84,7	74,1	72,9	65,9	57,6	50,6	43,5	Medio
	25	45,5	75,0	80,8	85,0	85,9	84,7	80,0	78,8	61,2	51,8	37,8	Bajo
	28	0,0	56,3	71,4	77,3	81,8	84,6	87,3	87,1	64,7	60,0	51,7	Medio
<i>B. licheniformis</i>	21	58,3	77,5	82,7	87,3	85,9	85,9	85,9	85,9	85,9	84,7	84,7	Positivo
	25	0,0	70,0	76,9	83,8	84,7	84,7	84,7	77,6	77,6	75,3	75,3	Positivo
	28	0,0	43,8	62,9	70,5	76,4	80,0	83,5	84,7	84,7	83,5	83,5	Positivo
<i>L. fusiformis</i>	21	41,7	57,5	67,3	49,4	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	25	54,5	75,0	40,4	45,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	28	20,0	43,8	71,4	77,3	12,7	15,4	13,9	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	41,7	77,5	78,8	86,1	87,1	87,1	87,1	87,1	85,9	85,9	85,9	Positivo
	25	45,5	75,0	76,9	85,0	83,5	82,4	57,6	49,4	49,4	49,4	49,4	Medio
	28	0,0	62,5	74,3	79,5	83,6	86,2	88,6	82,4	82,4	82,4	82,4	Positivo

**Anexo 5. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Botrytis cinerea*, cuarta réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	69,2	76,2	84,1	85,9	85,9	78,8	75,3	75,3	74,1	69,4	41,2	Medio
	25	33,3	79,5	82,8	86,9	84,7	82,4	76,5	76,5	76,5	76,5	36,5	Bajo
	28	20,0	75,0	80,6	73,3	65,5	54,4	47,1	48,6	50,0	42,7	30,8	Bajo
<i>B. licheniformis</i>	21	53,8	73,8	81,0	75,6	77,6	77,6	77,6	77,6	71,8	70,6	70,6	Positivo
	25	16,7	74,4	81,3	85,7	85,9	85,9	85,9	68,2	68,2	67,1	67,1	Medio
	28	0,0	50,0	66,7	57,8	75,9	79,4	80,0	80,6	82,4	82,7	82,1	Positivo
<i>L. fusiformis</i>	21	69,2	73,8	61,9	44,9	27,1	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	25	25,0	69,2	67,2	53,6	29,4	23,5	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	28	0,0	54,2	58,3	40,0	20,7	11,8	14,3	16,7	17,6	13,3	2,6	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	38,5	76,2	81,0	84,6	85,9	85,9	85,9	85,9	85,9	85,9	82,4	Positivo
	25	8,3	66,7	76,6	82,1	82,4	82,4	82,4	82,4	82,4	82,4	82,4	Positivo
	28	40,0	54,2	69,4	75,6	81,0	83,8	84,3	76,4	74,3	88,0	88,5	Positivo

**Anexo 6. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Botrytis cinerea*, quinta réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	61,5	81,6	82,0	83,8	77,6	77,6	71,8	65,9	43,5	29,4	29,4	Negativo
	25	53,3	78,4	83,6	88,2	81,2	74,1	69,4	62,4	51,8	40,0	20,0	Bajo
	28	36,4	69,6	45,7	72,0	77,4	80,0	80,3	86,8	86,8	86,8	75,9	Positivo
<i>B. licheniformis</i>	21	15,4	68,4	80,3	81,1	83,5	76,5	64,7	62,4	57,6	52,9	49,4	Medio
	25	6,7	64,9	77,0	84,7	85,9	84,7	68,2	68,2	68,2	68,2	85,9	Positivo
	28	9,1	52,2	65,7	76,0	77,4	80,0	80,3	81,6	81,6	81,6	82,3	Positivo
<i>L. fusiformis</i>	21	69,2	76,3	68,9	39,2	32,9	10,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	25	73,3	78,4	70,5	48,2	31,8	17,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Negativo
	28	63,6	69,6	22,9	16,0	17,7	14,3	12,7	17,1	10,5	0,0	0,0	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	23,1	71,1	82,0	83,8	85,9	83,5	82,4	82,4	82,4	80,0	77,6	Positivo
	25	0,0	73,0	83,6	87,1	87,1	87,1	81,2	81,2	81,2	80,0	80,0	Positivo
	28	0,0	52,2	57,1	70,0	75,8	78,6	78,9	80,3	80,3	78,9	78,5	Positivo

**Anexo 7. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Fusarium oxysporum*, primera réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	60,0	5,0	18,8	35,7	28,8	30,0	16,1	8,6	14,7	16,3	20,0	Bajo
	25	33,3	57,1	50,0	20,0	27,1	15,1	7,5	12,9	6,8	15,3	15,3	Negativo
	28	42,9	42,9	45,5	16,3	30,8	17,2	29,3	37,6	29,4	21,2	18,8	Bajo
<i>B. licheniformis</i>	21	60,0	45,0	56,3	21,4	26,9	26,7	29,0	35,7	34,7	31,3	28,2	Bajo
	25	8,3	47,6	59,4	30,0	22,9	18,9	15,1	24,3	27,0	27,1	27,1	Bajo
	28	0,0	52,4	45,5	18,6	17,3	20,3	13,3	7,1	0,0	0,0	0,0	Negativo
<i>L. fusiformis</i>	21	60,0	80,0	87,5	31,0	26,9	26,7	29,0	4,3	0,0	0,0	4,7	Negativo
	25	66,7	57,1	37,5	17,5	25,0	17,0	5,7	12,9	6,8	14,1	14,1	Bajo
	28	42,9	0,0	9,1	18,6	21,2	25,0	18,7	23,5	18,8	18,8	18,8	Bajo
<i>B. parabrevis</i>	21	30,0	5,0	37,5	52,4	25,0	26,7	29,0	37,1	9,3	0,0	5,9	Negativo
	25	0,0	4,8	37,5	17,5	12,5	0,0	0,0	24,3	28,4	20,0	20,0	Bajo
	28	28,6	52,4	39,4	16,3	11,5	17,2	29,3	37,6	31,8	31,8	31,8	Bajo

**Anexo 8. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Fusarium oxysporum*, segunda réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	60,0	45,0	46,9	50,0	31,4	25,9	25,8	27,1	26,7	26,5	20,0	Bajo
	25	33,3	46,2	41,4	20,0	33,3	34,0	27,3	27,4	28,4	36,5	31,8	Bajo
	28	33,3	47,8	51,5	16,3	17,3	15,6	43,2	65,9	62,4	62,4	48,2	Medio
<i>B. licheniformis</i>	21	0,0	30,0	43,8	57,1	64,7	66,7	53,2	48,6	46,7	48,2	49,4	Medio
	25	8,3	34,6	34,5	50,0	58,3	60,0	36,4	35,5	35,1	41,2	40,0	Medio
	28	25,0	39,1	54,5	60,5	67,3	70,3	70,3	67,1	62,4	60,0	60,0	Medio
<i>L. fusiformis</i>	21	60,0	20,0	31,3	31,0	25,5	22,2	21,0	24,3	29,3	22,9	24,7	Bajo
	25	25,0	34,6	20,7	17,5	25,0	12,0	18,2	0,0	13,5	14,1	14,1	Bajo
	28	66,7	69,6	45,5	53,5	61,5	65,6	35,1	18,8	15,3	2,4	0,0	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	0,0	40,0	50,0	57,1	64,7	66,7	51,6	42,9	34,7	39,8	41,2	Medio
	25	25,0	50,0	48,3	45,0	54,2	56,0	47,3	53,2	40,5	48,2	48,2	Medio
	28	0,0	39,1	60,6	60,5	63,5	68,8	54,1	60,0	43,5	43,5	41,2	Medio

**Anexo 9. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Fusarium oxysporum*, tercera réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	68,8	30,0	22,6	35,7	20,0	19,3	15,6	19,4	27,6	26,5	27,1	Bajo
	25	66,7	14,3	48,6	47,5	51,1	55,6	50,0	33,8	35,1	32,9	31,8	Bajo
	28	61,5	50,0	41,7	25,6	17,4	27,3	26,6	14,3	28,6	24,7	24,7	Bajo
<i>B. licheniformis</i>	21	6,3	15,0	38,7	54,8	57,8	63,2	46,9	40,3	44,7	45,8	47,1	Medio
	25	0,0	42,9	20,0	30,0	38,3	44,4	40,6	47,1	48,1	42,4	42,3	Medio
	28	0,0	50,0	27,8	39,5	39,1	36,4	31,3	21,4	34,5	29,4	29,4	Medio
<i>L. fusiformis</i>	21	68,8	15,0	19,4	31,0	15,6	19,3	18,8	13,4	22,4	25,3	18,8	Bajo
	25	66,7	38,1	37,1	17,5	19,1	18,5	21,9	0,0	10,4	14,1	14,1	Bajo
	28	61,5	45,8	25,0	18,6	6,5	7,3	6,3	12,9	9,5	2,4	0,0	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	12,5	0,0	19,4	40,5	42,2	54,4	59,4	44,8	30,3	31,3	30,6	Bajo
	25	0,0	42,9	34,3	40,0	48,9	53,7	53,1	44,1	46,8	49,4	47,1	Medio
	28	0,0	29,2	36,1	16,3	8,7	9,1	7,8	8,6	23,8	24,7	24,7	Bajo

**Anexo 10. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Fusarium oxysporum*, cuarta réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasifi- cación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	41,7	45,5	53,1	48,8	41,5	39,0	36,9	30,0	0,0	0,0	29,4	Bajo
	25	40,0	41,7	58,3	59,5	50,9	58,7	42,5	38,5	0,0	0,0	32,9	Bajo
	28	38,5	33,3	37,1	30,2	32,7	33,9	29,9	29,2	0,0	0,0	9,4	Negativo
<i>B. licheniformis</i>	21	0,0	13,6	37,5	48,8	28,3	35,6	41,5	40,0	14,3	13,8	41,2	Medio
	25	33,3	25,0	50,0	57,1	64,2	60,3	61,6	52,6	24,6	24,6	49,4	Medio
	28	0,0	37,5	85,7	55,8	34,7	45,8	37,3	31,9	16,2	15,7	29,4	Bajo
<i>L. fusiformis</i>	21	33,3	31,8	31,3	26,8	26,4	23,7	20,0	21,4	0,0	0,0	0,0	Negativo
	25	46,7	41,7	33,3	31,0	32,1	28,6	28,8	25,6	1,8	7,0	15,3	Bajo
	28	38,5	20,8	17,1	20,9	18,4	16,9	7,5	6,9	4,4	0,0	0,0	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	0,0	27,3	50,0	58,5	37,7	40,7	44,6	45,7	25,0	20,7	41,2	Medio
	25	26,7	37,5	33,3	35,7	45,3	46,0	53,4	51,3	28,1	24,6	43,5	Medio
	28	0,0	16,7	37,1	39,5	36,7	40,7	41,8	43,1	36,8	31,4	36,5	Bajo

**Anexo 11. Porcentaje de inhibición micelial de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Brevibacillus parabrevis* sobre *Fusarium oxysporum*, quinta réplica**

Bacteria	Temperatura °C	Porcentaje de inhibición											Clasificación
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	
<i>B. pumilus</i>	21	38,5	45,8	37,5	26,2	24,0	17,9	28,1	32,9	27,5	24,4	12,9	Bajo
	25	37,5	34,8	51,6	51,2	40,0	36,7	31,3	25,4	33,3	30,9	20,0	Bajo
	28	37,5	44,0	36,4	34,9	39,6	29,7	17,4	18,4	11,4	12,9	7,1	Negativo
<i>B. licheniformis</i>	21	7,7	16,7	37,5	28,6	32,0	39,3	26,6	21,4	31,3	32,9	35,3	Bajo
	25	12,5	17,4	25,8	34,1	34,0	28,3	29,7	31,0	35,8	19,8	10,6	Bajo
	28	18,8	32,0	39,4	27,9	26,4	29,7	27,5	28,9	25,3	18,8	4,7	Negativo
<i>L. fusiformis</i>	21	53,8	33,3	28,1	21,4	14,0	14,3	20,3	18,6	23,8	14,6	7,1	Negativo
	25	31,3	39,1	22,6	19,5	16,0	20,0	20,3	18,3	23,5	9,9	7,1	Negativo
	28	50,0	24,0	12,1	18,6	24,5	28,1	21,7	18,4	19,0	23,5	9,4	Negativo
<i>B. parabrevis</i>	21	7,7	29,2	31,3	26,2	34,0	39,3	46,9	50,0	53,8	51,2	47,1	Medio
	25	12,5	13,0	29,0	41,5	36,0	41,7	51,6	47,9	48,1	40,7	45,8	Medio
	28	18,8	16,0	36,4	51,2	18,9	17,2	14,5	9,2	10,1	12,9	2,4	Negativo