



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“OBTENCIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A BASE DE *Bacillus subtilis***  
**MEDIANTE FERMENTACIÓN LÍQUIDA SUMERGIDA**  
**UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN:**  
**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERA EN BIOTECONOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA:** MARIA ANTONIETA CHAVEZ PAREDES

**TUTOR:** Ing. BYRON LEONCIO DIAZ MONROY, PhD.

Riobamba - Ecuador

2018

© 2018, María Antonieta Chávez Paredes

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “OBTENCIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A BASE DE *Bacillus subtilis* MEDIANTE FERMENTACIÓN LIQUIDA SUMERGIDA UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES, de responsabilidad de la señorita María Antonieta Chávez Paredes, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**NOMBRE**

**FIRMA**

**FECHA**

Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy, PhD

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**TITULACIÓN**

Dra. Susana del Pilar Abdo López

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, María Antonieta Chávez Paredes soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

María Antonieta Chávez Paredes

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por enseñarme lo primordial de la vida y apoyarme en todo este trayecto.

A mis hermanos, por su amor y ayuda incondicional.

A mis cinco sobrinos, por ser mi inspiración y mis ganas de ser una mejor persona y profesional.

María Antonieta Chávez Paredes

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a la Virgen que me han guiado por caminos de sabiduría y fortaleza.

A mis padres, hermanos, sobrinos y cuñados, quienes son las personas fundamentales de mi vida, por haberme brindado su apoyo en todo lo que conlleva el proceso de titulación.

A mi padrino Rodrigo y Dani, por su apoyo incondicional durante mi vida estudiantil.

A mi tutor Dr. Byron Díaz, por ser una persona ejemplar y ayudarme con su tiempo y guía en la realización de esta investigación.

A los técnicos docentes de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que supieron ayudarme en diferentes procesos y uso de laboratorios.

A mi prima, amigos y compañeros que me han ayudado de una u otra manera en todo este largo camino.

María Antonieta Chávez Paredes

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1 Agroindustria.....	5
1.1.1 Industria de Alimentos.....	5
1.1.1.1 Residuos generados en la Agroindustria.....	6
1.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	10
1.2.1 Esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
1.2.1.1 Ciclo de esporulación.....	11
1.2.2 Compuestos producidos por <i>Bacillus subtilis</i> .....	12
1.2.2.1 Iturin.....	12
1.2.2.2 Surfactina.....	13
1.2.2.3 Fengicina.....	13
1.3 Fermentación Líquida Sumergida.....	13
1.4 <i>Raphanus sativus</i> .....	15
1.4.1 Marchitez de rábano por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	16
1.5 Biofungicidas.....	17
1.5.1 Mecanismos de control.....	17
1.5.1.1 Competencia directa.....	17
1.5.1.2 Antibiosis.....	17
1.5.1.3 Parasitismo.....	17
1.5.1.4 Resistencia inducida a la planta.....	18
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO.....	19

<b>2.1</b>	<b>Lugar del desarrollo de la investigación</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Hipótesis e identificación de variables</b> .....	19
<b>2.2.1</b>	<b>Variables</b> .....	19
<b>2.2.1.1</b>	<b>Variables dependientes</b> .....	19
<b>2.2.1.2</b>	<b>Variable independiente</b> .....	19
<b>2.2.2</b>	<b>Hipótesis</b> .....	20
<b>2.2.2.1</b>	<b>Hipótesis alterna</b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Tipo y Diseño de Investigación</b> .....	20
<b>2.3.1</b>	<b>Por el tipo de investigación</b> .....	20
<b>2.3.2</b>	<b>Por el diseño de investigación</b> .....	20
<b>2.3.2.1</b>	<b>Diseño experimental</b> .....	20
<b>2.3.2.2</b>	<b>Tipo de diseño</b> .....	21
<b>2.3.3</b>	<b>Unidad de análisis</b> .....	21
<b>2.3.4</b>	<b>Población de estudio</b> .....	21
<b>2.3.5</b>	<b>Tamaño de muestra</b> .....	22
<b>2.3.6</b>	<b>Selección de muestra</b> .....	22
<b>2.4</b>	<b>Procedimientos</b> .....	22
<b>2.4.1</b>	<b>Materiales, Equipos y Reactivos</b> .....	22
<b>2.4.2</b>	<b>Replicación de <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	23
<b>2.4.3</b>	<b>Replicación de <i>Fusarium oxysporum</i></b> .....	23
<b>2.4.4</b>	<b>Preparación de solución de esporas de <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	24
<b>2.4.5</b>	<b>Conteo de esporas de <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	24
<b>2.4.6</b>	<b>Preparación de la materia prima</b> .....	24
<b>2.4.7</b>	<b>Elaboración del medio de cultivo en fermentadores</b> .....	25
<b>2.4.8</b>	<b>Conteo de esporas en los medios fermentados</b> .....	25
<b>2.4.9</b>	<b>Control de calidad</b> .....	26
<b>2.4.9.1</b>	<b>Tinción Gram</b> .....	26
<b>2.4.10</b>	<b>Medición de parámetros físico-químicos del biofungicida</b> .....	26
<b>2.4.10.1</b>	<b>pH</b> .....	26



2.4.10.2	Densidad.....	26
2.4.10.3	Viscosidad .....	27
2.4.10.4	Sólidos totales .....	28
2.4.11	Evaluación de actividad antagonica .....	28
2.4.12	Porcentaje de Germinación.....	29
2.4.13	Preparación de solución de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	30
2.4.14	Inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en semillas.....	30
2.4.15	Aplicación del biofungicida .....	30
2.4.16	Evaluación de la incidencia y severidad.....	30
2.4.16.1	Incidencia .....	30
2.4.16.2	Severidad.....	31
2.4.17	Determinación del Costo.....	32
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	33
3.1	Materia Prima .....	33
3.2	Conteo de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
3.3	Evaluación de medios de cultivo .....	36
3.4	Conteo de esporas en los medios fermentados.....	37
3.5	Control de Calidad.....	39
3.6	Parámetros Físico-Químicos del Biofungicida.....	41
3.7	Conteo de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	47
3.8	Evaluación del antagonismo microbiano .....	47
3.9	Porcentaje de Germinación .....	48
3.10	Evaluación de la Incidencia y Severidad.....	49
3.10.1	Incidencia.....	50
3.10.2	Severidad.....	51
3.11	Determinación del Costo del Biofungicida.....	54
CONCLUSIONES .....		56
RECOMENDACIONES .....		57

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b> Composición de la Industria de alimentos .....	5
<b>Figura 1-2</b> Evolución y participación en el PIB Sector Industrias de alimentos y bebidas .....	6
<b>Figura 1-3</b> Elaboración de queso .....	7
<b>Figura 1-4</b> Elaboración de Mermelada.....	9
<b>Figura 1-5</b> Visualización microscópica de esporas de <i>B. subtilis</i> .....	11
<b>Figura 1-6</b> Ciclo de esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
<b>Figura 1-7</b> Compuestos producidos por <i>B. subtilis</i> : (a) Surfactina, (b) Iturin, (c) Fungicina.....	12
<b>Figura 1-8</b> Estructura de los homólogos de Iturin.....	12
<b>Figura 1-9</b> Estructura de Surfactina .....	13
<b>Figura 1-10</b> Estructura de Fengicina.....	13
<b>Figura 3-1</b> Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en Agar Nutriente .....	40
<b>Figura 3-2</b> Tinción Gram realizado a los medios fermentados .....	41
<b>Figura 3-3</b> Tratamiento vs Control.....	48
<b>Figura 3-4</b> Semillas de rábano para prueba de Germinación .....	49
<b>Figura 3-5</b> Plantas de rábano.....	50
<b>Figura 3-6</b> Rábanos A(Control), B(Tratamiento 1), C(Tratamiento 2), D(Tratamiento 3).....	51
<b>Figura 3-7</b> Hojas de rábano afectadas A(Control), B(Tratamiento 1), C(Tratamiento 2),.....	53
<b>Figura 3-8</b> Raíces de rábano A(Control), B(Tratamiento 1), C(Tratamiento 2), .....	54

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 3-1</b> Comparación de la cantidad de esporas.ml <sup>-1</sup> en 4 horas .....	38
<b>Gráfico 3-3</b> Recuento de esporas.ml <sup>-1</sup> de los tres biofungicidas vs control .....	42
<b>Gráfico 3-4</b> Resultado de pH finales en cada sustrato.....	43
<b>Gráfico 3-5</b> Densidades de los biofungicidas vs Control .....	44
<b>Gráfico 3-6</b> Densidades de los biofungicidas vs control.....	45
<b>Gráfico 3-7</b> Evaluación Antagónica.....	48

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b> Composición de Lactosuero.....	8
<b>Tabla 1-2</b> Requisitos de la mermelada de fruta.....	10
<b>Tabla 1-3</b> Composición por porción comestible de rábano.....	16
<b>Tabla 2-1</b> Diseño experimental .....	21
<b>Tabla 2-2</b> Componentes de los fermentadores .....	25
<b>Tabla 2-3</b> Escala ordinal de severidad de la enfermedad empleada para las pruebas de patogenicidad .....	31
<b>Tabla 3-1</b> Caracterización de residuos .....	33
<b>Tabla 3-2</b> Pesos de residuos .....	34
<b>Tabla 3-3</b> Pesos de residuos Tamiz 425 $\mu\text{m}$ .....	34
<b>Tabla 3-4</b> Pesos de residuos Tamiz 300 $\mu\text{m}$ – 38 $\mu\text{m}$ .....	35
<b>Tabla 3-5</b> Medición de pH .....	36
<b>Tabla 3-6</b> Componentes de los medios de cultivo.....	37
<b>Tabla 3-7</b> Número de esporas. $\text{ml}^{-1}$ de los tres sustratos en cuatro distintas horas .....	38
<b>Tabla 3-8</b> Número de esporas. $\text{ml}^{-1}$ .....	42
<b>Tabla 3-9</b> Datos de pH finales.....	43
<b>Tabla 3-10</b> Densidades de los tres biofungicidas y control.....	44
<b>Tabla 3-11</b> Viscosidades de los biofungicidas y Control .....	45
<b>Tabla 3-12</b> Parámetros finales del S3.....	46
<b>Tabla 3-13</b> Medición de sólidos totales.....	46
<b>Tabla 3-14</b> Porcentajes de Inhibición.....	47
<b>Tabla 3-15</b> Porcentajes de incidencia de marchitez en rábano.....	51
<b>Tabla 3-16</b> Número de hojas afectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	52
<b>Tabla 3-17</b> Porcentajes de severidad.....	52
<b>Tabla 3-18</b> Medición del tamaño de las raíces de rábano .....	53
<b>Tabla 3-19</b> Determinación del costo de producción del biofungicida a base de <i>Bacillus subtilis</i> .....	55

## INDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1-2</b> Conteo de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
<b>Ecuación 2-2</b> Conteo de esporas en los medios fermentados.....	26
<b>Ecuación 3-2</b> Densidad .....	27
<b>Ecuación 4-2</b> Viscosidad.....	27
<b>Ecuación 5-2</b> Sólidos totales .....	28
<b>Ecuación 6-2</b> Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial.....	29
<b>Ecuación 7-2</b> Porcentaje de Incidencia .....	30
<b>Ecuación 8-2</b> Porcentaje de Severidad.....	31

## **LISTADO DE ANEXOS**

**Anexo A.** ACTA DE ENTREGA DE *Bacillus subtilis*

**Anexo B.** ACTA DE ENTREGA DE *Fusarium Oxysporum*

**Anexo C.** EXAMEN BROMATOLÓGICO DE SUERO LACTEO

**Anexo D.** EXAMEN BROMATOLÓGICO DE RESIDUOS DE MERMELADA

**Anexo E.** HOJA DE CERTIFICACIÓN DE POTATO DEXTROSA AGAR

**Anexo F.** HOJA DE CERTIFICACIÓN DE NUTRIENT AGAR

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ESPOCH</b>	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
<b>S1</b>	Sustrato 1
<b>S2</b>	Sustrato 2
<b>S3</b>	Sustrato 3
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de amonio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio monobásico
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>°C</b>	Grados celsius
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>g</b>	Gramo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>L</b>	Litro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>m</b>	Metro
<b>s</b>	Segundo
<b>f</b>	Densidad
<b>μ</b>	Viscosidad
<b>ST</b>	Sólidos totales
<b>SST</b>	Sólidos suspendidos totales
<b>PICR</b>	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar



## RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue producir mediante fermentación líquida sumergida un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* utilizando residuos agroindustriales como suero de leche y residuos de mermelada, para posteriormente ser aplicado y evaluado en plantas de rábano (*Raphanus sativus*) infestadas con *Fusarium oxysporum*, por medio de la incidencia y severidad de la enfermedad. La fermentación se realizó a 220rpm, a 37 °C durante 24 horas. Se identificó el medio tres (S3) compuesto por 300 g.L<sup>-1</sup> y 150 g.L<sup>-1</sup> de suero de queso y residuos de mermelada respectivamente como el mejor biofungicida basado en el recuento de esporas.ml<sup>-1</sup>, un pH óptimo para el crecimiento de *Bacillus subtilis*, así como densidad y viscosidad de la solución. El biofungicida fue aplicado a cuarenta plantas distribuidas como Control, Tratamiento 1, Tratamiento 2 y Tratamiento 3, con 10 plantas cada uno, en donde el Tratamiento 2 presentó el menor porcentaje de incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*, al igual que el menor número de hojas enfermas y un buen tamaño de la raíz. Con el análisis del Costo se determinó que la producción del biofungicida fue viable y económicamente rentable, debido a que existió una diferencia a favor de \$7,07 con respecto a un biofungicida comercial. Se recomienda la producción de este tipo de biofungicida a mayor escala, conseguir un registro comercial y por ende su distribución en el mercado agrícola

## PALABRAS CLAVES

<TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOTECNOLOGÍA>, <BIOFUNGICIDA>, <BACTERIA (*Bacillus Subtilis*)>, <FERMENTACIÓN LÍQUIDA SUMERGIDA>, <RESIDUOS AGROINDUSTRIALES>, <HONGO (*Fusarium oxysporum*)>, <RÁBANO / *Raphanus sativus*>

## ABSTRACT

The following investigation's objective was to produce a biofungicide based on *Bacillus subtilis* using agribusiness residues such as buttermilk and marmalade residues by means of submerged liquid fermentation, to be subsequently applied and evaluated in radish (*Raphanus sativus*) plants infested with *Fusarium oxysporum*, through the incidence and severity of the disease. The fermentation was carried out at 220rpm, at 37 ° C for 24 hours. The medium three (S3) composed of 300 g.L<sup>-1</sup> and 150 g.L<sup>-1</sup> and of cheese whey and marmalade residues respectively were identified as the best biofungicide based on the spore count.ml<sup>-1</sup>, an optimum pH for the growth of *Bacillus subtilis*, as well as density and viscosity of the solution. The biofungicide was applied to forty plants distributed as Control, Treatment 1, Treatment 2 and Treatment 3, with 10 plants each one, where Treatment 2 had the lowest percentage of incidence of the disease caused by *Fusarium oxysporum*, as well as the lowest number of diseased leaves and a good size of the root. With the cost analysis, it was determined that the production of the biofungicide was viable and economically profitable, because there was a difference in favor of \$ 7,07 with respect to a commercial biofungicide. It is recommended the production of this type of biofungicide on a larger scale; obtain a commercial registration and therefore its distribution in the agricultural market.

## KEYWORDS

<TECHNOLOGY AND SCIENCE OF ENGINEERING>, <BIOTECHNOLOGY>, <BIOFUNGICIDE>, <BACTERIA (*Bacillus Subtilis*)>, <FERMENTATION LIQUID SUBMERGED>, <AGROINDUSTRIAL RESIDUES>, <HONGO (*Fusarium oxysporum*)>, <RABANO / *Raphanus sativus*>

## INTRODUCCIÓN

### Identificación del problema

De acuerdo a las estadísticas del Centro de Industria Láctea, de la leche destinada a la industria, el 31% se usa para la elaboración de quesos, el 27% para procesar leche en funda, el 20% para transformar leche en cartón, el 11% para producir leche en polvo, el 10% para elaborar yogurt y el 1% para otro tipo de lácteos. (CIL citado en Edison and Katherine, 2014, pp. 7)

Con 10 L de leche se puede obtener de 1 a 2 Kg de queso, generando alrededor de 8 a 9 Kg de lactosuero, lo cual representa un 85 a 90% del volumen de la leche, es decir el volumen de lactosuero es mayor de 7 a 10 veces que el queso producido. (LIU *et al.*, 2005 citado en Cury *et al.*, 2017, p. 124)

Según el Banco Central del Ecuador, la producción y ventas de la industria de mermeladas y dulces generan 2,8% participación en total de la producción en dólares, y son responsables de generar 12 ton/año de residuos. (FLACSO-MIPRO, 2011, pp. 10)

De acuerdo al reporte estadístico del Sector Agropecuario (INEC, 2017, pp. 21), Chimborazo participa con un 16,86 % de la superficie sembrada total 2017, en donde destaca la producción de cultivos permanentes como tomate de árbol y banano, y también cultivos transitorios como son: papa, brócoli, rábano y cebolla blanca.

El cultivo de rábano es muy importante para la alimentación, debido a su aporte nutricional en vitaminas, potasio, yodo, calcio y fósforo, y en el sector económico de la agricultura es rentable en cuanto a su siembra y cosecha. (Paredes, 2014)

En la actualidad gran variedad de patógenos atacan a los cultivos, produciendo enfermedades, como; marchitez y muerte del cultivo, como es el caso de *Fusarium oxysporum* en rábano, en

donde se puede observar amarillamiento unilateral de las hojas, decoloración de los tejidos vasculares y corticales y pudrición de las raíces, hasta la muerte del cultivo. (Toit, 2003, pp. 1–3)

Las enfermedades se presentan con mayor frecuencia en suelos ácidos, mal drenados y de textura liviana, las plantas infestadas por estos hongos sirven como principal fuente de inóculo, al quedarse en el suelo, debido a que el patógeno se mantiene como clamidosporas. (Tamayo and Jaramillo, 2013, pp. 50)

La primera alternativa para combatir las enfermedades de cultivos son los fungicidas, herbicidas o insecticidas de tipo químico, lo cual genera contaminación al medio ambiente por su capacidad de infiltración en el suelo y volatilidad, además suelen ser tóxicos para los seres humanos. (GrupoSacsá, 2015)

## JUSTIFICACIÓN

El manejo de los residuos ya sean sólidos, líquidos o semilíquidos es responsabilidad de cada empresa que los genera, darle un uso agregado a ellos conlleva una alternativa para sustituir los químicos por biofungicidas.

Por otro lado los fungicidas son la herramienta fundamental para la mayoría de los agricultores en el Ecuador, debido a que sin ellos sufren graves pérdidas en el rendimiento y desarrollo de los cultivos por ataque de hongos fitopatógenos.

Con el objetivo de satisfacer las necesidades del sector productivo agrícola es necesaria la implementación de soluciones para ayudar al agricultor a incorporar ideas sobre un enfoque de la agricultura más ligada al medio ambiente y más sensible socialmente que le permita una mejor producción y sostenibilidad ecológica.

En la agricultura ecológicamente sostenible, los bioformulados a base de células vivas, representan la alternativa más factible, debido a que no producen efectos secundarios para el ambiente, no cambian la fertilidad del suelo o alteran la biodiversidad del mismo y el costo de su producción es bajo.

En esta investigación se determinó la eficiencia que tienen los residuos agroindustriales líquidos o semilíquidos como sustituyentes de las materias primas de sustratos para la producción de biomasa a partir de *Bacillus subtilis*, por medio de fermentación líquida, optimizando las condiciones fisicoquímicas y biológicas como temperatura, fuente nutricional y agitación, para obtener un biofungicida de bajo costo y estable en un tiempo de vida útil, con aplicabilidad en cultivos de rábano.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Obtener un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* mediante fermentación líquida sumergida utilizando residuos agroindustriales.

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar tres diferentes medios de cultivo con adición de residuos agroindustriales, para *Bacillus subtilis* mediante fermentación líquida sumergida.
- Determinar el efecto *in vitro* e *in situ* de crudos bacterianos de *Bacillus subtilis* contra el marchitamiento por *Fusarium oxysporum* en rábano.
- Producir, formular y evaluar un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* para el marchitamiento por *Fusarium oxysporum* en *Raphanus sativus*.
- Determinar los costos y beneficios de esta tecnología.

# CAPÍTULO I

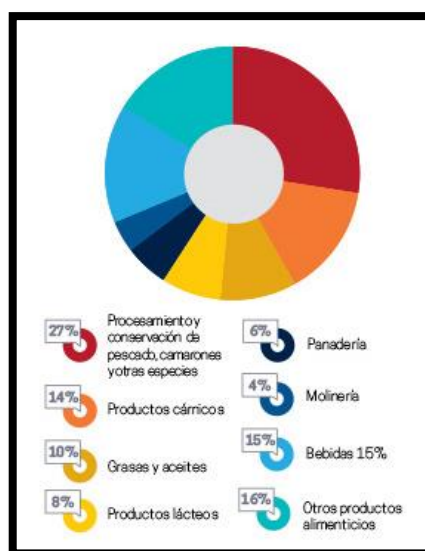
## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1 Agroindustria

La agroindustria es definida como una actividad económica que conlleva procesos productivos agrícolas e industriales, con el fin de generar alimentos o materias primas semielaboradas, direccionadas al mercado. (Cury *et al.*, 2017, p. 123)

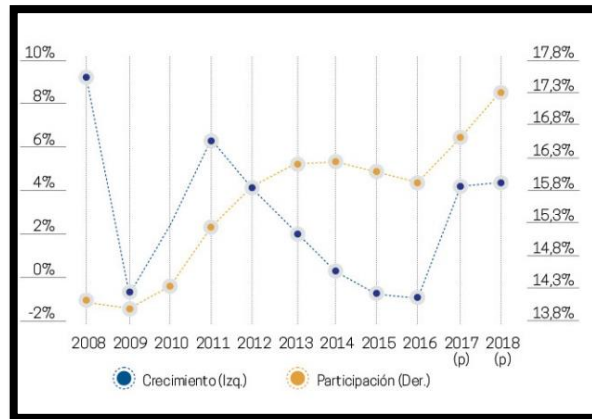
#### 1.1.1 Industria de Alimentos

La industria de alimentos tiene una particular relevancia en la producción y crecimiento económico Nacional, debido a que el consumo de alimentos es de carácter masivo y el incremento de población, genera un incremento también en dicho consumo. (Carrillo, 2009, p. 2)



**Figura 1-1** Composición de la Industria de alimentos

**Fuente:** (CFN, 2017 citado en EKOS 2018, p. 42)



**Figura 1-2** Evolución y participación en el PIB Sector Industrias de alimentos y bebidas

Fuente: (CFN, 2017 citado en EKOS 2018, p. 42)

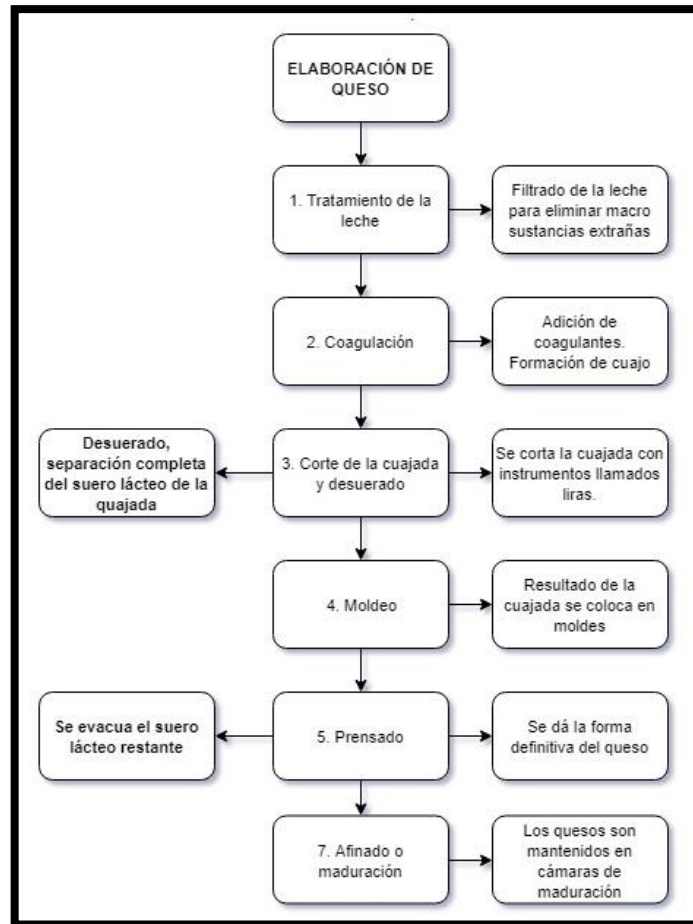
### 1.1.1.1 Residuos generados en la Agroindustria

Residuo es un término usado básicamente para identificar aquellos restos y sobrantes que dejan los seres humanos después de haber consumido cualquier sustancia u objeto. (NTP-1.054, 2015, p. 2)

- **Lactosuero**

El lactosuero se obtiene dentro de la elaboración del queso, como tercer paso que tiene el corte de la cuajada y desuerado, en donde se realiza el corte mediante instrumentos llamados liras que se caracterizan por tener una serie de hilos tensos y paralelos. Como resultado de este corte se genera un drenaje inicial del suero lácteo, posteriormente se agita y eleva la temperatura para continuar con la elaboración del queso, este paso favorece a la expulsión del suero, generándose finalmente el desuerado, que es la separación del suero con la cuajada. En el prensado también se obtiene suero lácteo, debido a la presión ejercida sobre los granos de la cuajada. (Juárez *et al.*, 2011, p. 8)





**Figura 1-3** Elaboración de queso

Fuente: (Juárez *et al.*, 2011, p. 8)

Residuo de queso o también denominado Lactosuero, es un líquido translúcido verde, resultado de la precipitación de la caseína en el proceso de obtención de queso con un pH aproximado de 6,5, éste contiene abundantes nutrientes como son: lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales, cuenta también con proteínas del grupo B y ácido ascórbico. (Parra, 2009, p. 4968)

Con 10 L de leche se puede obtener de 1 a 2 Kg de queso, generando alrededor de 8 a 9 Kg de lactosuero, lo cual representa un 85 a 90% del volumen de la leche, es decir el volumen de lactosuero es mayor de 7 a 10 veces que el queso producido. (LIU *et al.*, 2005 citado en Cury *et al.*, 2017, p. 124)

**Tabla 1-1** Composición de Lactosuero

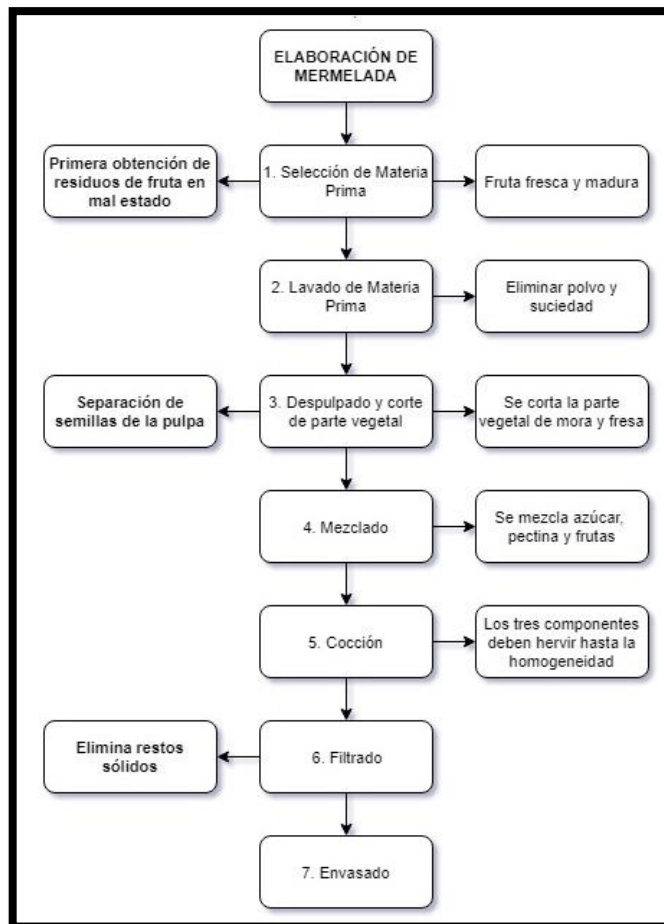
<b>Componente</b>	<b>Lactosuero (g.l<sup>-1</sup>)</b>
Sólidos totales	63,0 – 70,0
Lactosa	44,0 – 46,0
Proteína	6,0 – 8,0
Calcio	1,2 – 1,6
Fosfatos	2,0 – 4,5
Lactato	6,4
Cloruros	1,1

**Fuente:** (Parra, 2009, p. 4968)

**Realizado por:** CHAVEZ María, 2018

- **Residuos de Mermelada**

Los residuos de mermelada se obtienen dentro de la elaboración, en tres pasas diferentes pasos, primeramente en la selección de materia prima, debido a que solo las frutas frescas y maduras son óptimas para la elaboración de mermelada, el mayor porcentaje de residuo se obtiene en el despulpado, ya que es la separación de semillas y pulpa, pero al realizar este paso se realiza también un filtrado en donde no solo las semillas se depositan como residual, finalmente se obtiene una parte de residuo cocinado al ser filtrado, para la eliminación de cualquier parte sólida tanto de la fruta como impurezas del azúcar utilizado. (Urbano, Ahumada and Córdoba, 2012, p. 7)



**Figura 1-4** Elaboración de Mermelada

Fuente: (Urbano, Ahumada and Córdoba, 2012, p. 7)

Según el Banco Central del Ecuador, la producción y ventas de la industria de mermeladas y dulces generan 2,8% participación en total de la producción en dólares, y son responsables de generar 12 ton.año<sup>-1</sup> de residuos. (FLACSO-MIPRO, 2011, pp. 10)

Los residuos sólidos que genera la elaboración de mermeladas son principalmente residuos orgánicos, como resultado del tamizaje, los mismos que según de su composición son dirigidos a disposiciones finales distintas.

**Tabla 1-2** Requisitos de la mermelada de fruta

CARACTERISTICAS	UNIDAD	MIN.	MAX.
Sólidos solubles (a 20 °C)	% m/m	65	-
pH		2,8	3,5
<u>Acido</u> ascórbico	mg/kg	-	500
Dióxido de azufre	mg/kg	-	100
Benzoato sódico, <u>sorbato</u> potásico, solo o combinados	mg/kg	-	1000
Mohos	% campos positivos	-	30
Cenizas	% m/m	-	**

Fuente: (NTE, 2012, p. 4)

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

## 1.2 *Bacillus subtilis*

Son bacilos Gram positivos con un diámetro menor a 0,9 micras, capaces de producir endoesporas esféricas, termorresistentes y de fácil adaptabilidad a condiciones adversas. (Realpe, Hernández and Agudelo, 2002, p. 108)

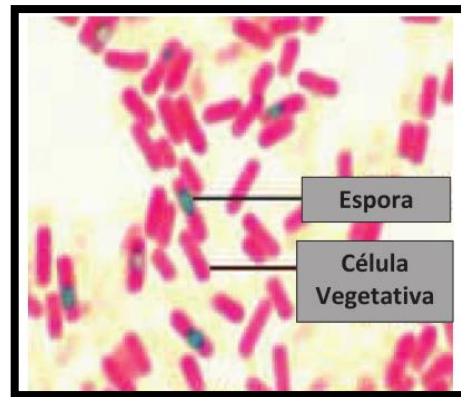
Son aerobios o anaerobios facultativos. Crecen entre los 10-48 °C, sin embargo, la temperatura óptima es entre 28-35 °C. Son bacterias ubiquitarias, encontrándose en agua, suelo, sedimentos acuáticos, aires, residuos vegetales, y en el tracto digestivo de animales y personas. Generalmente están presentes en el suelo y en la descomposición de residuos vegetales. Sus colonias son pequeñas o medianas de color marrón o varias veces de color verde, tienen una forma irregular, pero bordes ondulados. (Castro, 2010, p. 9)

Se caracterizan por generar enzimas hidrofílicas extracelulares, con las cuales tienen la capacidad de descomponer polisacáridos y ácidos nucleicos para utilizarlos como fuente de carbono y electrones. (Cuervo, 2010, p. 15)

Producen compuestos como: auxinas, citosinas y ácidos, estos tipos de compuestos son necesarios para el correcto crecimiento de las plantas. Son capaces de solubilizar nutrientes que reducen Fe (III) a Fe (II). Los principales antibióticos que produce son de tipo lipopetídicos como son: Iturin, Surfactina y Fengicina. (Cuervo, 2010, p. 15)

### 1.2.1 Esporulaci3n de *Bacillus subtilis*

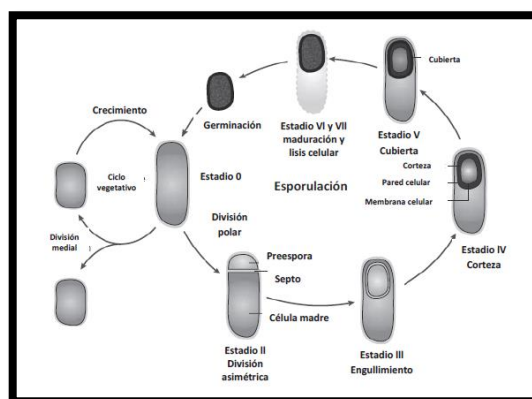
Las endosporas son conocidas como c3lulas especializadas producidas por *Bacillus subtilis* al verse envuelto en situaciones de tensi3n ambiental, como son: falta de nutrientes, presencia de luz UV, altas temperaturas. Tienen la capacidad de activarse con calor e iniciar su germinaci3n. (Monta1ez y Castro, 2006)



**Figura 1-5** Visualizaci3n microsc3pica de esporas de *B. subtilis*  
Fuente: (Chamberlain, 2010 citado en Ramos, 2014, p. 21)

#### 1.2.1.1 Ciclo de esporulaci3n

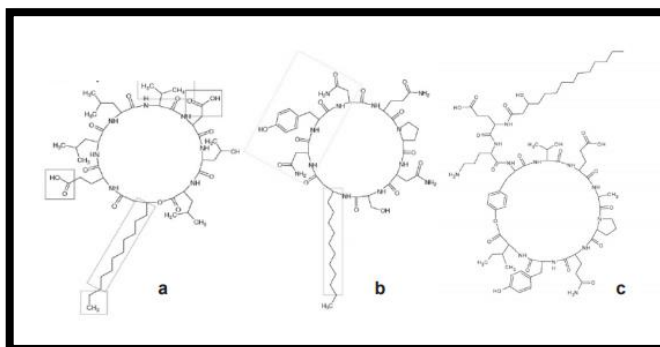
El proceso de esporulaci3n est3 conformado por siete estadios. El estadio cero inicia con la respuesta al agotamiento de nutrientes, seguido del estadio II en donde se producen enzimas hidrol3ticas, con un septo en un polo de la c3lula como resultado. En el estadio III se produce el engullimiento de la preespora y finalmente en el Estadio IV al VII, se forma la corteza y la cubierta y se produce la maduraci3n de la espora y la lisis celular. (Errintong, 2003 citado en Ramos, 2014, p. 22)



**Figura 1-6** Ciclo de esporulaci3n de *Bacillus subtilis*  
Fuente: (Errintong, 2003 citado en Ramos, 2014, p. 23)

## 1.2.2 Compuestos producidos por *Bacillus subtilis*

Los principales antibióticos que produce son de tipo lipopéptidicos como son: Iturin, Surfactina y Fengicina. (Ramos, 2014, p. 24)

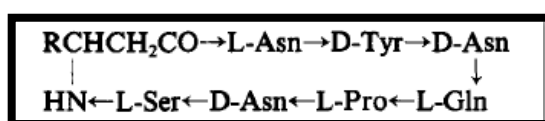


**Figura 1-7** Compuestos producidos por *B. subtilis*:  
(a) Surfactina, (b) Iturin, (c) Fengicina  
**Fuente:** (Ramos, 2014, p. 24)

### 1.2.2.1 Iturin

Las proteínas más importantes secretadas por *Bacillus subtilis* corresponden a la familia Iturinas, debido a sus propiedades antifúngicas, debido a que actúa sobre la pared de los hongos e induce una resistencia sistemática natural de la planta contra el patógeno de origen bacteriano y fúngico, esta propiedad se denomina Resistencia Sistémica Adquirida. (Gonzales y Fragozo 2002 citado en Cuervo, 2010, p. 25)

La Iturin A es un antibiótico lipopeptídico antifúngico, producido por *Bacillus subtilis*, con cadenas de 13 a 15 carbonos, unidos a un  $\beta$ -aminoácido y diferenciados por la secuencia y orden de aminoácidos. Tiene fuertes propiedades de biocontrol, debido a que puede inhibir el crecimiento de patógenos en plantas. Las iturinas atacan a las membranas fúngicas y crean canales de transmembranas, estos canales permiten la liberación de iones vitales para los hongos, lo que evita el crecimiento fúngico. (Ragazzo *et al.*, 2011, p. 9)



**Figura 1-8** Estructura de los homólogos de Iturin  
**Fuente:** (Ohno, Ano y Shoda, 1993, p. 23)

### 1.2.2.2 Surfactina

La Surfactina consta de heptapéptidos que contienen un ácido graso  $\beta$ -hidroxi, con una cantidad de átomos de carbono en el rango de 13 a 15, presenta características antivirales y, aunque son ligeramente antifúngicos, muestran una fuerte acción sinérgica en combinación con Iturin A. (Romero *et al.*, 2007, p. 431)

Las propiedades como baja toxicidad y alta biodegradabilidad convierte a las surfactinas como posibles sustitutos para agentes tensioactivos, debido a que son capaces de disminuir la tensión superficial. (Ariza and Sánchez, 2012, p. 153)

Surfactina: FA- $\beta$ -OH-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu

**Figura 1-9** Estructura de Surfactina

Fuente: (Ariza and Sánchez, 2012, p. 150)

### 1.2.2.3 Fengicina

Las fengicinas son decapeptidos bioactivos con un ácido graso  $\beta$ -hidroxi, presentan actividad antifúngica principalmente frente a los hongos filamentosos. (Romero *et al.*, 2007, p. 431)

Fengicina: FA- $\beta$ -OH -L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D- $\alpha$ Thr-L-Glu-D-[A6]-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile  
A6 = Ala/Val

**Figura 1-10** Estructura de Fengicina

Fuente: (Ariza and Sánchez, 2012, p. 150)

## 1.3 Fermentación Líquida Sumergida

La fermentación líquida sumergida o también denominada solo fermentación líquida es aquella en donde existe concentraciones similares de sustrato sólido y sustrato líquido en el proceso, de tal manera se dice que existe una solución. (Rodríguez *et al.* 2006 citado en Suárez, 2012, p. 7)

Este tipo de fermentación sumergida representa el método más económico para la producción a pequeña o gran escala de agentes biocontroladores y obtención de metabolitos secundarios de los microorganismos. (Fazenda *et al.*, 2008, p. 11)

La fermentación líquida o sumergida es conocida también como un cultivo de células microbianas, dispersas en un medio líquido con presencia de sustratos sólidos dentro de un recipiente con constante agitación, el mismo que no necesariamente necesita ser aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación más utilizada dentro de los laboratorios es el matraz agitado, de esta manera ha favorecido el crecimiento de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas. (Díaz, 2009, p. 13)

Los microorganismos crecen de forma típica, inicialmente se genera la fase de latencia o acoplamiento, en donde el microorganismo empieza a adaptarse al medio en donde se encuentra, luego viene la fase de crecimiento, en donde los sustratos líquidos y sólidos actúan como nutrientes para el desarrollo óptimo, posteriormente entran a la fase estacionaria, disminuyendo su crecimiento debido a que los nutrientes empiezan a limitarse, finalmente se da la fase de muerte. (Crueger 1993 citado en Suárez, 2012, p. 7)

Este tipo de fermentación necesita principalmente de fuentes de carbono y nitrógeno orgánico, para el crecimiento de microorganismos, la glucosa y el extracto de levadura son complementos necesarios para iniciar con la fermentación en estado líquido. (Feng, Li *et al.* 2010 citado en Suárez, 2012, p. 8)

La fermentación líquida sumergida utiliza líquidos que fluyan libremente, como la melaza y caldos. Los compuestos bioactivos se secretan en el caldo de fermentación. Algunos sustratos comunes usados en la fermentación sumergida son azúcares solubles, melaza, medios líquidos, jugos de frutas y vegetales, y también aguas residuales. (Ravichandran, 2017, p. 480)

Los principales parámetros físicos y químicos que deben ser controlados dentro de la fermentación sumergida son: Temperatura, agitación, pH, fuente de carbono, fuente de nitrógeno



y la composición del medio, siendo esta última muy necesaria a la hora de seleccionar los metabolitos que se desea obtener. (Fazenda *et al.*, 2008, p. 66)

#### **1.4 *Raphanus sativus***

Los rábanos se cultivan por su raíz, que generalmente se come cruda, sola o en ensaladas. Las hojas también se pueden comer, especialmente cuando son jóvenes y tiernas. “Pueden crecer en sombra parcial, requieren muy poco espacio, y maduran rápidamente, pero necesitan tierra suelta y un buen drenaje para poder expandir sus raíces fácilmente”. (Masabni, 2013, p. 2)

De acuerdo al reporte estadístico del Sector Agropecuario (INEC, 2017, pp. 21), Chimborazo participa con un 16,86 % de la superficie sembrada total 2017, en donde destaca la producción de cultivos permanentes como tomate de árbol y banano, y también cultivos transitorios como son: papa, brócoli, rábano y cebolla blanca.

El cultivo de rábano es muy importante para la alimentación, debido a su aporte nutricional en vitaminas, potasio, yodo, calcio y fósforo, y en el sector económico de la agricultura es rentable en cuanto a su siembra y cosecha. (Paredes, 2014)

**Tabla 1-3** Composición por porción comestible de rábano

Componente	Por 100 g de porción comestible
Agua (g)	95,3
Energía (kcal)	14
Proteína (g)	1
Hidratos de carbono (g)	2,7
Fibra (g)	1
Ca (mg)	34
Fe (mg)	1,3
I (µg)	16
Mg (mg)	11
Zn (mg)	0,13
Na (mg)	59
K (mg)	240
Fósforo (mg)	31
Selenio (µg)	2
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,02
Equivalentes de niacina (mg)	0,4
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	0,1
Fosfato (µg)	24
Vitamina C (mg)	20

Fuente: (Moreiras *et al.*, 2014, p. 47)

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

#### **1.4.1 Marchitez de rábano por *Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum f.sp. raphani* antes *Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans*, ataca a diversas plantas de la familia de *Brassicaceae* como son repollo, brócoli, nabo, colza, rábano y berro. (Arbeláez, 2000, pp. 13)

Marchitez de rábano por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum f.sp. raphani*, es una de las principales enfermedades de plantas transmitidas por el suelo. El patógeno sobrevive en el suelo como clamidosporas, las mismas que germinan en las proximidades de las raíces de las plantas e infectan a la planta huésped. (Toyota *et al.*, 1994, p. 373)

## **1.5 Biofungicidas**

Un biofungicida o también conocido como fungicida biológico está compuesto de microorganismos beneficiosos como hongos y bacterias especializadas, que atacan y controlan el crecimiento y enfermedades generadas por patógenos en plantas. (Hattori, 2002, p. 47)

### **1.5.1 Mecanismos de control**

Existen cuatro diferentes mecanismos por los cuales un biofungicida logra controlar el crecimiento de microorganismos patógenos, son:

#### **1.5.1.1 Competencia directa**

Es una competencia entre los microorganismos de un biofungicida con los microorganismos que están en la planta, su competencia principal es por nutrientes y espacio. Los biofungicidas crean una barrera alrededor de las raíces para evitar que los hongos patógenos ataquen la raíz. (Thomas, 2009, p. 1)

#### **1.5.1.2 Antibiosis**

Los hongos o bacterias que son el componente activo de un biofungicida son capaces de producir compuestos o moléculas que actúan como un antibiótico o toxina que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos, ingresando de manera directa a las paredes. (Thomas, 2009, p. 1)

#### **1.5.1.3 Parasitismo**

Es la capacidad de atacar a los patógenos y alimentarse de ellos, o el agente control produce algún tipo de toxina que mata al organismo objetivo y luego se alimenta del microorganismo muerto. Para que este mecanismo sea efectivo, el biofungicida debe estar presente en la rizosfera al mismo tiempo o antes de que aparezca el patógeno. (Thomas, 2009, p. 1)

#### **1.5.1.4 Resistencia inducida a la planta**

El biofungicida genera que la planta active sus propios mecanismos de defensa frente a patógenos. Las plantas tienen sistemas fisiológicos y bioquímicos que actúan para inhibir la infección y la propagación del patógeno que les está atacando. (Thomas, 2009, p. 1)

## **CAPÍTULO II.**

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1 Lugar del desarrollo de la investigación**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, dentro del laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal (LABIMA) de la Facultad de Ciencias Pecuarias y el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias.

#### **2.2 Hipótesis e identificación de variables**

##### **2.2.1 Variables**

###### **2.2.1.1 Variables dependientes**

- pH
- Densidad
- Viscosidad
- Crecimiento microbiano

###### **2.2.1.2 Variable independiente**

- Biofungida a base de *Bacillus subtilis*

## **2.2.2 Hipótesis**

### **2.2.2.1 Hipótesis alterna**

Utilizando residuos agroindustriales como suero de leche y de la industria mermeladera, mediante fermentación líquida sumergida es posible obtener un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* eficiente para combatir la marchitez por *Fusarium oxysporum* en rábano.

## **2.3 Tipo y Diseño de Investigación**

### **2.3.1 Por el tipo de investigación**

Investigación aplicada porque persigue un fin directo e inmediato que propone obtener un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* utilizando dos tipos de residuos con diferentes concentraciones, mediante una fermentación líquida sumergida e identificar las diferencias con un biofungicida comercial.

### **2.3.2 Por el diseño de investigación**

Experimental

#### **2.3.2.1 Diseño experimental**

Se obtuvo un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* mediante fermentación líquida sumergida utilizando residuos agroindustriales en concentraciones de: 50, 100 y 150 g.l<sup>-1</sup> para residuos de mermelada y 100, 200 y 300 g.l<sup>-1</sup> para suero de queso. El volumen de la solución de *Bacillus subtilis* se añadió en relación 5:100 ml. Se realizó tres repeticiones por cada medio. Se determinaron algunos indicadores de calidad, su eficacia para combatir marchitez causada por *Fusarium oxysporum* en rábano al ser comparada contra un fungicida comercial de uso común en la agricultura.

**Tabla 2-1** Diseño experimental

	<b>Suero de queso</b> (g.l <sup>-1</sup> )	<b>Residuo de mermelada</b> (g.l <sup>-1</sup> )	<b>Concentración de <i>Bacillus subtilis</i></b> (esporas.ml <sup>-1</sup> )	<b>Volúmen de solución de <i>Bacillus subtilis</i></b> (ml)	<b>Número de repeticiones</b>
<b>S1</b>	100	50	1,3x10 <sup>6</sup>	50	3
<b>S2</b>	200	100	1,3x10 <sup>6</sup>	50	3
<b>S3</b>	300	150	1,3x10 <sup>6</sup>	50	3

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 2.3.2.2 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño de modelo lineal general multivariante, para determinar el medio de cultivo óptimo para obtener un biofungicida utilizando residuos agroindustriales, referente a un biofungicida comercial.

### 2.3.3 Unidad de análisis

- Tres medios con dos residuos agroindustriales en diferentes concentraciones
- Recuento de *Bacillus subtilis*
- Plantas de rábano

### 2.3.4 Población de estudio

Existieron dos tipos de poblaciones de estudio

- La primera correspondió a los tres medios elaborados con dos tipos de residuos agroindustriales.
- La segunda correspondió a las plantas de rábano en donde se evaluó la eficiencia del biofungicida.

### **2.3.5 Tamaño de muestra**

Para los requerimientos de laboratorio se tomaron muestras que correspondieron a 200ml del producto de cada tratamiento de fermentación.

Se utilizó también cuarenta plantas para evaluar el biofungicida obtenido,

### **2.3.6 Selección de muestra**

La selección de la muestra se realizó de manera aleatoria del producto de cada tratamiento de fermentación, en cambio en las plantas de rábano se usó un muestreo dirigido.

## **2.4 Procedimientos**

### **2.4.1 Materiales, Equipos y Reactivos**

#### **Materiales**

- Probeta de 500 ml
- Probeta de 250 ml
- Probeta de 10 ml
- Espátula
- Erlenmeyer de 500 ml
- Nutriente Agar
- Agar Papa Dextrosa
- Varilla de agitación
- Cajas Petri



## Reactivos

- Agua destilada
- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina

## Equipos

- Balanza analítica
- Reverbero
- Incubadora a 37 °C
- Incubadora a 28 °C
- Molino
- Tamizador
- Incubador con agitación orbital
- Microscopio
- Potenciómetro
- Baño maría

### 2.4.2 Replicación de *Bacillus subtilis*

Se elaboró el medio de cultivo con Agar Nutriente y a partir de la cepa obtenida del **Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad San Francisco**, se realizaron réplicas por estriado, se incubaron a 37 °C.

### 2.4.3 Replicación de *Fusarium oxysporum*

Se elaboró el medio de cultivo con PDA y a partir de la cepa obtenida del **Laboratorio AGROMIKROBEN**, se realizaron réplicas, se incubaron a 28 °C.

#### 2.4.4 Preparación de solución de esporas de *Bacillus subtilis*

Se preparó una solución a base de tween 80 y agua destilada.

Se sembró *Bacillus subtilis* en Nutriente Agar y al cabo de 9 días se extrajeron las esporas mediante la solución previamente preparada, se colocaron 5 ml de la solución en cada caja previamente sembrada con *Bacillus subtilis*, se dejó reposar por 5 minutos y posteriormente se agitó para obtener las esporas.

#### 2.4.5 Conteo de esporas de *Bacillus subtilis*

El número de esporas se contaron en un hematocitómetro o cámara de Neubauer, usando la siguiente ecuación:

**Ecuación 1-2** Conteo de esporas de *Bacillus subtilis*

$$\frac{\text{esporas}}{\text{ml}} = \left( \sum 5 \text{ cuadrantes} \right) * 50000$$

#### 2.4.6 Preparación de la materia prima

Los residuos de mermelada se secaron a 70 °C durante 48 horas hasta obtener un peso ideal, posteriormente se redujo el tamaño de los residuos en un molino de disco único, para pasar finalmente por un molino de tornillo de bola. Estos residuos molidos fueron tamizados por tamaños de 300 µm – 38 µm y 425 µm.

Los residuos de mermelada y suero de queso fueron autoclavados a 1 atm de presión, 121 °C durante 30 minutos

#### 2.4.7 Elaboración del medio de cultivo en fermentadores

**Tabla 2-2** Componentes de los fermentadores

COMPONENTES (g.L <sup>-1</sup> )	S1	S2	S3
Sulfato de Amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	5	5
Melaza	20	20	20
Suero de queso	100	200	300
Residuos de mermeladas	50	100	150
Extracto de levadura	1	1	1
Fosfato de Potasio Monobásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1
Sales minerales (para bovinos)	10	10	10

**Fuente:** (Rehm 1993 citado en Giacaman, 2006, p. 68)

**Realizado por:** CHAVEZ María, 2018

**Donde:**

**S1:** Sustrato 1

**S2:** Sustrato 2

**S3:** Sustrato 3

Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de medio de cultivo, a 220 rpm, a 37 °C durante 24 horas. Cada formulación se aforó a 1 litro con agua destilada, se realizaron tres repeticiones. Se añadió 50 ml de la solución de *Bacillus subtilis* con una concentración de  $1,3 \times 10^6$  esporas.ml<sup>-1</sup>.

#### 2.4.8 Conteo de esporas en los medios fermentados

Para el conteo de esporas se utilizó un hematocitómetro o cámara de Neubauer, se realizó una dilución de 10<sup>-1</sup> con 1 ml del formulado y aforado a 10 ml con agua destilada, con la ayuda del microscopio con lente de 40X se contó el número de esporas por mililitro, de acuerdo a la siguiente ecuación:

## **Ecuación 2-2** Conteo de esporas en los medios fermentados

$$\frac{\text{esporas}}{\text{ml}} = \frac{(\sum 5 \text{ cuadrantes}) * 50000}{\text{Factor de dilución}}$$

### **2.4.9 Control de calidad**

Se preparó Agar nutriente y se sembraron desde los bioformulados obtenidos, se realizaron tres réplicas por cada bioformulado con el objetivo de un control de calidad del producto.

#### **2.4.9.1 Tinción Gram**

Se realizó tinción Gram a la bacteria presente en el medio de cultivo, para asegurarnos el crecimiento de *Bacillus subtilis* sin contaminación.

### **2.4.10 Medición de parámetros físico-químicos del biofungicida**

#### **2.4.10.1 pH**

Se utilizó un potenciómetro marca Brand calibrado con una solución buffer pH 7.

#### **2.4.10.2 Densidad**

Se pesó el picnómetro vacío, posteriormente se llenó el volumen del picnómetro con la solución del bioformulado, finalmente se pesó el picnómetro lleno y se determinó la densidad con la siguiente ecuación:

### **Ecuación 3-2 Densidad**

$$f = \frac{m1 - m2}{V}$$

**Donde:**

**f** = Densidad (g.ml<sup>-1</sup>)

**m1**= Masa del picnómetro vacío (g)

**m2**= Masa del picnómetro lleno (g)

**V**= Volumen del picnómetro (ml)

### **2.4.10.3 Viscosidad**

Primeramente se mide el diámetro y se determina la densidad de una canica de acero, pesando en una balanza analítica para obtener su masa y sumergiendo la misma en un volumen conocido. Seguido de esto en una probeta de 500 ml se coloca la solución y se mide la longitud de la probeta, finalmente se toma el tiempo que tarda la canica en llegar al fondo. Se determinó la viscosidad con la siguiente ecuación:

### **Ecuación 4-2 Viscosidad**

$$\mu = \frac{2g(f_s - f_L)r^2}{9V}$$

**Donde:**

**μ** = Viscosidad (Pa.s)

$g$  = gravedad ( $m.s^{-2}$ )

$\rho_s$  = Densidad del sólido ( $kg.m^3$ )

$\rho_L$  = Densidad del líquido ( $kg.m^3$ )

#### 2.4.10.4 Sólidos totales

Se pesan las cajas Petri a utilizar, se coloca 25 ml del biofungicida en cada placa, posteriormente se sitúan en el equipo de baño María hasta que las muestras se sequen, una hora después se colocan en una estufa por 30 minutos y finalmente se dejan enfriar en un desecador por 15 minutos para ser pesadas. Se determina los sólidos totales mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 5-2** Sólidos totales

$$ST = \frac{(P2 - P1)}{V} * 1000$$

**Donde:**

**ST**= Sólidos totales ( $mg.l^{-1}$ )

**P2** = Peso de la caja con la solución secada (g)

**P1**= Peso de la caja vacía (g)

#### 2.4.11 Evaluación de actividad antagónica

La evaluación se realizó por medio de un cultivo dual entre *Fusarium oxysporum* y *Bacillus subtilis* simultáneamente.

*Fusarium oxysporum* se sembró en PDA por 7 días a 28 °C. Para *Bacillus subtilis* primero se sembró directamente del bioformulado S3 en Nutriente Agar, posteriormente se volvió a sembrar en Nutriente Agar la bacteria por 24 horas antes de la elaboración del cultivo dual.

Se tomó dos discos con un diámetro de 4mm cada uno de la zona activa del crecimiento del hongo y se colocaron en los extremos de la caja Petri a 1cm de distancia. Seguido de esto, se inoculó la bacteria en forma de una línea en el centro de la caja.

Se evaluó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 6-2** Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial

$$PICR = \frac{r1 - r2}{r1} * 100$$

**Donde:**

**PICR:** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

**r1:** Radio del patógeno en el control (cm)

**r2:** Radio del patógeno en el tratamiento (cm)

#### **2.4.12 Porcentaje de Germinación**

En 100 semillas de rábano se inoculó *Fusarium oxysporum* en una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas.ml<sup>-1</sup>, se colocó algodón en la parte superior para cubrir las semillas y se esperó 7 días para la identificación de semillas germinadas.

#### **2.4.13 Preparación de solución de esporas de *Fusarium oxysporum***

Se sembró *Fusarium oxysporum* en PDA, al quinto día se realizó un lavado de cajas con 1 ml de agua destilada estéril y con la ayuda de un aza de winogradsky se obtuvieron las esporas para su posterior recuento.

#### **2.4.14 Inoculación de *Fusarium oxysporum* en semillas**

La solución previamente elaborada de esporas de *Fusarium oxysporum* se ajustó a  $1 \times 10^5$  esporas.ml<sup>-1</sup>, en donde las semillas de rábano fueron sumergidas durante 5 minutos para su posterior siembra en tierra.

#### **2.4.15 Aplicación del biofungicida**

El biofungicida se aplicó en tres tiempos.

Tiempo 1: después de haber sido inoculado con el hongo

Tiempo 2: a los 8 días de haber sido sembrado

Tiempo 3: a los 15 días de haber sido sembrado

#### **2.4.16 Evaluación de la incidencia y severidad**

##### **2.4.16.1 Incidencia**

**Ecuación 7-2** Porcentaje de Incidencia

$$I = \frac{n}{N} \times 100$$



**Donde;**

I= incidencia de la enfermedad expresada en porcentaje

n= número de plantas enfermas

N= número total de plantas

#### **2.4.16.2 Severidad**

**Ecuación 8-2** Porcentaje de Severidad

$$S = \frac{\sum(a.b)}{(n.k)} \times 100$$

**Donde;**

S = Severidad o grado de Ataque de la enfermedad

$\sum$  (a.b) = Sumatoria del número de plantas u órganos enfermos o infectados según el grado de afectación (0, 1, 2, 3, 4, 5)

n= número de plantas evaluadas

k= valor o grado mayor de la escala

**Tabla 2-3** Escala ordinal de severidad de la enfermedad empleada para las pruebas de patogenicidad

<b>Escala</b>	<b>Sintomatología</b>
0	Ausencia de enfermedad
1	Evidencia de síntomas no acentuados (comienzo de <u>epinastia</u> en peciolo, clorosis leve)
2	Abscisión de hojas. <u>Epinastia</u> acentuada. <u>Encopamiento</u> de hojas
3	Marchitamiento medio de la planta. Inclinación del tallo principal
4	Muerte de la planta

Fuente: (Urrea, 2010, p. 20)

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

#### **2.4.17 Determinación del Costo**

Se cotizaron los materiales, sustancias y reactivos que implicaron la elaboración del biofungicida, con el objetivo de determinar el costo del producto.

## CAPÍTULO III.

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Materia Prima

En la Tabla 3-1 están representados los parámetros con los cuales se caracterizaron los residuos de leche y mermelada. El residuo de leche y parte del residuo de mermelada es el resultado de un proceso de cocción.

El porcentaje de azúcares totales representa la cantidad que va a ser metabolizada por *Bacillus subtilis* como fuente de carbono durante la fermentación.

(Hernández and Martínez, 2001) y (Ferrero, 1995, p. 24) señalan que *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de catalizar la hidrólisis completa de las proteínas entre ellas las proteínas lácticas mediante enzimas denominadas como Proteasas alcalinas.

El porcentaje de acidez es bajo en el suero de queso, de tal manera que no es significativo al momento de ser evaluado como parámetro que actúa directamente con *Bacillus subtilis*.

**Tabla 3-1** Caracterización de residuos

Parámetros (%)	Suero de queso	Residuos de mermelada
Proteína	0,96	2,5
Azúcares totales	4,18	3,5
Grasa	0,41	2,75
Acidez expresado como ácido láctico	0,53	N.D

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

Los pesos iniciales de los residuos de mermelada de mora y fresa representados en la Tabla 3-2 son iguales, pero después de haber sido sometidos a un secado de 70° por 48 horas, los pesos tuvieron una variación de 142,15 gramos entre sí. Los residuos presentaron diferente porcentaje de pérdida de agua, es por ello que los pesos entre los residuos variaron.

**Tabla 3-2** Pesos de residuos

	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)	Porcentaje de pérdida de agua (%)
Mora	1000	617,15	38,28
Frutilla	1000	759,30	24,07
<b>Promedio</b>		<b>1376,45</b>	<b>62,35</b>

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

En la Tala 3-3 están representados los pesos de los residuos de mermelada de mora y frutilla, después de haber sido molidos y pasados por el tamiz con diámetro de 425µm, la cantidad de los dos residuos representa un 66.5% del total de los residuos secados y molidos.

Los porcentajes de pérdida representan la cantidad de residuo secado y molido que no pasó por el tamiz de 425 µm, esto se debe a que una gran cantidad de semillas no pudieron ser molidas adecuadamente y se pierde al pasar por el tamiz.

**Tabla 3-3** Pesos de residuos Tamiz 425 µm

	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)	Porcentaje de pérdida (%)
Mora	617,15	411,61	33,3
Frutilla	759,30	503,85	33,6
<b>Promedio</b>		<b>915,46</b>	<b>66,9</b>

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

En la Tabla 3-4 se encuentran los pesos finales de los residuos de mermelada de mora y frutilla, los mismos que representan el 33.5% de los residuos secados y molinos, finalmente esta cantidad fue útil para la realización de los medios a fermentarse.

No se realizan los porcentajes de pérdida, debido a que los residuos se quedaron en el tamiz previo al tamaño de 300µm.

(Piñero and Díaz, 2010) señalaron que el tamaño óptimo de los residuos agroindustriales para participar en medios de cultivos están en un rango de 106 a 425 µm, señalando que los tamaños más pequeños que asemejen a las partículas a una especie de harina son los más apropiados.

Estos resultados muestran cantidades de residuos de mermelada dentro del rango del tamaño de tamiz antes mencionado.

**Tabla 3-4** Pesos de residuos Tamiz 300  $\mu\text{m}$  – 38  $\mu\text{m}$

	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)
Mora	441,61	220,33
Frutilla	503,85	240,65
<b>Promedio</b>		<b>460,98</b>

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.2 Conteo de esporas de *Bacillus subtilis*

La solución de esporas fue obtenida con una solución previamente preparada de Tween 80, dando como resultado  $2,28 \times 10^6$  esporas. $\text{ml}^{-1}$ .

El método para obtener la concentración de esporas. $\text{ml}^{-1}$  está basado en (Yuly *et al.*, 2008), que demuestra en su estudio la facilidad que proporciona la solución de Tween 80 para remover las esporas de *Bacillus subtilis*.

Se obtuvo una cantidad igual a  $1.3 \times 10^6$  esporas. $\text{ml}^{-1}$  de *Bacillus subtilis*, se utilizaron 50 ml de la solución con dicha concentración, para ser añadida directamente a los tres diferentes medios de cultivos a ser fermentados.

Con relación al estudio realizado por (Giacaman, 2006), se necesita una solución con una cantidad de esporas. $\text{ml}^{-1}$  de  $10^6$  a  $10^8$ , dependiendo del volumen en el cual se va a realizar el bioformulado con una relación 5:100.

Basados en estos resultados la cantidad añadida de la solución de esporas fue similar a la presentada en la literatura, la misma cantidad se usó para los tres medios.

### 3.3 Evaluación de medios de cultivo

En la Tabla 3-5 se encuentran representados las mediciones de pH inicial, intermedio y final de los medios de cultivo, en donde el pH inicial para cada medio fue de: 4,41, y 6,28 para los Medios 1, 2 y 3 respectivamente. No se utilizó una solución tampón para ajustar el pH, debido a que se estaba trabajando con valores reales para identificar qué medio fue mejor

Según (Layton *et al.*, 2011) *Bacillus spp* es capaz de crecer en un rango de pH de 5,5 a 8,5. Los resultados obtenidos señalan que solo S3 se encuentra dentro del rango apropiado, es por ello que la variación en el crecimiento de esporas de la bacteria se puede ver afectado en los otros medios de cultivo.

**Tabla 3-5** Medición de pH

	<b>pH Inicial</b>	<b>pH Intermedio</b>	<b>pH Final</b>
<b>S1</b>	4,41 ± 0,03	4,52 ± 0,03	4,53 ± 0,05
<b>S2</b>	5,09 ± 0,03	5,17 ± 0,05	5,25 ± 0,03
<b>S3</b>	6,28 ± 0,02	6,3 ± 0,03	6,49 ± 0,05

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

En la Tabla 3-6 están los componentes de los tres sustratos con sus concentraciones correspondientes.

La melaza tiene un alto valor nutritivo ya que aporta en un 50% aproximadamente de azúcares fermentables y en un 53,83% de azúcares reductores, además actúa como fuente de carbono de fácil asimilación para *Bacillus subtilis* (Giacaman, 2006). La cantidad de melaza propuesta en la Tabla 3-6 usada en este estudio está basada directamente con la investigación previamente mencionada, debido al aporte nutricional para la bacteria.

El género *Bacillus*, entre ellos *Bacillus subtilis* es un importante solubilizador de fosfato, el mismo que aporta en la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, pero también es parte del proceso de síntesis de proteínas (Corrales *et al.*, 2014, p. 174). El fósforo es esencial para el desarrollo y

crecimiento de *Bacillus subtilis*. Mientras que el Sulfato de amonio actúa como fuente de nitrógeno para la bacteria.

**Tabla 3-6** Componentes de los medios de cultivo

COMPONENTES (g.L <sup>-1</sup> )	S1	S2	S3
Sulfato de Amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	5	5
Melaza	20	20	20
Suero de queso	100	200	300
Residuos de mermeladas	50	100	150
Extracto de levadura	1	1	1
Fosfato de Potasio Monobásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1
Sales minerales (para bovinos)	10	10	10

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.4 Conteo de esporas en los medios fermentados

El conteo se realizó a los tres medios fermentados con sus respectivos triplicados a las 18, 20, 22 y 24 horas, con el objetivo de determinar la hora en la cual se produjo el mayor número de esporas.

Se utilizó un Modelo General Univariante, debido a que la comparación fue solo entre las 4 horas establecidas. Se determinó diferentes crecimientos en los tres medios fermentados.

En la Tabla 3-7 se puede observar el primer medio, en donde el mayor número fue 5,61E+07 esporas.ml<sup>-1</sup> y estableciéndose este número en la hora 18 y 20, mientras que en las siguientes horas la cantidad disminuyó.

En la Tabla 3-7 se encuentran todos los promedios de crecimiento microbiano expresado en esporas.ml<sup>-1</sup>, en donde las mayores concentraciones de *Bacillus subtilis* se encontraron dentro de las horas 18 y 20 para los tres sustratos. El conteo de esporas fue aumentando según los sustratos elaborados.

Se midió el pH debido a que el crecimiento de esporas se ve directamente relacionado con el medio en el cual están.

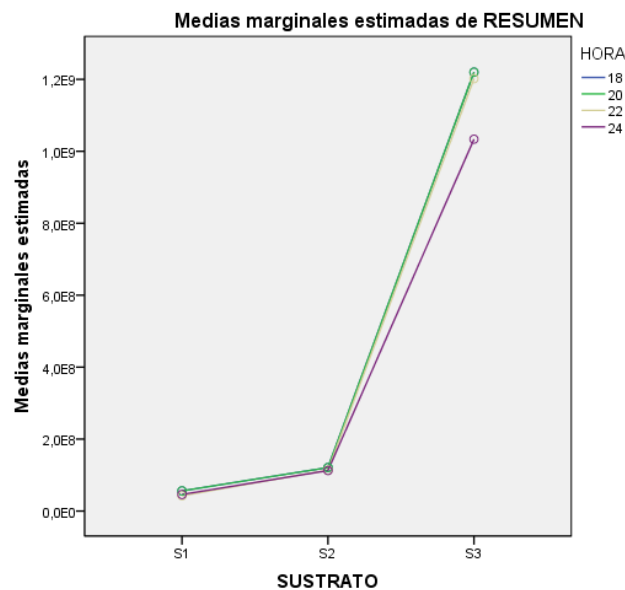
Mediante el Gráfico 3-1 se determinó que la mejor hora para obtener el mayor número de esporas.ml<sup>-1</sup> fue a las 20 horas, debido a que el tiempo de duplicación de *Bacillus subtilis* es cada 20 minutos.

Este tipo de bacteria no necesita mucho tiempo para obtener grandes cantidades, su crecimiento se debe directamente a los sustratos que se utilizó en cada medio de cultivo (Sánchez, 2010), es por ello que en 24 horas el crecimiento de *Bacillus subtilis* puede llegar hasta 10<sup>21</sup>, todo dependerá de los nutrientes, pH y temperatura en los cuales esté presente la bacteria.

**Tabla 3-7** Número de esporas.ml<sup>-1</sup> de los tres sustratos en cuatro distintas horas

	S1	pH	S2	pH	S3	pH
<b>Hora 18</b>	5,61x10 <sup>7</sup> ± 3,8	4,52 ± 0,03	1,21x10 <sup>8</sup> ± 0,1	5,17 ± 0,05	1,22x10 <sup>9</sup> ± 0,4	6,3 ± 0,03
<b>Hora 20</b>	5,61x10 <sup>7</sup> ± 3,8	4,52 ± 0,03	1,21x10 <sup>8</sup> ± 0,1	5,17 ± 0,05	1,22x10 <sup>9</sup> ± 0,4	6,3 ± 0,03
<b>Hora 22</b>	4,25 x10 <sup>7</sup> ± 1,0	4,51 ± 0,01	1,14x10 <sup>8</sup> ± 0,3	5,20 ± 0,03	1,20x10 <sup>9</sup> ± 0,4	6,57 ± 0,05
<b>Hora 24</b>	4,62 x10 <sup>7</sup> ± 1,8	4,53 ± 0,05	1,13x10 <sup>8</sup> ± 0,6	5,25 ± 0,03	1,03x10 <sup>9</sup> ± 0,2	6,49 ± 0,05

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Gráfico 3-1** Comparación de la cantidad de esporas.ml<sup>-1</sup> en 4 horas

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

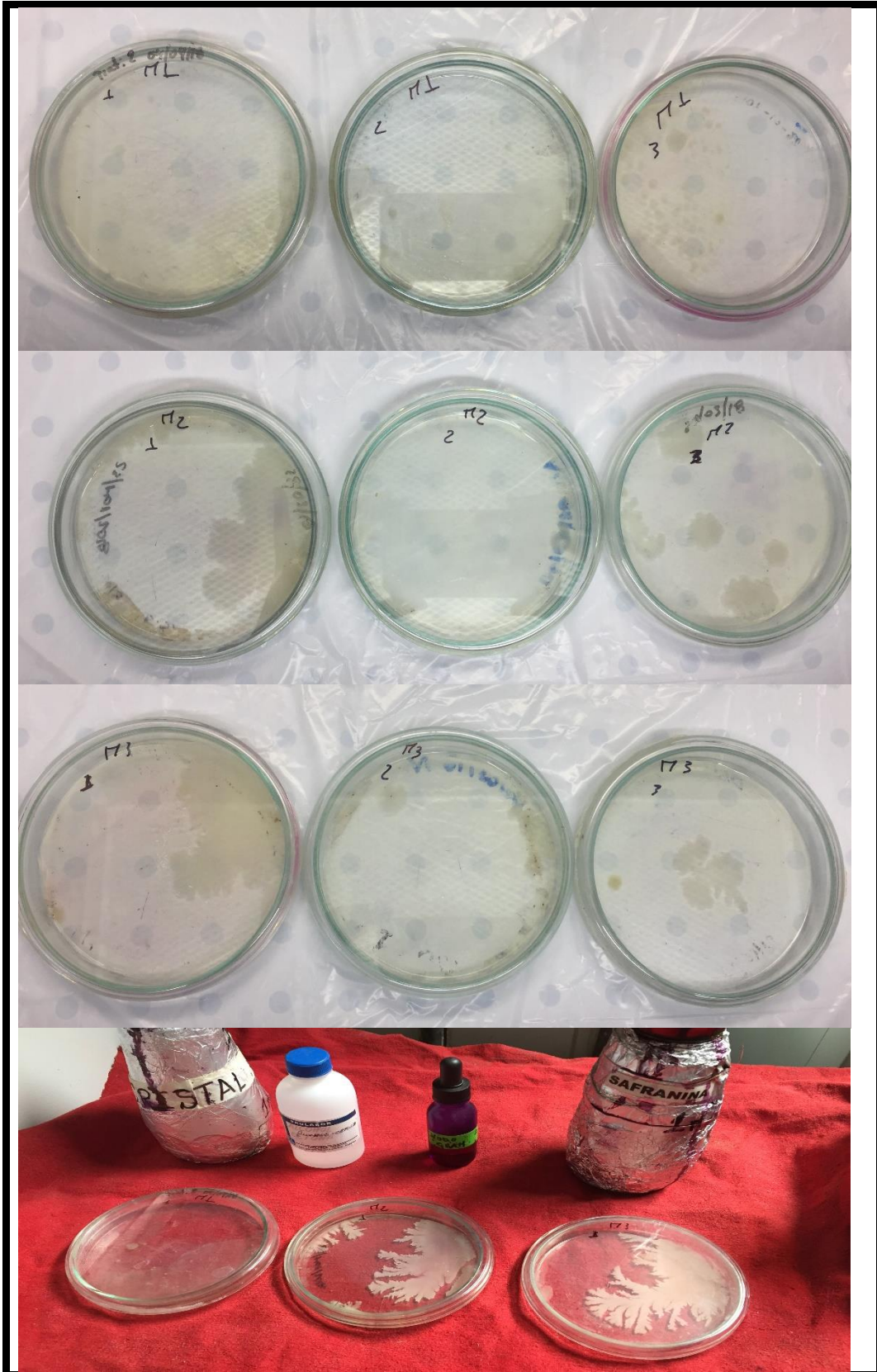


### 3.5 Control de Calidad

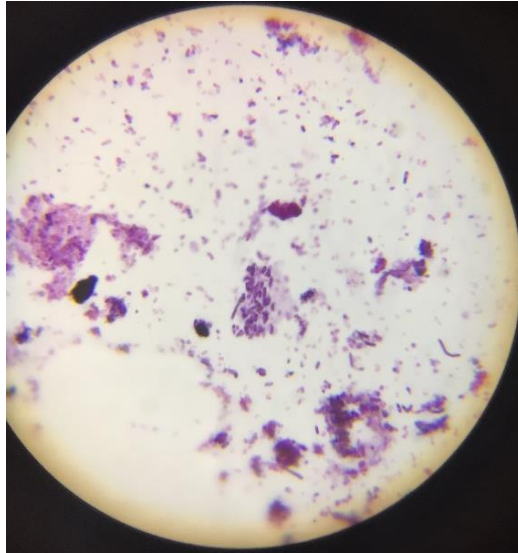
Este procedimiento se realizó con el objetivo de identificar si existía algún tipo de contaminación en los bioformulados, se sembró directamente de cada medio fermentado en Agar nutriente.

La identificación se realizó de manera visual y a los dos días se realizó Tinción Gram a las placas sembradas previamente. No se identificó algún tipo de contaminación por otro tipo de bacteria u hongo. El crecimiento del primer medio fue minúsculo comparado con los siguientes dos.

(Realpe, Hernández and Agudelo, 2002) realizó Tinción Gram a varias especies del género *Bacillus spp.* y las representó gráficamente, la Figura 3-3 realizada al microorganismo presente en las cajas representan una bacteria Gram positiva, debido al color morado. Solo las bacterias Gram positivas tienen la capacidad de teñirse de morado, debido a que presentan una capa de peptidoglicano, diferente a las Gram negativas.



**Figura 3-1** Crecimiento de *Bacillus subtilis* en Agar Nutriente  
Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Figura 3-2** Tinción Gram realizado a los medios fermentados  
Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.6 Parámetros Físico-Químicos del Biofungicida

#### 3.6.1 Recuento de esporas

En la Tabla 3-10 se muestra la cantidad de esporas.ml<sup>-1</sup> de cada bioformulado obtenido, se estableció:  $4,62 \times 10^7$ ,  $1,13 \times 10^8$  y  $1,03 \times 10^9$  para los tres formulados respectivamente.

Los valores del recuento variaron según cada biofungicida, creciendo exponencialmente, esto se debe directamente a la concentración de los residuos agroindustriales utilizado en los tres medios y a los valores de pH.

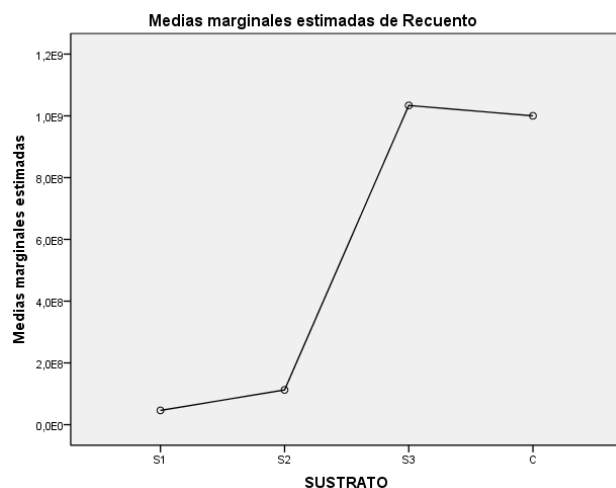
En el Gráfico 3-3 se observa las diferencias significativas entre las cantidades de los dos primero biofungicidas, comparados con el control, mientras que el valor del biofungicida 3 está más relacionado con el control.

El control es un biofungicida comercial llamado Serenade, el cual tiene como componente activo *Bacillus subtilis*, con una concentración de  $1 \times 10^9$  esporas.ml<sup>-1</sup>.

**Tabla 3-8** Número de esporas.ml<sup>-1</sup>

Medios	Esporas.ml <sup>-1</sup>
S1	4,62 x10 <sup>7</sup> ± 1,8
S2	1,13x10 <sup>8</sup> ± 0,6
S3	1,03x10 <sup>9</sup> ± 0,2
Control	1x10 <sup>9</sup>

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Gráfico 3-2** Recuento de esporas.ml<sup>-1</sup> de los tres biofungicidas vs control

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.6.2 pH

Los resultados presentados en la Tabla 3-11 muestran los datos de pH final de los medios en el que creció *Bacillus subtilis* y en los que se generó el biofungicida, siendo estos: 4,53, 5,25 y 6,49 para los tres formulados respectivamente.

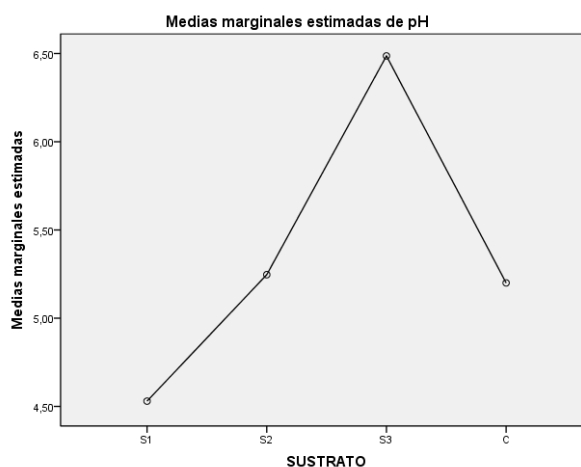
En el Gráfico 3-4 se observa la diferencia de valores de pH existentes entre los tres sustratos en comparación con un Control, el cual fue tomado de un biofungicida comercial. Al ser el valor de  $P < \alpha$  se puede decir que existe diferencias entre los pH de los biofungicidas con el pH control.

El pH del biofungicida comercial es de 5,2, y los Sustratos 1 y 2 con valores de 4,53 y 5,25 respectivamente son similares, pero *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de crecer en rangos de pH de 5,5-8,5 así señala (Layton *et al.*, 2011), de esta manera se identifica que el mejor pH fue del Sustrato 3 con 6,49. El pH de los medios va variando debido a lo expuesto por (Johnvesly, Manjunath and Naik, 2002, p. 62), la utilización de residuos agroindustriales facilita la producción de enzimas llamadas proteasas alcalinas, las mismas que conducen a un medio con pH óptimos para su desarrollo.

**Tabla 3-9** Datos de pH finales

Medios	pH
S1	4,53 ± 0,05
S2	5,25 ± 0,03
S3	6,49 ± 0,05
Control	5,20

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Gráfico 3-3** Resultado de pH finales en cada sustrato

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.6.3 Densidad

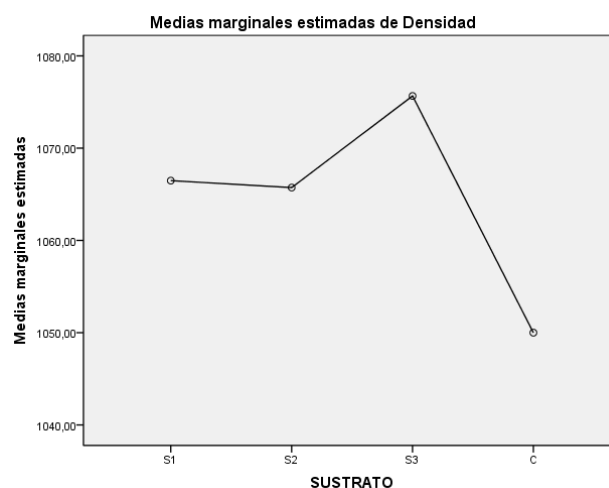
En la Tabla 3-12 se muestran los valores promedios de las densidades de los tres medios fermentados con referencia a un control, en donde los valores fueron: 1066,48, 1065,73 y 1075,66 para los tres medios respectivamente. Las densidades nos ayudan a determinar la cantidad de materia en un volumen establecido.

La densidad control del biofungicida Serenade fue de 1050,00 kg.m<sup>-3</sup>, la diferencia con las densidades de los biofungicidas tuvo una significancia estadística representativa, lo cual mostró que existieron diferencias en este parámetro, como se puede observar en el Gráfico 3-5.

**Tabla 3-10** Densidades de los tres biofungicidas y control

Medios	Densidad (kg.m <sup>-3</sup> )
S1	1066,48 ± 0,2
S2	1065,73 ± 0,2
S3	1075,66 ± 0,1
Control	1050,00

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Gráfico 3-4** Densidades de los biofungicidas vs Control

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.6.4 Viscosidad

En la Tabla 3-13 se muestran los valores de las viscosidades de los bioformulados y el biofungicida control. Obteniendo los siguientes resultados: 0,278, 0,278 y 0,268 de los tres medios respectivamente.

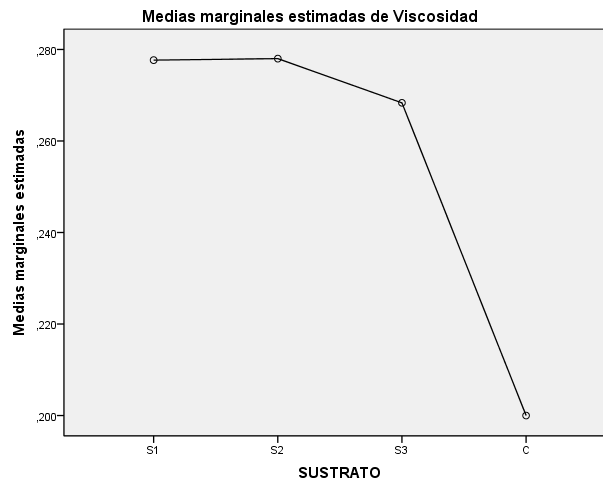
Las viscosidades de los biofungicidas fueron mayores en pequeños porcentajes, lo que significa que existió una diferencia significativa estadísticamente entre las densidades de los biofungicidas y la densidad del biofungicida comercial, tratado como control.

En el Gráfico 3-6 se observa la diferencia que existe entre las densidades de los biofungicidas y la densidad de control, estadísticamente representa una diferencia significativa en pequeños porcentajes.

**Tabla 3-11** Viscosidades de los biofungicidas y Control

Medios	Viscosidad (Pa.s)
S1	0,278 ± 0
S2	0,278 ± 0
S3	0,268 ± 0
Control	0,200

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Gráfico 3-5** Densidades de los biofungicidas vs control

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

Después de haber realizado las comparaciones de los tres biofungicidas con un biofungicida comercial tratado como control, los resultados representados en la Tabla 3-12 señalan que el biofungicida óptimo para ser aplicado en plantas de rábano fue S3, el cual corresponde al medio 3 obtenido con las mayores concentraciones de residuos agroindustriales.

De esta manera se determinó que el mejor biofungicida para ser aplicado en campo fue el S3, debido al pH final pudo ser aplicado y no representó daño al suelo o la planta, la cantidad de esporas de *Bacillus subtilis* fue la apropiada para actuar sobre el hongo patógeno del rábano.

A mayor concentración de residuos se obtuvo un mejor crecimiento de *Bacillus subtilis*, todo esto debido a las propiedades y componentes de los residuos, que actuaron como fuente de carbono y medio de producción de enzimas principalmente proteasas alcalinas como señala (Johnvesly, Manjunath and Naik, 2002, p. 62)

La medición de pH fue sustancial, debido a que el rábano crece en suelos neutros y al aplicar un biofungicida ácido, alteraría el pH y el crecimiento disminuiría o no existiría.

**Tabla 3-12** Parámetros finales del S3

<b>Número de esporas.ml<sup>-1</sup></b>	1,03x10 <sup>9</sup> ± 0,2
<b>pH</b>	6,49 ± 0,05
<b>Densidad (kg.m<sup>-3</sup>)</b>	1075,66 ± 0,1
<b>Viscosidad (Pa.s)</b>	0,268 ± 0

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.6.5 Sólidos totales

Los sólidos totales de cada biofungicida se midió con el objetivo de determinar la cantidad de residuo que no fue soluble, pero que forma parte de la fermentación sumergida, y se mantiene como alimento para *Bacillus subtilis*.

En la Tabla 3-13 están representados los resultados de la medición de sólidos totales, los mismos que fueron: S1= 15432 mg.l<sup>-1</sup>, S2= 34472 mg.l<sup>-1</sup>, S3= 59780 mg.l<sup>-1</sup>, estos valores representan 30%, 34% y 39% respectivamente del total de cada biofungicida.

(Suárez, 2012) habla sobre las cantidades de sustratos sólidos con respecto a sustratos líquidos para que se dé una fermentación líquida sumergida apropiada, el rango es de 30-50%, es decir las cantidades de sólidos totales presentes en los tres bioformulados entran en el rango correcto de un fermentación sumergida.

**Tabla 3-13** Medición de sólidos totales

<b>Medios</b>	<b>Sólidos totales mg.l<sup>-1</sup></b>	<b>Porcentaje (%)</b>
S1	15432 ± 0,03	30
S2	34472 ± 0,04	34
S3	59780 ± 0,03	39

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



### 3.7 Conteo de esporas de *Fusarium oxysporum*

El primer conteo de esporas dio un resultado de  $1,1 \times 10^6$  esporas. $\text{ml}^{-1}$ . (Toit, 2003) señala que la cantidad necesaria para infestar una planta es de  $10^5$  esporas. $\text{ml}^{-1}$ , es por eso que la solución fue llevada hasta  $10^5$  por medio de una dilución con la ayuda de agua destilada y autoclavada, es decir de la solución inicial se utilizó 0,1 ml y se aforó a 10 ml.

### 3.8 Evaluación del antagonismo microbiano

En la Tabla 3-14 se establecen los valores de radios de tratamiento y control para determinar los porcentajes de inhibición, en donde el menor porcentaje fue de 12,5% a las 24 horas y el mayor fue 63,15% a las 120 horas.

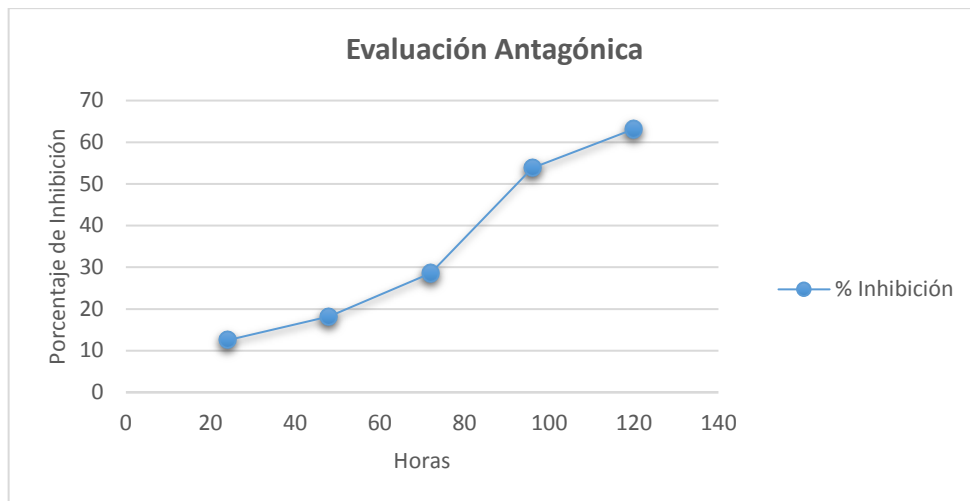
En el transcurso de los días, se observó el crecimiento del porcentaje de inhibición del tratamiento, como se puede ver en el Gráfico 3-7 y en la Figura 3-3.

(Méndez, Flores and Páramo, 2017) determinó que *Bacillus subtilis* tiene un rango de 50-100% de inhibición frente al género *Fusarium spp.* El porcentaje de inhibición a las 120 horas entra en el rango propuesto por la literatura.

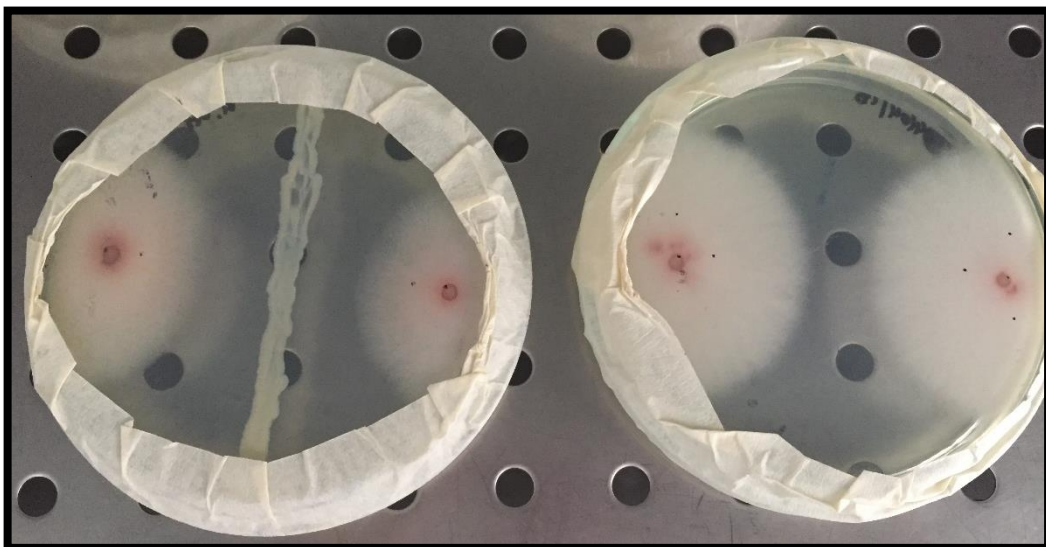
**Tabla 3-14** Porcentajes de Inhibición

<b>Horas</b>	<b>Radio Tratamiento (cm)</b>	<b>Radio Control (cm)</b>	<b>% Inhibición</b>
24	$0,70 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,1$	12,50
48	$0,90 \pm 0,1$	$1,10 \pm 0,1$	18,18
72	$1,00 \pm 0,1$	$1,40 \pm 0,1$	28,57
96	$1,20 \pm 0,1$	$2,60 \pm 0,1$	53,84
120	$1,40 \pm 0,1$	$3,80 \pm 0,1$	63,15

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Gráfico 3-6** Evaluación Antagónica  
Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Figura 3-3** Tratamiento vs Control  
Fuente: CHAVEZ María, 2018

### 3.9 Porcentaje de Germinación

De 100 semillas de rábano 87 semillas germinaron, lo cual representa el 87% de germinación, con este alto valor se determinó que se trabajará con cuarenta semillas, 10 para cada tratamiento incluyendo el control. Se realizó la prueba del porcentaje de germinación a las semillas de rábano, para determinar la cantidad de plantas para el análisis.



**Figura 3-4** Semillas de rábano para prueba de Germinación  
Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.10 Evaluación de la Incidencia y Severidad

Como se observa en la Figura 3-5, el diagnóstico final se realizó el mismo día a la totalidad de las plantas sembradas. Se midió el número de plantas que crecieron, el número de hojas afectadas en cada tratamiento y la elongación de las raíces.

Control: Plantas infestadas por *Fusarium oxysporum* sin aplicación del biofungicida

Tratamiento 1: Plantas aplicadas el biofungicida simultáneamente con la solución de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Tratamiento 2: Plantas aplicadas el biofungicida a los 8 días de haber sido sembradas.

Tratamiento 3: Plantas aplicadas el biofungicida a los 15 días de haber sido sembradas.



**Figura 3-5** Plantas de rábano  
Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.10.1 Incidencia

En la Tabla 3-15 se muestran los porcentajes de incidencia de la marchitez en rábano causada por *Fusarium oxysporum* después de haber sido aplicado el biofungicida.

En la Figura 3-6 se pueden observar los rábanos obtenidos al cumplir los 30 días de siembra, se observó el daño que presentaron las hojas de los rábanos del control y los diferentes tamaños del fruto comestible, llegando algunos tan pequeños que alcanzaron un diámetro de 1,5cm.

El segundo tratamiento tuvo mejores resultados, debido a que el porcentaje de incidencia fue de 30%, es decir 7 plantas crecieron sin presencia de enfermedad.



(Rojas *et al.*, 2017) demostró que *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de reducir la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* en un 73%, es decir un porcentaje de incidencia igual a 27% en las plantas. El tratamiento 2 es el que más se asemeja a este porcentaje, reduciendo casi en su mayoría la marchitez que causa el hongo.

**Tabla 3-15** Porcentajes de incidencia de marchitez en rábano

	Incidencia (%)
Control	90
Tratamiento 1	70
Tratamiento 2	30
Tratamiento 3	40

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Figura 3-6** Rábanos A(Control), B(Tratamiento 1), C(Tratamiento 2), D(Tratamiento 3)

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.10.2 Severidad

En la Tabla 3-16 están representados los valores del número de hojas afectadas por *Fusarium oxysporum*, expresados por el amarillamiento y daño de las hojas del rábano, lo cual sirvió para

determinar porcentaje de severidad por el número de hojas afectadas, los valores fueron: 23, 16, 8 y 14 hojas afectadas de Control, Tr1, Tr2 y Tr3 respectivamente.

En la Tabla 3-17 están representados los porcentajes de severidad del control y los tres tratamientos. La severidad se midió con respecto al rábano como alimento y la marchitez que causó el hongo después de haber sido sometido a concentraciones del biofungicida a base de *Bacillus subtilis*.

En la Figura 3-7 se puede observar el marchitamiento y daño que presentaron las hojas de rábano y la cantidad de hojas marchitas de cada tratamiento.

(Corrales *et al.*, 2011) determinó que *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de disminuir la severidad de la marchitez causada por *Fusarium spp.* por debajo del 50%, respecto a los datos de la investigación los dos últimos tratamientos presentan valores semejantes, es decir el biofungicida actúa de mejor manera a los 8 y 15 días de presenciarse la enfermedad, preferiblemente a los 8 días que empiezan los primeros síntomas.

**Tabla 3-16** Número de hojas afectadas por *Fusarium oxysporum*

	Número de hojas afectadas
Control	23
Tratamiento 1	16
Tratamiento 2	8
Tratamiento 3	14

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

**Tabla 3-17** Porcentajes de severidad

	Severidad (%)
Control	95,8
Tratamiento 1	53,3
Tratamiento 2	26,7
Tratamiento 3	46,7

Realizado por: CHAVEZ María, 2018



**Figura 3-7** Hojas de rábano afectadas A(Control), B(Tratamiento 1), C(Tratamiento 2), D(Tratamiento 3)

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

Se evaluó también el tamaño de las raíces de cada rábano y se obtuvo un promedio de cada uno.

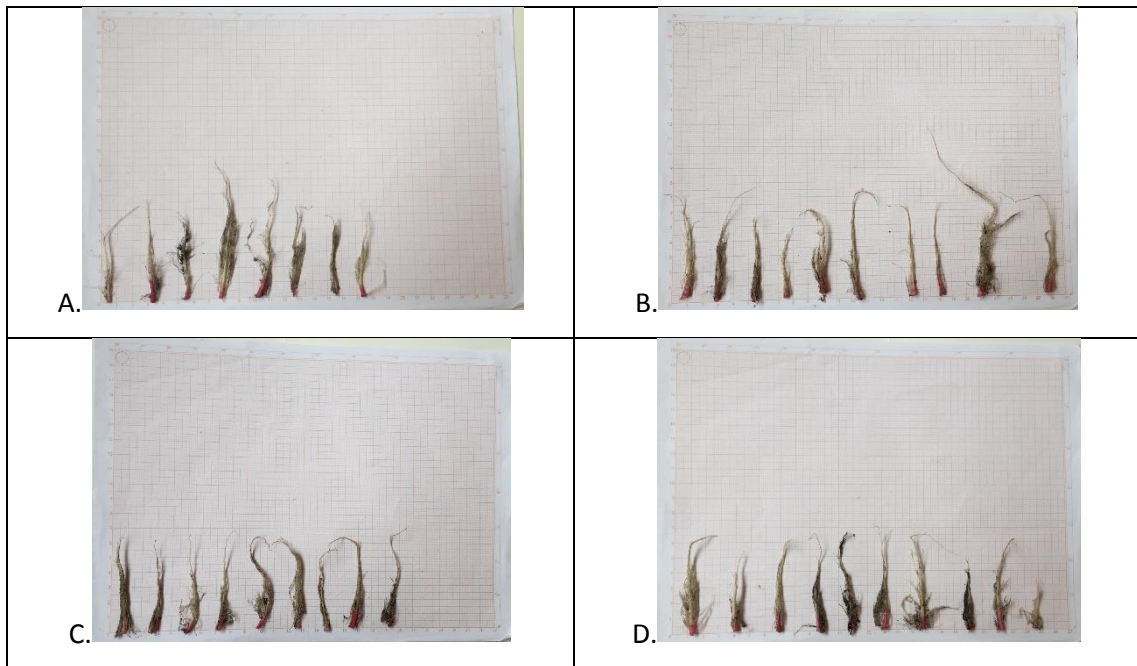
En la Figura 3-8 se muestran las imágenes con los tamaños de las raíces de los tres tratamientos y el control. Teniendo como resultado los promedios expresados en la Tabla

**Tabla 3-18** Medición del tamaño de las raíces de rábano

	Tamaño de raíces (cm)
Control	7
Tratamiento 1	8,45
Tratamiento 2	6,8
Tratamiento 3	6,55

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

El tamaño de las raíces de rábano debe ser grandes o superiores al 6 cm, debido a que por medio de las raíces se absorbe el agua y minerales presentes en el suelo que van directo al tallo.



**Figura 3-8** Raíces de rábano A(Control), B(Tratameinto 1), C(Tratamiento 2), D(Tratamiento 3)

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

### 3.11 Determinación del Costo del Biofungicida

Se realizó la comparación con un biofungicida comercial a base de *Bacillus subtilis*, de marca Serenade, el cual tiene la misma concentración del microorganismo activo.

En la Tabla 3-19 se observa que el costo del Biofungicida a base de *Bacillus subtilis* es \$9,45 por cada litro de producción, mientras que el precio del biofungicida comercial es de \$16,52 por cada litro, dando como resultado una diferencia de precio de \$7,07 dólares por litro lo que significa que el producto fue viable y económicamente rentable.



**Tabla 3-19** Determinación del costo de producción del biofungicida a base de *Bacillus subtilis*

Insumos	Cantidad	Unidad	Costo por unidad (\$)	Costo total (\$)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	Gramo	0,05	0,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	Gramo	0,05	0,75
Melaza	60	ml	0,02	1,20
Extracto de levadura	3	Gramo	0,25	0,75
Suero de queso	600	ml	-	-
Residuos de mermelada	300	ml	-	-
Sales minerales	30	Gramo	0,05	1,5
Recipientes	3		1,50	4,5
<b>Total</b>				<b>9,45</b>

Realizado por: CHAVEZ María, 2018

## CONCLUSIONES

- Se evaluó los tres medios de cultivo utilizando diferentes concentraciones de dos residuos agroindustriales (suero de queso y residuos de mermelada), por medio de cuatro indicadores, los cuales fueron: recuento de esporas. $\text{ml}^{-1}$  de *Bacillus subtilis*, pH óptimo para el crecimiento exponencial de la bacteria, densidad y viscosidad de los medios. El medio más adecuado para la fermentación con *Bacillus subtilis* fue el S3, el cual contiene estas concentraciones: 300  $\text{g.l}^{-1}$  y 150  $\text{g.l}^{-1}$  de suero de queso y residuos de mermelada respectivamente.
- Se determinó el efecto de crudos bacterianos *in vitro* por medio de un cultivo dual, sembrados de manera simultánea en medio PDA, en donde se presencié un 63,15% de inhibición del crecimiento del *Fusarium oxysporum* a las 120 horas de evaluación.
- Se evaluó *in vivo* en plantas de rábano, el biofungicida obtenido, dando como resultado un porcentaje de incidencia de la enfermedad de 30% comparado al control que fue de 90%, el biofungicida actuó directamente sobre el hongo que ocasiona la enfermedad. Se determinó también que la menor incidencia se dio en el Tratamiento 2 que corresponde a la aplicación del biofungicida a los 8 días de haber sido sembradas las semillas. Se seleccionó el octavo día debido a que en este día se produjeron los primeros síntomas. De la misma manera, se obtuvo un menor porcentaje de severidad de hojas afectadas en el Tratamiento 2 con un valor de 26,7%, comparado con un 95,8% de severidad en el control. El tamaño de la raíz fue apropiado para la absorción de agua y el producto final tuvo una mejor estructura comparado al resto de tratamientos.
- Se determinó que la producción del biofungicida por medio de esta tecnología es viable y económicamente rentable, debido a que existe una diferencia de \$7,07 por cada litro de producto, comparado con un biofungicida comercial. Los resultados en campo demuestran la viabilidad del biofungicida y su eficiencia al combatir la enfermedad del rábano causada por *Fusarium oxysporum*.

## RECOMENDACIONES

- Producción de este tipo de biofungicida a mayor escala, conseguir un registro comercial y su distribución en el mercado agrícola.
- Considerar otros tipos de residuos agroindustriales en la producción de un biofungicida, o variar las concentraciones de los residuos utilizados en esta investigación
- En base a los datos obtenidos al caracterizar los residuos, se recomienda utilizar mayor cantidad de residuos de mermeladas, debido a que actúan principalmente como fuente de carbono para los microorganismos.
- Trabajar con residuos de las mermeladeras artesanales, debido a que no cuentan con un manejo de sus residuos orgánicos adecuada.
- Realizar análisis de estabilidad para identificar el tiempo de vida útil del biofungicida obtenido mediante esta tecnología.

## BIBLIOGRAFÍA

**Arbeláez, Germán.** “ALGUNOS ASPECTOS DE LOS HONGOS DEL GENERO *Fusarium* Y DE LA ESPECIE *Fusarium oxysporum*”. *Agronomía Colombiana*, vol. 17, (2000), (Colombia) pp. 11-22.

**Ariza, Yesid.; Sanchez, Ligia.** “Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp.” *Nova* [en línea], 2012, (Colombia) Vol. 10 (18), pp. 149-155. [Consulta: 05 septiembre 2018]. ISSN 1794-2470. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a01.pdf>

**Carrillo, Daniela.** Instituto Nacional de Estadística y Censos. La Industria de alimentos y bebidas en el Ecuador. 2009. pp. 1-14

**Castro, Natalia.** *Bacillus subtilis* [en línea]. Scribd, 14 de Mayo del 2010. [Consulta: 05 de septiembre 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/31345785/Bacillus-Subtilis-PDF>

**Cuervo, Jeanny.** Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales [en línea] (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2010. pp. 1-35 [Consulta: 17 de Agosto del 2018]. Disponible en:

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>

**CURY, Katia., et.al.** Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* [en línea], 2017, (Colombia) 9, pp. 122-132. [Consulta: 07 Junio 2018]. ISSN 2027-4297. Disponible en:

<https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/viewFile/530/pdf>

**Díaz, Daniel.** Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida (tesis). Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología. Chihuahua-México. 2009. pp. 1-14. Disponible en:

<http://www.lebas.com.mx/files/DESARROLLO-DE-UN-IN-CULO-CON-DIFERENTES-SUSTRATOS-MEDIANTE-FERMENTACION-SOLIDA-SUMERGIDA.pdf>

**Fazenda, M.; et.al.** “Submerged culture fermentation of ‘higher fungi’: the macrofungi” *Advances in Applied Microbiology* [en línea], 2008 (Escocia) vol (63), pp. 33-103. [Consulta: 08 de Septiembre 2018]. ISSN 0065-2164. DOI: 10.1016/S0065-2164(07)00002-0. Disponible en: [https://sci-hub.tw/10.1016/s0065-2164\(07\)00002-0#](https://sci-hub.tw/10.1016/s0065-2164(07)00002-0#)

**FLACSO-MIPRO.** *Boletín mensual de análisis sectorial de MIPYMES. Elaboración de jugos y conservas de frutas* [en línea]. Ecuador: Centro de Investigaciones Económicas y de la Micro, Pequeña y Mediana Empresa 2011. [Consulta: 07 Junio 2018]. Disponible en: <https://www.flacso.edu.ec/portal/pnTemp/PageMaster/f3aum4sgz8ls6rsximf6khej5eeefz.pdf>

**Garcés, Emira.; et.al.** “Fusarium oxysporum EL HONGO QUE NOS FALTA CONOCER”. *Acta Biológica Colombiana*. Vol. 6 (2001), (Colombia) pp. 7-25

**GRUPOSacsa.** *Ventajas y desventajas de agroquímicos* [en línea]. México: SACSA, 2015. [Consulta: 04 Junio 2018]. Disponible en:

<http://www.gruposacsa.com.mx/ventajas-y-desventajas-de-usar-agroquimicos/>

**Hidalgo Castro, Edison Fabián, & Vanegas Burga, Katherine Beatriz.** *Estudio de factibilidad para la creación de un centro de acopio y enfriamiento de leche, producción y comercialización de quesos en beneficios de los pequeños productores de la parroquia Atahualpa Cantón Quito* (Tesis) (Post-grado). Universidad Politécnica Salesiana, Administración de Empresas. (Quito-Ecuador). 2014. pp. 7-8.

**INEC 2011.** *Reporte estadístico del sector agropecuario*

**INEC.** *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua* [en línea]. Ecuador. INEC, 2017. [Consulta: 04 Junio 2018]. Disponible en:

[http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac\\_2017/Presentacion\\_Principales\\_Resultados\\_ESPA\\_C\\_2017.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Presentacion_Principales_Resultados_ESPA_C_2017.pdf)

**Layton, Cristian.; et.al.** “Bacillus spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos”. *NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS* [en línea], 2011, (Colombia) 9 (15). pp. 177-187. [Consulta: 03 Junio 2018]. ISSN: 1794-2470. Disponible en:

[http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA16\\_ARTREVIS1\\_BACILLUS.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA16_ARTREVIS1_BACILLUS.pdf)

**Maldonado, Fausto.; Burgos, Dominic.; Chávez, Sofía.** “Industria de alimentos y bebidas: la mayor industria del país”. *EKOS*, N° 286 (2018), (Ecuador) pp. 42-43

**Masabni, Josehp.** *Rábanos* [en línea]. Texas 2013. [Consulta: 20 de Agosto del 2018]. Disponible en:

<http://aggie-horticulture.tamu.edu/vegetable/files/2013/09/EHT-042S-radishes.pdf>

**Montañez, Lorimar.; Castro, Charlotte.** *Resistencia de las endosporas de Bacillus en ambientes terrestres y extraterrestres extremos* [en línea]. Japón, 2006. [Consulta: 20 de Agosto del 2018]. Disponible en:

<http://www.uprh.edu/salterns/geomicrobiolgy/Resistencia%20de%20las%20Endosporas.pdf>

**NOTAS TÉCNICAS DE PREVENCIÓN NTP-1.054.** Gestión de residuos: clasificación y tratamiento. Parte 2: Definiciones

**NTE INEN 392-2012.** *Conservas vegetales*. Primera Edición

**Ohno, Akihiro.; Ano, Takashi.; Shoda, Makoto.** “Production of the Antifungal Peptide Antibiotic, Iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in Solid State Fermentation”. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [en línea], 1993, (Japón) vol. 75, pp. 23-27. [Consulta: 20 de Agosto del 2018]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0922338X93901725>

**Paredes, Daniel.** *Raphanus sativus* [en línea]. SlideShare, 2014. [Consulta: 04 Junio 2018]. Disponible en:

<https://es.slideshare.net/danielbombillo/rabano-y-apio>

**Parra, Ricardo.** “Lactosuero: Importancia en la Industria de Alimentos”. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* [en línea], 2009, (Colombia) volumen (62), pp. 4967-4982. [Consulta: 17 de Agosto del 2018]. ISSN 2248-7026. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>

**Ragazzo, Juan.; et.al.** “Selección de cepas de bacillus spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales”. *Chapingo Serie Horticultura*, vol. 17 (2011), (México) pp. 5-11

**Ramos, Florencio.** Cultivo de *Bacillus subtilis* cepa 105 en biorreactor y su actividad antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Tesis) (Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Departamento de Biotecnología. Yautepec, México 2014. pp 17-28. [Consulta: 20 de Agosto del 2018]. Disponible en:

<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12790/Tesis%20Florencio%20Ramos%20G%C3%B3mez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Realpe, María.; Hernández, Carlos.; Agudelo, Clara.** *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica* [en línea]. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 23-05-02. *Bacillus subtilis*. [Consulta: 05 de Septiembre 2018]. Disponible en:

<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1148/1263>

**Romero, Diego.; De Vicente, Antonio.; Rakotoaly, Rivo.** “The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podospaera fusca*”. *The American Phytopathological Society* [en línea], 2007, (España) Vol. 20 (4), pp. 430-440. [Consulta: 05 de septiembre 2018]. DOI: 10.1094. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17427813>

**Suarez, Carolina.** Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula Edodes* (shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional (tesis) (Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 2012. pp. 1-18. [Consulta: 08 de Septiembre 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/8989/1/01107463.2012.pdf>

**Subramaniyam, R.; Vimala, R.** “Solid state and submerged fermentation for the Production of bioactive substances: a comparative study”. *International Journal of Science and Nature* [en línea], 2017, (India) vol (3), pp. 480-486. [Consulta: 08 de Septiembre 2018]. ISSN 2229 – 6441. Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/232041875\\_Solid\\_state\\_and\\_submerged\\_fermentation\\_for\\_the\\_production\\_of\\_bioactive\\_substances\\_a\\_comparative\\_study](https://www.researchgate.net/publication/232041875_Solid_state_and_submerged_fermentation_for_the_production_of_bioactive_substances_a_comparative_study)

**Tamayo, Pablo.; Jaramillo, Jorge.** “ENFERMEDADES DEL TOMATE, PIMENTÓN, AJÍ Y BERENJENA EN COLOMBIA”. Bogotá-Colombia. Carvajal Soluciones de Comunicación S.A.S., 2013, pp. 50-54

**Toit, L J.** “Wilt of Radish Caused by *Fusarium oxysporum* f . sp . raphani in Washington State Plant Health Progress Plant Health Progress”. *Plant Health Progress*, (2003), (United States of America) pp. 1-3.

**Toyota, Koki.; Yamamoto, Koko.; Kimura, Makoto.** “Mechanisms of suppression of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Raphani* in soils so-called suppressive to *Fusarium*-wilt of radish”. *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 40, (1994), (Nagoya) pp. 373-380



## ANEXOS

### Anexo A. ACTA DE ENTREGA DE *Bacillus subtilis*



#### **ACTA DE ENTREGA DE CEPAS**

**Fecha:** 31 de mayo de 2018  
**Entregado por:** Sully Márquez, MsC.  
**Entregado a:** César Stalin Gavin Moyano

Se realiza la entrega de 1 cajas de *Bacillus subtilis*

Nombre científico: *Bacillus subtilis*  
Código del laboratorio: *Bacillus subtilis*  
Origen de la Cepa: cepa comercial usada como controlador biológico, aislada en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad San Francisco.

## Anexo B. ACTA DE ENTREGA DE *Fusarium Oxysporum*



CONSULTORES AGRÍCOLAS  
ASESORAMIENTO TÉCNICO

### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FITOPATOLÓGICO

#### DESCRIPCIÓN DE *Fusarium oxysporum*

De los análisis de material vegetal con síntomas de marchitez vascular de cinco muestras vegetales, se obtuvieron aislamientos de *Fusarium oxysporum*. El aislamiento del patógeno se realizó por replicas sucesivas hasta obtener cultivo puro en medio papa dextrosa agar (PDA), la identificación se la realizó al microscopio mediante las claves proporcionadas en el Compendio de hongos del suelo de K. H. Domsch, W. Gams y Traute H. Anderson. (Fig. 1).

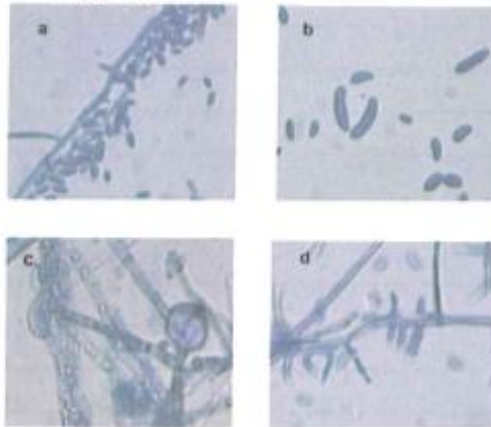


Figura 1. Estructuras microscópicas de *F. oxysporum* (40X): a. Abundantes microconidias (en mayor proporción que macroconidias) de forma alargadas y de una sola célula. b. Macroconidias en forma de media luna y con dos septos. c. Clamidosporas intercalares y d. Abundante Monilioides individuales de tamaño corto.

*Fusarium oxysporum*, perteneciente a la clase deuteromiceto, presenta hifas finas e hialinas, esporodocios donde se agrupan las esporas y gran cantidad de conidios en medio de cultivo PDA, inicialmente se desarrolla una colonia blanca que al envejecer se torna de color violeta a púrpura. Presenta microconidios unicelulares y macroconidios alargados con dos a tres septos y con un tamaño de 25-35 micras de largo y de 3-6 micras de ancho, rectos dorsiventrales o ligeramente falcados, forma células de paredes engrosadas que actúan como estructuras de resistencia denominadas clamidosporas que pueden ser terminales o intercalares, las clamidosporas no poseen septos, miden de 6-15 micras de largo y 2-4 micras de ancho.

  
Dra. Carmen Díaz  
ANALISTA



## Anexo C. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE SUERO LACTEO



### EXAMEN BROMATOLOGICO DE ALIMENTOS

CÓDIGO 159-18

CLIENTE: Sra. María Antoineta Chávez		
DIRECCIÓN:		TELÉFONO:
TIPO DE MUESTRA: Suero lácteo		
FECHA DE RECEPCIÓN: 15 de junio del 2018		
FECHA DE MUESTREO: 15 de junio del 2018		
EXAMEN FISICO		
COLOR: Característico		
OLOR: Característico		
ASPECTO: Normal , libre de material extraño		
PARÁMETROS	MÉTODO	RESULTADO
Proteína %	INEN 543	0.96
Azucares totales %	INEN 398	4.18
Gresa %	INEN 523	0.41
Acidez expresado como ácido láctico %	INEN 013	0.53
OBSERVACIONES:		
FECHA DE ANÁLISIS: 15 de junio del 2018		
FECHA DE ENTREGA : 27 de junio del 2018		
RESPONSABLE:		
		
		
<b>Dra. Gina Álvarez R.</b>		
El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo, el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.		
*Las muestras son receptados en laboratorio.		

**Anexo D. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE RESIDUOS DE MERMELADA**



**EXAMEN BROMATOLOGICO DE ALIMENTOS**

**CÓDIGO 158-18**

CLIENTE: Srta. María Antoñeta Chávez		TELÉFONO:
DIRECCIÓN:		
TIPO DE MUESTRA: Residuos de mermelada		
FECHA DE RECEPCIÓN: 15 de junio del 2018		
FECHA DE MUESTREO: 15 de junio del 2018		
<b>EXAMEN FISICO</b>		
COLOR: Café claro		
OLOR: Característico		
ASPECTO: Normal, libre de material extraño		
<b>PARÁMETROS</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>RESULTADO</b>
Proteína %	INEN 543	2.50
Azucars totales %	INEN 398	3.50
Gresa %	INEN 523	2.75
<b>OBSERVACIONES:</b>		
FECHA DE ANÁLISIS: 15 de junio del 2018		
FECHA DE ENTREGA : 27 de junio del 2018		
RESPONSABLE:		
		
		
Dra. Gina Álvarez R.		
El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo, el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.		
*Las muestras son receptados en laboratorio.		





