

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE *Bacillus* spp.
FRENTE A FITOPATÓGENOS EN UVILLA**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en
Microbiología**

Emily Camila Domínguez Olmedo

Quito, 2024

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la señorita Emily Camila Domínguez Olmedo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna
Directora de la Disertación
Quito, 28 de junio de 2024

DEDICATORIA

Mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional, el financiamiento de la carrera, y por ayudarme alcanzar mis metas.

A la Mtr. Jeniffer Yáñez y al Microbiólogo Alexis Quintana por la paciencia, el afecto y el apoyo durante la investigación.

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN**Revista**

La Granja: Revista de Ciencias de la Vida.

Título

Evaluación de Compuestos Volátiles de *Bacillus* spp. frente a Fitopatógenos en Uvilla

Autores

Emily Camila Domínguez Olmedo*, Jeniffer Marcela Yáñez Altuna**.

Correo electrónico

*ecdominguez@puce.edu.ec, **jyanez989@puce.edu.ec.

Dirección

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la Granja: Revista de Ciencias de la Vida a partir de la siguiente [página](#).

Normas para autores: <https://lagranja.ups.edu.ec/pdf/granja/normas.pdf>

Sección (Marcar)

Artículo científico x___

Revisión Bibliográfica ___

Punto de vista ___

Special Issue" Sustentabilidad Organizacional, Desarrollo y Gestión

Ambiental" ___

Evaluación de compuestos volátiles de *Bacillus* spp. frente a fitopatógenos en uvilla***Evaluation of volatile compounds of Bacillus spp. against phytopathogens in goldenberry***Emily Camila Domínguez Olmedo^{1*}

¹Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.170102. Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia: ecdominguez@puce.edu.ec

RESUMEN

La producción de uvilla (*Physalis peruviana* L.) ha impactado en el crecimiento socioeconómico del sector agrícola ecuatoriano; sin embargo, los productores afrontan pérdidas durante la poscosecha por la acción de fitopatógenos. Las estrategias de control incluyen el uso de fungicidas sintéticos, lo que resulta en graves daños al ambiente. A nivel mundial, se emplean biocontroladores que son organismos vivos utilizados para reducir la acción de los fitopatógenos. Por lo expuesto, en este estudio se evaluó la capacidad de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) producidos por *Bacillus* spp. frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* en frutos de uvilla en postcosecha. Se recolectaron ocho muestras de suelo de campos de las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas. Se aislaron colonias con características similares a bacterias del género *Bacillus*. Estas se identificaron, molecularmente, mediante PCR y se compararon los resultados de secuenciación en las bases de datos del NCBI y EZ Bio Cloud. El efecto de los COV's sobre los fitopatógenos se evaluó *in vitro* mediante la técnica de doble placa. Se aislaron cuatro cepas (EDB-09, EDB-08 y EDB-10) identificadas como *Bacillus* sp., excepto EDBS-02 que se identificó como *Bacillus siamensis*. En

cuanto al efecto de los COV'S, se registró un porcentaje de inhibición del crecimiento (PGI) medio y alto en los fitopatógenos *B. cinerea* y *F. oxysporum*. En conclusión, los COV's producidos por las cepas evaluadas *in vitro* constituyen un mecanismo de inhibición para detener el desarrollo de los patógenos de la uvilla.

ABSTRACT

The production of uvilla (Physalis peruviana L.) has had an impact on the socio-economic growth of the Ecuadorian agricultural sector; however, producers face losses during the post-harvest period due to the action of phytopathogens. Control strategies include the use of synthetic fungicides, resulting in serious environmental damage. Globally, biocontrollers are used, which are living organisms employed to reduce the action of phytopathogens. Therefore, this study evaluated the capacity of volatile organic compounds (VOCs) produced by Bacillus spp. against the phytopathogenic fungi Botrytis cinerea and Fusarium oxysporum in post-harvest uvilla fruits. Eight soil samples were collected from fields in the provinces of Pichincha and Santo Domingo de los Tsáchilas. Colonies with characteristics similar to Bacillus bacteria were isolated, molecularly identified using PCR, and their sequencing results were compared in the NCBI and EZ Bio Cloud databases. The effect of VOCs on phytopathogens was evaluated in vitro using the double plate technique. Four strains (EDB-09, EDB-08, and EDB-10) were isolated and identified as Bacillus sp., except for EDBS-02, identified as Bacillus siamensis. Regarding the effect of VOCs, a moderate to high percentage of growth inhibition (PGI) was recorded in the phytopathogens B. cinerea and F. oxysporum. In conclusion, the VOCs produced by the strains evaluated in vitro constitute an inhibitory mechanism to halt the development of uvilla pathogens.

Palabras clave

Compuestos orgánicos volátiles, *Physalis peruviana*, *Bacillus* spp, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*.

Keywords

, *Physalis peruviana*, *Bacillus* spp, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*.

1. Introducción

En el Ecuador, la vida útil de la fruta de la uvilla (*Physalis peruviana* L.) se ve reducida en postcosecha, debido, al transporte inadecuado de los frutos, la falta de ventilación y en especial,

el exceso de humedad, lo que provoca un ambiente óptimo para el crecimiento de fitopatógenos (García, Valdez y Vázquez, 2022). Los microorganismos que causan más daño a las uvas son las bacterias y hongos, luego los virus y nematodos (León y Barriga, 2020). Entre los agentes patógenos fúngicos con mayor importancia está *Fusarium oxysporum*, que causa marchitamiento vascular, bandas, pudrición a la fruta y manchas tipo perdigones al capuchón, lo que conlleva pérdidas en la producción que alcanzan del 10% al 50% o incluso porcentajes mayores (United States Department of Agriculture, 2019). El hongo *Botrytis cinerea* produce el moho gris de la uva, daña al tejido vegetal tanto del fruto como de la envoltura, con un porcentaje de pérdida del 20% (Silva, 2020).

Los pesticidas sintéticos son una herramienta indispensable para la conservación de la fruta (Dávila *et al.*, 2021). Los fungicidas más utilizados contienen principios activos como Clorotalonil, Mancozeb, Carbendazin y Oxicloruro de cobre. Sin embargo, estos compuestos pueden causar daños mecánicos y alteraciones fisiológicas en la fruta por lo que reduce su calidad (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, 2020). Además, el uso indiscriminado de los compuestos químicos causa intoxicación y hasta la muerte en animales y humanos (Anchía *et al.*, 2021). Por ejemplo, el 83% de la población evaluada en labores agrícolas son intoxicadas y pueden desarrollar respuestas cancerígenas en pulmón y estómago. Esto, debido en su mayoría por el uso inadecuado de agroquímicos y la falta de equipos de protección personal (Ordoñez *et al.*, 2019). Así mismo, la contaminación agrícola es muy evidente en el ecosistema, se estima que el ambiente es rociado cada año a nivel global con 4,6 millones de toneladas de químicos y que el 24% del suelo irrigado en el mundo está afectado por la salinización. Adicionalmente, el contaminante químico más común en los acuíferos subterráneos son los nitratos procedentes de la actividad agrícola (FAO, 2021).

Para abordar estos desafíos, se han implementado alternativas de control biológico que resultan amigables con el medio ambiente. A nivel mundial, se desarrollan agentes de control biológico (ACB), que son organismos vivos como hongos, bacterias, virus e insectos que reducen la población de patógenos que afectan a los cultivos (Zelaya *et al.*, 2022). Estos microorganismos deben cumplir con ciertas características, como crecimiento rápido, capacidad de reproducción y supervivencia, adaptabilidad a la planta tratada y efectividad en el ambiente (Vázquez, 2019). Existen varios mecanismos eficaces de control biológico para prevenir el deterioro de las frutas

después de la cosecha. Estos incluyen la competencia por nutrientes y espacio, la producción de sustancias antimicrobianas (como los antibióticos), el parasitismo, la inducción de resistencia en los tejidos del huésped y, lo que es de particular interés en este estudio, la generación de compuestos volátiles con propiedades antifúngicas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2021).

Los compuestos volátiles orgánicos (COV's) son moléculas lipofílicas de bajo peso molecular que contienen carbono y pueden derivarse de diversas rutas metabólicas (Rojas *et al.*, 2022). Las bacterias producen este tipo de metabolitos secundarios y son liberados por algunas especies del género *Bacillus* como resultado de la oxidación de la glucosa, y actúan como intermediarios en sus procesos metabólicos, tanto primarios como secundarios (Suescún *et al.*, 2020). Los compuestos volátiles incluyen moléculas aromáticas, sulfuradas y nitrogenadas, así como hidrocarburos, cetonas, alcoholes, aldehídos, ésteres y éteres (Kai, 2020). Por ejemplo, la producción de ácido 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-butanodiol y ácido fórmico que, al dispersarse en el aire, inhiben el crecimiento de los organismos que causan daños a los cultivos después de la cosecha (García, Valdez y Vázquez, 2022). Por ello, este género bacteriano se considera un excelente biocontrolador, se lo encuentra, normalmente, en el suelo y en los campos agrícolas, y es una alternativa eficaz a los fungicidas químicos (Martínez, 2023).

En este contexto, este estudio evaluó la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y de *F. oxysporum* a través de los COVs producidos por bacterias del género *Bacillus* en frutos de uvilla en poscosecha. Además, se realizó la identificación molecular de las cepas aisladas para complementar la caracterización del agente biocontrolador.

2. Material y métodos:

2.1. Aislamientos bacterianos

Las bacterias se aislaron de suelos agrícolas ubicados en las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas (Ecuador). Se realizó un muestreo aleatorio que resultó en la obtención de ocho muestras de 0.5 Kg de suelo colocado en fundas herméticas e identificadas con los datos de origen de muestra, ubicación, fecha y hora de recolección, y fueron transportadas en refrigeración hasta el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 0.01% a

partir de 10 g de las muestras. Las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} se sometieron a baño maría a $87\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Posteriormente, a partir de estas, se inocularon 100 μl en la superficie de cajas Petri con Agar Nutritivo (AN) y se diseminó con ayuda de un asa de Digralsky. Las cajas fueron incubadas por 72 horas a $28 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ríos y Martínez, 2019; Mau y Vega, 2020). Se realsaron colonias que coincidieron con características morfológicas, tanto macro como microscópicas, de bacterias del género *Bacillus*.

2.2. Reactivación de cepas fúngicas

Las cepas de la colección del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se reactivaron, de acuerdo con el protocolo de Phoka *et al.* (2020). Se inocularon pedazos de micelio en el centro de placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) por duplicado y se incubaron durante siete días a $28 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se describieron macroscópicamente las colonias y microscópicamente las estructuras fúngicas, mediante tinción de azul de lactofenol (González *et al.*, 2023).

2.3. Caracterización molecular de cepas bacterianas

La extracción de DNA de las colonias seleccionadas se realizó con el kit *Wizard Genomic DNA Purification* de Promega (PROMEGA, 2023). La concentración y la pureza del ADN se evaluaron en el espectrofotómetro visible 7410 de Jenway (Jiménez *et al.*, 2023). Para la PCR, se emplearon los *primers* PA forward (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y PH reverse (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA) para amplificar la región 16S *rRNA*, en base al protocolo descrito por Barghouthi (2021). Se utilizó, el termociclador marca Labnet™ MultiGene™ OptiMax, el cual se programó con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de 30 segundos cada uno para desnaturalización a 94°C . El alineamiento a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos y seguido de una extensión final de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, en la electroforesis se utilizó el gel de agarosa de 1,5 % y se corrió durante 45 minutos a 90 voltios. Las amplicones se enviaron a MacroGen (Corea del Sur) para su secuenciación. Los resultados se editaron en el software MEGA 11 para su comparación en las bases de datos de genes del GenBank-(NCBI) y EZ Bio Cloud (Li *et al.*, 2023).

2.4. Ensayo de actividad antifúngica de compuestos orgánicos volátiles

El enfrentamiento entre bacteria y hongo se realizó bajo el sistema de placa invertida según el protocolo descrito por Dennis y Webster (1971). Para el inóculo bacteriano, se ajustó una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml bajo espectrofotometría a una longitud de onda de 625 nm. En cuanto a los hongos fitopatógenos, se emplearon discos de 5 mm con micelio de siete días de desarrollo en PDA (Fiallos, 2017), que se colocaron en el centro de una placa Petri de vidrio con PDA. En otra placa Petri con AN se colocó 100 μ l de la muestra bacteriana y se sembró en superficie por extensión. Las bases de las placas se unieron entre sí, de tal forma que, las bacterias queden por debajo de los hongos. Los extremos se sellaron con doble cinta de *Parafilm® M*, para evitar flujo accidental de aire (Figura 1).

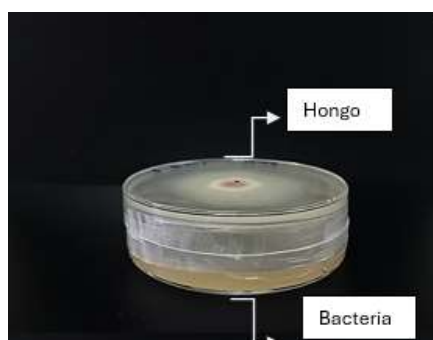


Figura 1. Sistema de doble placa o placa invertida.

Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete días. Además, se inocularon placas de PDA con los fitopatógenos para control. Cabe recalcar que, todos los tratamientos fueron evaluados por triplicado. Luego del periodo de incubación, se registró la actividad antifúngica mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento (PGI) en base a la siguiente fórmula desarrollada Skidmore y Dickinson (1976).

$$PGI = [C1 - C2 / C1] \times 100 \quad (1)$$

Donde *C1* corresponde al crecimiento radial del patógeno control y *C2* al crecimiento radial del patógeno en tratamiento.

El grado de inhibición se evaluó según la metodología de Herrera *et al.* (2023). En el que se describen cuatro criterios a evaluar. Negativo, el porcentaje es menor al 10% o el radio de la colonia tratamiento es igual a la del control. Bajo, el porcentaje se sitúa entre el 10 al 39% y que exista una disminución entre los crecimientos tratamientos. Medio, el porcentaje se encuentra

entre el 40 al 69% y que exista una disminución entre los crecimientos tratamientos y, finalmente, Positivo, donde el porcentaje varía entre el 70% y 100%.

2.5. Análisis estadístico

Los datos de PGI de la inhibición *in vitro* del ensayo antifúngico de los COV's producidos por el género *Bacillus* frente a *B. cinerea* y *F. oxysporum* fueron utilizados para realizar el análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó la prueba de Levene y Kolmogorov -Smirnov para comprobar los supuestos de homogeneidad y heterogeneidad, respectivamente. Además, se empleó la prueba *post hoc* de Tukey con un nivel de significancia de 95%. Todos los análisis se realizaron en el software IBM SPSS 29.

3. Resultados y discusión

3.1. Identificación de las cepas fúngicas y bacterianas.

La caracterización morfológica de los aislamientos correspondientes a las provincias de Pichincha y Santo Domingo presentaron resultados compatibles con bacterias del género *Bacillus*. Estas se destacaron por la presencia de colonias de 2 a 4 mm de diámetro con bordes irregulares, con una apariencia seca y aspecto liso. Microscópicamente, se identificaron bacilos Gram positivos con bordes redondeados en cadenas, con la presencia de esporas esféricas centrales, terminales o subterminal, características que coinciden con los reportado por Sosa *et al.* (2021), que identificó aislamientos de cepas de *Bacillus* spp. en suelo agrícola para la utilización de biocontroladores frente a *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Además, nos menciona que este género está distribuido ampliamente en ambientes naturales. En total, se identificaron cuatro posibles cepas que se codificaron como EDBS-02, EDB-09, EDB-08 y EDB-10. Por otra parte, en cuanto a la reactivación de las cepas fúngicas se identificaron colonias de *B. cinerea* y *F. oxysporum*. En el primer caso, se reportaron colonias color marrón a gris con presencia de esclerocios, mientras que, microscópicamente, se observaron hifas ramificadas septadas y con conidios de forma ovoidea, en arreglo botrioso en el extremo terminal (Figura 2) (Calvo *et al.*, 2019). En cuanto a *F. oxysporum*, se destacó el desarrollo de colonias color rosado-morado, con aspecto algodonoso. Microscópicamente se describieron hifas septadas y

producción de macroconidios largos, delgados y de forma cilíndrica (Figura 2) (Retana et al., 2020).

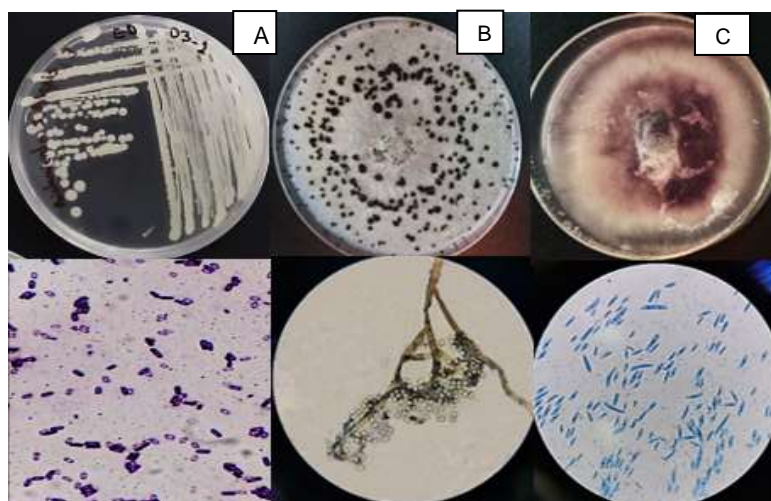


Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas evaluadas. A) *Bacillus* spp. B) *B. cinerea* y C) *F. oxysporum*.

3.2. Identificación molecular de *Bacillus* spp.

El ADN extraído de las cuatro cepas obtuvo concentraciones relativas entre 10 a 50 µg/ml. En cuanto a la PCR, se registró un amplicón de 1500 pb. Esto es resultado, de una amplificación exitosa del segmento de la región *16S rRNA*. Esto coincide con lo descrito por Smith y Jones (2021) dónde describen que, la utilización de la región sirve para la identificación de las bacterias del género *Bacillus*, debido a que tiene regiones altamente conservadas y permite realizar comparaciones con diferentes cepas para poder determinar las relaciones filogenéticas entre ellas. En cuanto a los resultados de secuenciación, se obtuvo que las cepas EDB-09, EDB-08 y EDB-10 coincidieron como *Bacillus* spp., excepto EDBS-02 que se identificó como *B. siamensis*. Esto resultó, luego de comparar en las bases de datos del *GenBank*-(NCBI) y el *EZ Bio Cloud* (Tabla 1). El reporte de Saldivia (2021) menciona que, en el suelo la mayor cantidad de bacterias que se presentan son de este género, debido a que es conocida por su adaptabilidad a condiciones extremas de estrés por cambios de temperaturas, diferentes rangos de pH y resistencia al choque térmico y osmótico. Asimismo, según la investigación de Liu *et al.* (2022) señala que, para lograr una identificación a nivel de especie, se recomienda amplificar los genes *gyrA* posición 43-1070 y gen *rpoB* posición 6-585, debido a que estos son genes que tienen una alta variabilidad y permite agrupar con mayor resolución filogenética que el *16S rRNA*.

Tabla 1. Codificación de las bacterias identificadas y accesos de la base de datos de *GenBank* (NCBI) y de *EZ Bio Cloud*

Código	Especie identificada	% cobertura	No. GenBank	No. EZ Bio Cloud
<i>EDB-02</i>	<i>Bacillus siamensis</i>	100%	KY622839.1	AJVF01000043
<i>EDB-08</i>	<i>Bacillus</i> sp.	100%	MN176475.1	AE016877
<i>EDB-09</i>	<i>Bacillus</i> sp.	100%	PP064926.1	AY603658
<i>EDB-10</i>	<i>Bacillus</i> sp.	100%	OR392983.1	LSAZ01000028

3.3. Ensayo de actividad antifúngica de compuestos orgánicos volátiles

Las cepas EDBS-02, EDB-08, EDB-09 y EDB-10 fueron ensayadas contra los patógenos de la uvilla *B. cinerea* y *F. oxysporum*, en cuanto a producción de COV's (Figura 3). Se registró un PGI del 100% ante *B. cinerea* por parte de las cepas EDB-09 y EDB-10, seguido de EDB-02 con un 92,59% y EDB-08 con 61,43%. Por otro lado, en el ensayo que utilizó la cepa de *F. oxysporum*, EDB-10 fue la que demostró mayor inhibición con un PGI del 67,33%, mientras que EDB-02 registró un 54,43%, seguido de EDB-09 y EDB-08 con 49,90% y 47,87%, respectivamente.

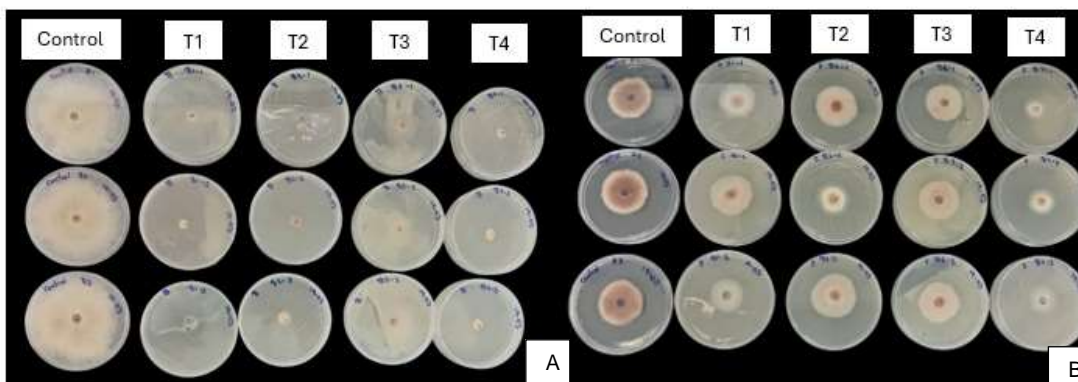


Figura 3. Evaluación de compuestos volátiles a los siete días. A: Tratamientos contra *B. cinerea*, B: Tratamientos contra *F. oxysporum*. Platos Control (fitopatógenos) y Tratamientos: T1(EDBS-02), T2(EDB-08), T3(EDB-09) y T4(EDB-10).

En cuanto a la escala propuesta por Herrera *et al.* (2023), en el caso de *B. cinerea* las cepas EDB-02, EDB-09 y EDB-10, entran en el criterio de evaluación Positiva y la cepa EDB-08 entra en el criterio de evaluación Media. Por otro lado, para *F. oxysporum*, todas las cepas se identificaron dentro de la categoría Media. En comparación a un estudio de Colombia donde se evaluó el mismo controlador, obtuvieron similares porcentajes, ninguno tuvo Negativo o Bajo

(Corrales, 2020). Por lo tanto, se puede afirmar que el porcentaje obtenido de los tratamientos tuvieron un alto índice de inhibición contra los fitopatógenos. Así mismo, los principales COV's que participan en su mayoría son de 3-metil, 1-butanol, 3-hidroxi, 2-butanona, 2,3-butanediol, ácido 2-metil propanoico, ácido nonanoico. Estos compuestos fueron identificados según Martínez (2023) utilizando la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a masas (SPME-GC-MS). Por ende, el mecanismo de acción a los fitopatógenos causa una inhibición a la germinación de esporas e hifas, por lo que altera su morfología y membrana haciendo que afecte a la fuerza protón motriz, y transporte de electrones de la mitocondria, impidiendo su expansión y colonización (Gómez, 2023). En lo que respecta a, los análisis estadísticos, no se realizó un ANOVA para los datos del ensayo que involucró la cepa de *B. cinerea*, debido a que, no se cumplieron con los supuestos ($p < 0.05$). Por lo contrario, los datos del enfrentamiento con *F. oxysporum*, sí fueron analizados y se registraron diferencias significativas entre los tratamientos, y se los verifica por los dos subgrupos homogéneos (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios de los subconjuntos homogéneos de la prueba de *Tukey*.

Tratamientos	Subconjunto 1	Subconjunto 2
EDB-08	2,6777 ^a	
EDB-09	2,6974 ^a	
EDB-02	2,7349 ^{ab}	2,7349 ^{ab}
EDB-10		2,8268 ^b
Sig.	,399	,106

Estos permiten afirmar que todas las cepas ensayadas, cuentan con alto potencial como productores de COV's y, por ende, controladores biológicos. A pesar de que, el tratamiento de *F. oxysporum*, fue menor en el porcentaje de inhiación que el de *B. cinerea*, sigue considerándose un resultado ventajoso al compararlo con los resultados descritos por Villalobos (2020), quien destaca el antagonismo por COV's de cepas de *Bacillus* sobre *Fusarium* spp. en caña de azúcar en México, donde obtuvo un porcentaje de inhibición de 27,8%. En cuanto a la evaluación de *B. cinerea*, Wang *et al.* (2023), evaluó una cepa de *B. siamensis* frente aislados de *B. cinerea* de arándanos en China expuestos en las mismas condiciones y técnicas. Como resultado, se

reportó un porcentaje de inhibición del 74,96% al 92,81%, por lo que es claro el potencial de *Bacillus* como productor de COV's. Estos resultados indican el uso potencial de estas bacterias para reducir las enfermedades de los fitopatógenos *in vivo* de las frutas en poscosecha. Las bacterias producen a gran escala metabolitos secundarios, facilitando a la adaptación de un entorno con estrés. Entre ellos tenemos a las moléculas de bajo peso molecular que normalmente se emiten en fase gaseosa, y se puede difundir a temperatura ambiental. Por lo tanto, limita la capacidad de colonización y la descomposición de los frutos. Por otra parte, la exposición de los COV's al fruto puede exponerse de manera directa o indirecta, dependiendo del patógeno, Asimismo, los COV's actúan con un sistema complejo de señales multitróficas, que hasta el día de hoy no está bien definido el mecanismo de interacción (Balaguera, 2021). Por lo tanto, existe un campo amplio de estudio sobre las ventajas de estos compuestos como biocontroladores de las enfermedades de las frutas en poscosecha. Los COVs pueden aumentar la resistencia a la pérdida de agua por transpiración, y aumentar la respuesta de defensa, por la activación del mecanismo de fortaleza de la pared celular elevando la producción de lignina y calosa, haciendo que sea más resistente a la penetración de fitopatógenos.

4. Conclusión

Todas las cepas identificadas pertenecen al género *Bacillus*, excepto EDBS-02 que se identificó a nivel de especie como *B. siamensis*. La evaluación *in vitro* de la acción de los compuestos orgánicos volátiles de *Bacillus* frente a los patógenos, mostró que todas las cepas evaluadas tienen capacidad inhibitoria contra *B. cinerea* y *F. oxysporum*. Por lo que, representa una alternativa para evitar pérdidas en poscosecha de cultivos afectados por dichos agentes. Se recomienda realizar un estudio que permita caracterizar bioquímicamente los componentes volátiles y realizar pruebas *in vitro* en frutos poscosecha para delimitar una estrategia de control biológico eficaz.

Agradecimientos

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento de esta investigación con los fondos asignados al proyecto "Diagnóstico de problemas fitosanitarios y agentes de control biológico asociados a uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador. Convocatoria FCEN-PUCE

2022-2023". A la Mtr. Jeniffer Yánez y al Microbiólogo Alexis Quintana por el acompañamiento durante la investigación.

Referencias

- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. (2020) Plaguicidas y fungicidas clasificación toxicas. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [en línea]. Disponible en <<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/inen2.pdf>>[consulta: 17 diciembre 2023].
- Anchía, G., Chaverri, S., Cordero, J. J. y Mora, I. (2021) Intoxicaciones agudas con pesticidas para fines suicidas en Costa Rica durante la década de 2010-2020. *Medicina Legal de Costa Rica* [en línea], 38(1), 131-145. Disponible en <https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152021000100131&script=sci_arttext>[consulta: 23 diciembre 2023].
- Balvočiūtė, M. y Huson, D. (2022) SILVA, RDP, Greengenes, ¿NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics* [en línea], 18(2), 114. Disponible en <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3501-4>> [consulta: 2 enero 2024].
- Balaguera, H. E. (2021). Comportamiento poscosecha del fruto de uchuva (*Physalis peruviana* L.): efecto del 1-metilciclopropeno y de la refrigeración (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia) [en línea], 12(2), 174. Disponible en <<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/53902/7187576.2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [consulta: 2 enero 2024].
- Barghouthi, S. (2021) A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian Journal of Microbiology* [en línea], 51(4), 430-444. Disponible en <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23024404/>>[consulta: 10 febrero 2024].
- Calvo, J. A., Rivera, G., Orozco, S. y Orozco, R. (2019) Aislamiento y evaluación in vitro de la antagonista de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía mesoamericana* [en línea], 23(2), 225-231. Disponible en <https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212012000200001&script=sci_arttext>[consulta: 19 abril 2024].
- Corrales, L. C. (2020). evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium spp.*, bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova* [en línea], 8(13). Disponible en <<https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/151/303>>[consulta: 19 abril 2024].
- Chelab, R. L. (2019) Extraction of gram negative and Gram-positive bacterial DNA using blood human DNA kit. *Journal of Physics: Conference Series* [en línea], 1294(6), 062018. Disponible en <<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/6/062018>>[consulta: 14 febrero 2024].
- Dávila, E., Houbraken, M., De Rop, J., Laing, G., Romero, O. y Spanoghe, P. (2021) Evaluación de la presión toxicológica y ecotoxicológica del uso de plaguicidas sintéticos en *Sancti Spiritus*, Cuba. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* [en línea], (2). Universidad de Cuba. Disponible en <https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1520>[consulta: 28 mayo 2024].
- Dennis, C. y Webster, J. (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* [en línea], 57(1), 41-84. Disponible en <[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5)>[consulta: 18 enero 2024].
- Fiallos, J. E. (2017) Determinación de la correlación entre métodos visuales, ópticos y difusión en placa en el crecimiento de *Escherichia coli*. [Tesis]. Universidad Técnica De Ambato [en línea], (1). Disponible en <<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26334/1/BQ%20135.pdf>> [consulta: 2 abril 2024].

- Galarza, C. A. R. (2021) Diseños de investigación experimental. *CienciAmérica: Revista de divulgación científica de la Universidad Tecnológica Indoamérica* [en línea], 10(1), 1-7. Disponible en <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7890336>>[consulta: 4 abril 2024].
- García, P., Valdez, D. y Vázquez, J. (2022) Control biológico de los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Fusarium* con *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* in vitro e in vivo en plantas de jitomate. [Tesis]. Universidad Jesuita de Guadalajara [en línea]. Disponible en <<https://hdl.handle.net/11117/8485>>[consulta 14 abril 2024].
- Gómez, C. I. (2023). Evaluación de la eficacia biológica de *Bacillus velezensis* 83 contra *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de tomate. [en línea]. Disponible en <<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3615/GOGCRL05.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>[consulta 14 abril 2024].
- González, Y., Ortega, J., Anducho, M. A. y Mercado, Y. (2023) *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [en línea], 25(1), 1-14. Disponible en <<https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2022/cqb221ae.pdf>>[consulta: 10 abril 2024].
- Herrera, R., de Von Chong, M. y Tuñón, J. (2023) Caracterización de hongos rizosféricos contra *Pyricularia oryzae* en arroz. *Revista científica Guacamaya* [en línea], 45(2), 100-110. Disponible en <<http://portal.amelica.org/ameli/journal/212/2123988007/html/>>[consulta: 12 abril 2024].
- Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Hernández, F. D., Rivas-Martínez, E. N., Ortega-Ortiz, H. y Dávila-Medina, M. D. (2023) Actividad inhibitoria de quitosano como alternativa orgánica para el control de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*. *Acta Agrícola y Pecuaria* [en línea], 9(1). Disponible en <<https://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/623>>[consulta: 11 abril 2024].
- Kai, M. (2020) Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. *Frontiers in Microbiology* [en línea], 11, 559. Disponible en <<http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00559>>[consulta: 4 febrero 2024].
- León, A. y Barriga, N. (2020) Memorias del 4to Simposio en Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno. *Archivos Académicos USFQ* [en línea], 11(1),107-107. Disponible en <<https://doi.org/10.18272/archivosacademicos.vi23.1652>>[consulta: 13 abril 2024].
- Li, W., Zhang, Y., Zhou, Z., Liu, M., Liang, L. y Xu, Y. (2023) Comparative genomics of environmental bacteria: insights into their metabolic diversity and ecological roles. *Microbiome* [en línea], 11(1), 1-17. Disponible en <<http://dx.doi.org/10.1038/s41522-023-00905-8>>[consulta: 13 abril 2024].
- Liu, Y., Štefanič, P., Miao, Y., Xue, Y., Xun, W., Zhang, N y Shen, Q. (2022). I. Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. *AMB Express* [en línea], 2(1), 133. Disponible en <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9606167/>>[consulta: 13 abril 2024].
- Martínez, J. R. (2023) Caracterización y evaluación de lipopéptidos y compuestos volátiles producidos por *Bacillus spp.* con actividad de biocontrol de hongos que afectan la calidad de frutos en poscosecha. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* [en línea], 13(14), 69-88. Disponible en <<https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/9532>>[consulta: 18 abril 2024].
- Mau, S. y Vega, K. (2020) Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Revista de Ciencias Ambientales* [en línea], 42(1), 45-52. 1). Disponible en <<http://dx.doi.org/10.15359/rca.42-2.4>>[consulta: 19 abril 2024].
- Méndez, J., Flores, M. y Páramo, L. (2019) Aislamiento E Identificación De *Bacillus subtilis* Y Evaluación Del Antagonismo In Vitro Frente Hongos Fitopatógenos. *Nexo Revista Científica* [en línea], 30(2), 96–110. Disponible en <<https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>>[consulta: 20 abril 2024].
- Ordoñez-Beltrán, V., Parra-Acosta, H., Frías-Moreno, M. N. y Martínez-Tapia, M. E. (2019) Estudio sobre el uso de plaguicidas y su posible relación con daños a la salud. *Revista de toxicología* [en línea], 36(2), 148-153. Disponible en <<http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2010.25050>>[consulta: 14 abril 2024].


- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021) Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Utilización sostenible y conservación de los agentes de control biológico microbianos y de los bioestimulantes [en línea]. Disponible en <<https://www.fao.org/3/ng832es/ng832es.pdf>>[consulta: 21 abril 2024].
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021) Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta [en línea]. Disponible en <<https://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/>>[consulta: 21 abril 2024].
- Pérez, J. (2020) Estrategias para la reactivación de bacterias dormantes (Tesis de maestría). Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo [en línea]. Disponible en <<https://tesis.usat.edu.pe/handle/20.500.12423/6322>>[consulta: 22 abril 2024].
- Phoka, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S.-I., Matsui, K., Arikit, S. y Sunpapao, A. (2020) Role of volatiles from the endophytic fungus *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 in biocontrol potential and in promoting the plant growth of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Fungi (Basel, Switzerland) [en línea], 6(4), 341 Disponible en <<https://doi.org/10.3390/jof6040341>>[consulta: 18 abril 2024].
- Promega, (2023) International Symposium on Human Identification (ISHI) Keynote Offers Message of Resilience for Forensics Professionals [en línea], 6(4) disponible en <https://worldwide.promega.com/es-es/global/discover-glo/> [10 de marzo 2024].
- Retana, K., Ramírez, J. A., Castro, O. y Blanco, M. (2020) Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía costarricense [en línea], 42(1), 115-126. Disponible en <<http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i1.32199>>[consulta: 4 abril 2024].
- Ríos, L. y Martínez, C. (2019) Análisis comparativo del impacto de la deforestación en la biodiversidad. Revista Científica de la Universidad Nacional Agraria [en línea], 33(2), 45-60. Disponible en <<https://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>>[consulta: 19 abril 2024].
- Rojas, E. O., Rúales, F. H., Perdomo, D. A. y Mora, J. P. J. (2022) Evaluación del método de extracción SPME-GC-MS para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en licor de cacao de Nariño-Colombia. Revista ION [en línea], 35(1), 103-116. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-100X2022000100103&script=sci_arttext>[consulta: 11 abril 2024].
- Saldivia Alvarez, M. J. (2021) Aislamiento, Caracterización e Identificación de *Bacillus* sp. asociados a la rizósfera de Gevuina avellana Mol. en la zona 3 Centro Sur de Chile (Doctoral dissertation). [en línea] disponible en <<http://eprints.uanl.mx/23549/1/1080177414.pdf>>[consulta: 22 abril 2024].
- Silva, A. (2020) 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 (Bachelor's thesis, PUCE) [en línea]. Disponible en <<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/14680>>[consulta: 22 abril 2024].
- Sinuco, D. C., Pérez, A. C. y Moreno, N. (2021) Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. Revista Colombiana de Biotecnología [en línea], 19(1), 63-70. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752017000100063&script=sci_arttext>[consulta: 22 abril 2024].
- Sosa, A. I., Pazos, V., Torres, D. y Casadesús, L. (2021). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* [en línea], 15(1), 39-44. Disponible en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1562-30092011000100006&script=sci_arttext&tlng=pt>[consulta: 12 abril 2024].
- Skidmore, A. M. y Dickinson, C. H. (1976) Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society [en línea], 66(1), 57-64. Disponible en <[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80092-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80092-7)>[consulta: 14 abril 2024].
- Smith, A. B. y Jones, C. D. (2021) Advances in PCR-based methods for bacterial identification. Journal of Microbiology [en línea], 45(3), 112-128. Disponible en <<http://doi.org/10.1234/jmicro.2021.56789>>[consulta: 14 abril 2024].

- Suescún, L., Suescún, L., Sanchez, E., Gómez, M., Garcia-Arias, F. L., & Zarantes, V. N. (2020) Producción de plantas genéticamente puras de uchuva. Bogota, Colombia: Editorial Kimpres Ltda [en línea], 69(1), 57-61. Disponible en. <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2057/110855_67729.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20uchuva%20en%20el%20mundo,-En%20Colombia%2C%20primer&text=Actualmente%20se%20cultivan%20tres%20tipos,m%C3%A1s%20apetecible%20en%20los%20mercados>[consulta: 4 abril 2024].
- United States Department of Agriculture. (2019) Full Report (All nutrients): 09138, Groundcherries, (cape gooseberries or poha), raw [en línea] disponible en <<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169949/nutrients>>[consulta: 19 abril 2024].
- Vázquez, G. (2019) Mejora de la eficacia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol en enfermedades de plantas hortícolas. Tesis (Doctoral), E.T.S.I. Agrónomos (UPM) [antigua denominación] [en línea] disponible en <<https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.22581>>[consulta: 18 abril 2024].
- Villalobos, S. M. C. (2020) Aislamiento y evaluación in vitro de organismos antagonistas para el control de *Fusarium spp*, agente causal de la marchitez y Pokkah boeng en caña de azúcar. Investigación Agrícola: Sistemas y Recursos Naturales [en línea], 21(1), 45-60. Disponible en <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2560/Hernandez_Villalobos_SM%20_MC_Fitopatologia_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>[consulta: 14 abril 2024].
- Wang, C., Duan, T., Shi, L., Zhang, X., Fan, W., Wang, M., Wang, J., Ren, L., Zhao, X. y Wang, Y. (2023) Characterization of volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* YJ15 and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease [en línea], 106(9), 2321–2329. Disponible en < <https://doi.org/10.1094/pdis-01-22-0230-re> >[consulta: 28 mayo 2024].
- Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., De los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Ruíz-Ramírez, S. y Rojas-Anaya, E. (2022) Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. Revista mexicana de ciencias agrícolas [en línea], 13(27), 69-79. Disponible en <https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342022000900069&script=sci_arttext>[consulta: 17 abril 2024].

Camila Domínguez

Firma de la estudiante

Emily Camila Domínguez Olmedo
Quito, 28 de junio de 2024



Firma del director/a de disertación

Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna
Quito, 28 de junio de 2024

Firma de la coordinadora de carrera

PhD. Diana Astorga García
Quito, 28 de junio de 2024