



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

Efecto de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal e inoculación como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero

Tesis

Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en
Biotecnología

Autor

Anthony Apolinario Cortez Lázaro

Asesora

Blga. Mg. Hermila Belba Diaz Pillasca

Huacho – Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



UNIVERSIDAD NACIONAL

JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

LICENCIADA

Resolución de consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

INFORMACION

DATOS DEL AUTOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	FECHA DE SUSTENTACION
Anthony Apolinario Cortez Lázaro	74747156	12/01/2024
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Díaz Pillasca Hermila Belba	15601607	0000-0002-2491-3774
DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADO- PREGRADO/POSGRADO-MAESTRIA-DOCTORADO:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Msc. Eduardo Sigifredo Benites Requena	25664823	0000-0003-4764-1000
Blgo. Desiderio Elías Cotos Duran	07243334	0000-0001-7456-5379
Dr. Miguel Ángel Aguilar Luna Victoria	17854491	0000-0003-1699-1913

Efecto de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal e inoculación como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	search.ndltd.org Fuente de Internet	<1 %
2	mdpi-res.com Fuente de Internet	<1 %
3	buleria.unileon.es Fuente de Internet	<1 %
4	oeno-one.eu Fuente de Internet	<1 %
5	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
6	dergipark.org.tr Fuente de Internet	<1 %
7	Submitted to American Public University System Trabajo del estudiante	<1 %

bibdigital.epn.edu.ec

**UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓ
FACULTAD DE CIENCIAS**

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

Efecto de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal e inoculación como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero.

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR:

Dr. William Andrés Guzmán Sánchez

PRESIDENTE

Mg. Miguel Ángel Aguilar Luna Victoria

SECRETARIO

MsC. Eduardo Sigifredo Benites Requena

VOCAL

Mg. Hermila Belba Díaz Pillasca

ASESORA

HUACHO – PERÚ

2024

AGRADECIMIENTO

A mis profesores de la universidad la Dra. Marinoli Rivas, Dr. Miguel Machahua, Dr. Gustavo Sandoval, MsC Luis Santisteban; debo expresar mis más sinceros y profundos agradecimientos por el invaluable apoyo y la dedicación que me brindaron durante sus clases impartidas en mi formación universitaria, por su pasión por la ciencia y su compromiso inquebrantable de brindar una educación de calidad.

A mis compañeros de laboratorio Biotecnología y microbiología agrícola; Adriana Mora, Glenda Gonzales, Julio Casas, Alexis Monjes, Cinthya Saldaña y Adrián Mora por todos los momentos amenos y de arduo trabajo, de la cual me llevo un aprendizaje de cada uno de ustedes.

A liz por sus por sus orientaciones en la línea de interacción microorganismo-planta y sus constantes recomendaciones brindadas en el proceso de ejecución de la tesis, siendo una fuente constante de apoyo y orientación. Gracias por su paciencia y su conocimiento compartido que fue de vital importancia para complementar este trabajo de investigación.

A los chicos del laboratorio de biotecnología; quiero expresar mi más profundo agradecimiento por ser parte tanto del grupo de investigación como de semillero y seguir viviendo experiencias inolvidables. Su dedicación, entusiasmo y compromiso en las actividades han sido fundamentales para el desarrollo de los trabajos experimentales de laboratorio. Les deseo mucho éxito en sus futuros proyectos y que sigan persiguiendo sus sueños con pasión. Expresar un profundo agradecimiento y mis más sinceros deseos de superación a todos ustedes.

A los miembros del jurado; por ser parte de este proceso en la evaluación y brindarme una retroalimentación constructiva a lo largo de la ejecución de la tesis.

Al Sr lagunas Cauzo; técnico de laboratorio que ha sido un gran amigo durante toda mi formación universitaria. Su apoyo y amistad han dejado una huella profunda en todos aquellos que han pasado por la escuela de biología.

A J.J y A.B por las experiencias compartidas durante el proceso.

A lisis...

DEDICATORIA

A Dios
A mi familia

INDICE

AGRADECIMIENTO	5
DEDICATORIA	11
RESUMEN	21
ABSTRACT	23
INTRODUCCION	25
1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	28
1.1. Descripción de la realidad problemática	28
1.2. Formulación del problema	31
1.2.1. Problema general	31
1.2.2. Problemas específicos	31
1.3. Objetivos de la investigación	32
1.3.1. Objetivo general	32
1.3.2. Objetivos específicos	32
1.4. Justificación de la investigación	32
1.5. Delimitaciones del estudio	35
1.6. Viabilidad del estudio	35
2. MARCO TEÓRICO	37
2.1. Antecedentes de la investigación	37
2.1.1. Investigaciones internacionales	37
2.1.2. Investigaciones nacionales	39

2.2. Bases teóricas	41
2.2.1. Descripción del cultivo del maíz “<i>Zea mays</i> L.”	41
2.2.1.1. Taxonomía	41
2.2.2. Biotecnología microbiana	42
2.2.2.1. Alcances y aplicaciones	43
2.2.2.2. Interacción planta-patógeno-ambiente	49
2.2.3. El género <i>Fusarium</i>	50
2.2.3.1. Identificación y clasificación de <i>Fusarium</i> sp.	51
2.2.3.2. Patogenicidad de <i>Fusarium</i> sp.	51
2.2.4. El género <i>Bacillus</i> sp.	52
2.2.4.1. Características generales de <i>Bacillus</i> sp	52
2.2.4.2. Producción y liberación de metabolitos por <i>Bacillus</i> sp.	53
2.2.4.3. Biocontrol del <i>Bacillus</i> sp. sobre <i>Fusarium</i> sp.	54
2.3. Definición de términos básicos	55
2.4. Hipótesis de investigación	57
2.4.1. Hipótesis general	57
2.4.2. Hipótesis específicas	57
3. METODOLOGÍA	60
3.1. Diseño metodológico	60
3.1.1. Tipo de investigación	60
3.1.2. Nivel de investigación	60

3.1.3. Diseño de investigación	60
3.1.4. Enfoque	60
3.2. Población y muestra	60
3.2.1. Población	60
3.2.2. Muestra	60
3.3. Operacionalización de variable	62
3.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos	63
3.4.1. Material biológico	63
3.4.1.1. Reactivación de la cepa de <i>Bacillus sp.</i>	63
3.4.1.2. Conservación de la cepa de <i>Bacillus sp.</i>	63
3.4.2. Caracterización fenotípica de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Fusarium sp</i>	64
3.4.2.1. Pruebas confirmatorias de <i>Bacillus sp.</i>	64
3.4.2.1.1. Prueba de catalasa:	64
3.4.2.1.2. Tinción gran:	64
3.4.2.2. Caracterización morfológica de <i>Fusarium sp.</i>	65
3.4.2.2.1. Caracterización morfológica macroscópica.....	66
3.4.2.2.2. Caracterización morfológica microscópica.....	66
3.4.2.3. Cinética de crecimiento de <i>Fusarium sp.</i>	67
3.4.3. Capacidad de promoción de crecimiento vegetal de <i>Bacillus sp.</i> ..	67
3.4.3.1. Capacidad antagonista a nivel <i>in vitro.</i>	67
3.4.3.2. Capacidad solubilizadora de fosfato	68

3.4.3.3.	Capacidad solubilizadora de Zinc	69
3.4.3.4.	Producción de sideróforos.	69
3.4.4.	Identificación molecular de <i>Bacillus</i> sp.	70
3.4.4.1.	Extracción y cuantificación de ADN microbiano.....	70
3.4.4.2.	Amplificación de región DNA 16s por PCR	71
3.4.4.3.	Electroforesis	71
3.4.4.4.	Secuenciamiento, edición y alineamiento de secuencias.....	72
3.4.5.	Estandarización del del biofungicida a partir de <i>Bacillus</i> sp.	72
3.4.5.1.	Desarrollo de inóculos fermentativos.	72
3.4.5.2.	Desarrollo del biopreparado	72
3.4.5.2.1.	Medios fermentativos líquidos	73
3.4.5.2.1.1.	Biopreparado a base de leche y soya fortificada:	73
3.4.5.2.1.2.	Biopreparado a base de melazas y extracto de levadura.	73
3.4.5.2.2.	Incubación y procesos de fermentación	73
3.4.5.2.3.	Cinética de crecimiento y producción de células.....	73
3.4.6.	Ensayo de efectividad de aplicación a nivel invernadero.....	74
3.4.6.1.	Tratamiento de semillas de maíz.	74
3.4.6.2.	Aplicación de los inoculantes microbianos a la semilla de maíz. 75	
3.4.6.3.	Germinación de las semillas de maíz.....	75
3.4.6.4.	Determinación del efecto del bioinsumo sobre las plántulas.....	76
3.4.6.4.1.	Evaluación de la germinación:	76

3.4.6.4.2. Evaluación de crecimiento:	76
3.4.6.4.3. Evaluación de biomasa:	76
3.5. Descripción de los instrumentos	77
3.6. Técnicas para el procesamiento de la información	79
4. RESULTADOS	81
4.1. Caracterización de cepas microbianas.....	81
4.1.1. Reactivación y conservación de la cepa microbiana.....	81
4.1.2. Pruebas bioquímicas.	82
4.1.2.1. Catalasa	82
4.1.2.2. Tinción gran	83
4.1.3. Caracterización morfológica de <i>Fusarium sp.</i>	83
4.1.3.1. Macroscópica	83
4.1.3.2. Microscópica	84
4.1.4. Cinética de crecimiento de <i>Fusarium sp.</i>	85
4.2. Capacidad de promoción de crecimiento vegetal de <i>Bacillus sp.</i>	86
4.2.1. Capacidad antagonista mediante inhibición directa.....	87
4.2.2. Capacidad solubilizadora de fosfato	89
4.2.3. Capacidad solubilizadora de Zinc.....	90
4.2.4. Producción de sideróforos	90
4.3. Caracterización molecular de las cepas microbianas	91
4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN microbiano	91

4.3.2. PCR y corrida en gel de electroforesis.....	91
4.3.3. Identificación y análisis filogenético	93
4.4. Producción de inóculos en medios fermentativos	94
4.4.1. Incubación y procesos de fermentación	94
4.4.2. Cinética de crecimiento y producción de células de <i>Bacillus</i> sp. ..	94
4.5. Ensayo de aplicación a nivel invernadero.....	96
4.5.1. Determinación del efecto del bioensayo sobre las plántulas.....	96
4.5.1.1. Evaluación en la germinación de semillas de maíz.	96
4.5.1.2. Evaluación de crecimiento:.....	97
4.5.1.3. Evaluación de biomasa:	98
5. DISCUSION.....	102
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	113
6.1. Conclusiones	113
6.2. Recomendaciones	114
7. FUENTES DE INFORMACIÓN.....	116
7.1. Fuentes bibliográficas	116
1.2. Fuentes hemerográficas	135
1.3. Fuentes documentales	135
1.4. Fuentes electrónica	135

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento y desarrollo de la planta de maíz (<i>Zea mays</i> L.)	42
Figura 2. Técnicas de inmovilización de <i>Bacillus</i> spp. en biocarbón	43
Figura 3. Papel de los biofertilizantes en el crecimiento de las plantas.....	44
Figura 4. Aplicaciones de biocontrol de fitopatógenos.	45
Figura 5: Derivados de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos.....	46
Figura 6: Transformación génica por <i>Agrobacterium</i>	48
Figura 7: Mecanismos de acción de la proteína cry Fuente :	48
Figura 8: Composición de las poblaciones microbianas.....	49
Figura 9: Rutas de entrada de <i>Fusarium verticillioides</i> a la planta de maíz.....	50
Figura 10: Ciclo de infección de marchitez por <i>Fusarium</i>	52
Figura 11: Degradación de hongos fitopatógenos por enzimas.	53
Figura 12: Mecanismos de control biológico de cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	55
Figura 13: Diagrama del diseño experimental DCA de los tratamientos.	61
Figura 14: Esquema de diluciones seriadas.....	74
Figura 15: Reactivación y conservación de cepas microbianas.	82
Figura 16: Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus</i> sp.....	83
Figura 17: Estructuras morfológicas de <i>Fusarium</i> sp.....	85
Figura 18: Cinética de crecimiento de la cepa de <i>Fusarium</i> sp.	86
Figura 19 : Extracción y cuantificación de DNA microbiano.	91
Figura 20: PCR y corrida en gel de electroforesis;	92

Figura 21: Identificación y análisis filogenético	93
Figura 22: Incubación y procesos de fermentación líquida.....	94
Figura 23: Cuantificación microbiana mediante biopespectrofotómetro;	87
Figura 24: Capacidad antagonista de <i>Bacillus</i> sp. sobre <i>Fusarium</i> sp.	88
Figura 25: Solubilización de fosfato.....	89
Figura 26: Solubilización de Zinc.....	90
Figura 27: Test de producción de sideróforos	99
Figura 28: Germinación de semillas de maíz	96
Figura 29: Evaluación de biomasa de Maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	98
Figura 30: Test de ANOVA de la biomasa de Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	99
Figura 31: Gráfica de test de Tuckey de los tratamientos de <i>Zea mays</i> L.....	99

INDICE DE TABLAS

Tabla1. Sales empleadas en la elaboración del bioinsumo..... 72

Tabla 2. Lectura de las UFC de dos inóculos fermentativos 95

RESUMEN

En la actualidad es necesario buscar desarrollar nuevas alternativas sostenibles y efectivas para el control de fitopatógenos en los cultivos agrícolas, que promuevan un crecimiento saludable con una perspectiva de agricultura orgánica. Se tuvo como objetivo evaluar el efecto de una cepa de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal y capacidad de biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero. Se realizó la caracterización fenotípica de la cepa de *Bacillus* sp. y de *Fusarium* sp. abarcando aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de ambas cepas, con el fin de obtener una comprensión detallada de sus características distintivas y su comportamiento. Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas *in vitro* para determinar la capacidad de la cepa de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal (PGPR), que involucro la solubilización de fósforo y zinc, producción de sideróforos y evaluación de la capacidad antagonista a nivel *in vitro*. Además, se emplearon marcadores moleculares para identificar y caracterizar a nivel molecular la cepa de *Bacillus* sp. Asimismo, se estandarizó el desarrollo de un biopreparado empleando 2 medio líquidos fermentativos considerando los costos de producción en la masificación. Finalmente, se llevaron a cabo pruebas de eficacia en las que se evaluó la capacidad del biofungicida para reducir el nivel de infección causado por la inoculación de *Fusarium* sp. en maíz cultivada a nivel de invernadero que fue evaluado mediante diversos parámetros. Entre los resultados obtenidos se visualizaron aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de ambas cepas, cuyos caracteres visualizados son propios de los géneros evaluados. La cepa de *Bacillus* sp. demostró ser un promotor de crecimiento vegetal efectivo al solubilizar fósforo y

zinc, producir sideróforos y exhibir capacidad antagonista a nivel *in vitro*. Mediante la identificación molecular y análisis bioinformático se pudo corroborar que nuestra cepa de *Bacillus* sp es *B. amyloliquefaciens* que gracias a su consistencia y estabilidad se empleó como compuesto activo en la elaboración de un biofungicida que nos permitió encontrar la relación del efectos positivos de la cepa de *Bacillus* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz infectadas por *Fusarium* sp confirmando el potencial del biofungicida desarrollado a partir de dicha cepa como un controlador biológico eficiente. Se concluye que la cepa empleada presenta capacidad de promoción de crecimiento vegetal y efecto biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro.

Palabras claves: PGPR, fermentación, control biológico, biología molecular, fitopatógeno

ABSTRACT

In recent years, the need to develop sustainable and effective alternatives for the control of phytopathogens in agricultural crops has increased. This study aimed to evaluate the effect of a *Bacillus* sp. strain as a plant growth promoter and biofungicide against *Fusarium* sp. in maize seedlings (*Zea mays* L.) under greenhouse conditions. Phenotypic characterization of *Bacillus* sp. and *Fusarium* sp. was conducted, encompassing morphological, physiological, and biochemical aspects of both strains, to obtain a detailed understanding of their distinctive characteristics and behavior. Subsequently, *in vitro* tests were performed to determine the plant growth-promoting capacity of the *Bacillus* sp. strain, involving phosphorus and zinc solubilization, siderophore production, and antagonistic evaluation. Molecular markers were employed to identify and characterize the *Bacillus* sp. strain at the molecular level. Efficacy tests were conducted to evaluate the biofungicide's ability to reduce *Fusarium* sp. infection in maize seedlings under greenhouse conditions, assessed through various parameters. The results revealed morphological, physiological, and biochemical features characteristic of the evaluated genera. In the *in vitro* tests, the *Bacillus* sp. strain demonstrated effective plant growth promotion by solubilizing phosphorus and zinc, producing siderophores, and exhibiting antagonistic capacity. Molecular identification and bioinformatics analysis confirmed that our *Bacillus* sp. strain was *Bacillus amyloliquefaciens*, which, due to its consistency and stability, was used as the active compound in the development of a biofungicide. The biofungicide showed positive effects on the growth and development of *Fusarium* sp.-infected maize seedlings, validating the potential of the developed biofungicide as an efficient biological control agent. In

conclusion, the employed strain demonstrated plant growth promotion and biofungicidal effects against *Fusarium* sp. in maize seedlings, emphasizing the importance of utilizing this sustainable biotechnological approach for disease control in crops. This will contribute to promoting more sustainable agriculture, ensuring safe and efficient agricultural production.

Keywords: PGPR, fermentation, Biological Control, Molecular Biology, Phytopathogen

INTRODUCCION

En el ámbito agrícola, el control de fitopatógenos y la promoción del crecimiento vegetal son elementos fundamentales para asegurar la productividad y la salud de los cultivos (Contreras *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2018); por lo que se creó una dependencia ampliamente en el uso de productos químicos sintéticos para el control de enfermedades, lo que ha generado preocupaciones debido a los impactos negativos en el medio ambiente y la salud humana (Rodríguez *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2013). Además, la resistencia de fitopatógenos resistentes a estos productos ha planteado nuevos desafíos en la protección de los cultivos agrícolas (Suaste-Franco *et al.*, 2020).

En este contexto, la búsqueda de alternativas sostenibles y eficaces ha llevado al estudio del efecto de microorganismos beneficiosos en el control biológico en los cultivos agrícolas (Illa *et al.*, 2019; Mondino & Vero, 2006). Por lo que es importante la necesidad de promover un crecimiento saludable de las plantas, asegurar la seguridad alimentaria, proteger el medio ambiente y garantizar la salud pública (Chávez-Díaz *et al.*, 2020).

Dentro de estas alternativas, el uso de microorganismos benéficos ha surgido como una estrategia prometedora (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019). Entre ellos, el género *Bacillus* ha demostrado un gran potencial como promotor de crecimiento vegetal y biofungicida (Portela-Dussán *et al.*, 2013). *Bacillus* sp., una bacteria que se encuentra de forma natural en el suelo, ha mostrado la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, mejorar su resistencia a enfermedades y promover la absorción de nutrientes (Cawoy *et al.*, 2015; Rosas-García, 2009); siendo

objeto de investigaciones debido a su amplia diversidad genética y sus propiedades biológicas beneficiosas en el biocontrol de fitopatógenos (Fernandez-Orietta & Larrea-Vega, 2022). Su capacidad para solubilizar nutrientes esenciales como el fósforo y el zinc, producir metabolitos secundarios activos y competir con otros microorganismos patógenos, lo convierte en un candidato prometedor para el control de enfermedades de los cultivos (Acurio-Vásconez *et al.*, 2020; Blanco *et al.*, 2020; Contreras *et al.*, 2010).

Uno de los fitopatógenos más importantes en los cultivos de maíz es *Fusarium* sp., un hongo que causa enfermedades graves y reduce la productividad de los cultivos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008; Nisa *et al.*, 2021; Syed-Nabi *et al.*, 2021). El control efectivo de *Fusarium* sp. es fundamental para garantizar la calidad y la cantidad de la cosecha de maíz (Liu *et al.*, 2022; Trejo-Escareño *et al.*, 2013). Por lo tanto, la evaluación del efecto de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal e inoculación como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro es de gran relevancia para la agricultura moderna.

Este estudio tuvo como objetivo contribuir al conocimiento científico sobre el uso de *Bacillus* sp. como una alternativa sostenible y efectiva en el control de *Fusarium* sp.; para la cual se realizó una caracterización fenotípica de las cepas de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp., se evaluó la capacidad de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal en condiciones de laboratorio, se estandarizó el desarrollo de un biofungicida y se emplearon marcadores moleculares para identificar y caracterizar a nivel molecular la cepa de *Bacillus* sp.

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

El maíz es una gramínea originaria de Mesoamérica, cuya práctica de domesticación data de hace 7 000 a 10 000 años (Ortega, 2014). Es considerado un cultivo tradicional desde épocas prehispánicas, también conocida como “Sara” o “Kuri” (Iglesias *et al.*, 2018), es uno de los 3 cereales más importantes y también una de las *poaceas* más cultivadas a nivel mundial que genera un gran aporte en la seguridad alimentaria, constituyendo una fuente de nutrientes fundamental en las poblaciones rurales y urbanas (Lázaro *et al.*, 2020). Según la FAO (2008) se siembra alrededor de 1 720 000 hectáreas en el mundo, cualidades que lo caracterizan como uno de los cultivos de mayor importancia económica por su elevado consumo, alta rentabilidad y la gran cantidad de puestos de trabajo que genera su producción.

A nivel nacional, es el segundo cultivo con mayor índice de siembra, alcanzando una producción de 326 532 hectáreas con tendencias alcistas para los próximos años según MINAGRI (2019); de las cuales el 52 % es el maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) que son procesados en forma de cereal y harinas precocidas; asimismo es muy demandado como alimentos para animales por su elevado valor nutricional y bajos costos de producción (López-Morales *et al.*, 2019) . El uso de maíz híbrido como resultado del fitomejoramiento beneficia a la producción agrícola por sus altos índices de productividad y por ende ganancias económicas (Chura & Tejada, 2014).

Cabe mencionar que este cultivo es susceptible a plagas y enfermedades que inducen a la pérdida de productividad del maíz, encontrándose problemas fitosanitarios, ocasionado por diversos fitopatógenos que causan daños a los cultivos agrícolas en la cual se encuentra a virus, bacterias, nematodos y hongos, siendo este último el que mayor daño ocasiona a la producción agrícola. A nivel mundial los

hongos fitopatógenos son los responsables directos de originar pérdidas económicas que ascienden a miles de millones de dólares anuales (Cristóbal *et al.*, 2013), que conllevan a una pérdida constante en la producción agrícola, dentro de dicho grupo encontramos al género *Fusarium* (Hernández-Delgado *et al.*, 2007), causante de daños en diversas etapas de cultivo, en estado de semilla causa disminución en la tasa germinación ocasionando la muerte del embrión y en la etapa adulta coloniza la mazorca ocasionando su daño a los tejidos vegetales y provoca pudrición radicular y vascular, causando una disminución del sistema radicular en las plantas en más del 90 % afectando la calidad y producción de la planta; se encuentra presente en todas las regiones en donde se practica su cultivo (Hernández Juárez *et al.*, 2016), llegando a ocasionar pérdidas entre el 10 al 30 % del rendimiento en la producción agrícola.

Para contrarrestar el daño producido por estos fitopatógenos se usan agroquímicos, como un método de control en el tratamiento agrícola, sin embargo, un mal manejo sin adecuadas políticas de regulación, su excesivo uso ocasiona problemas de salud pública y daños ambientales; por su alto índice de toxicidad y residuos de plaguicidas que permanecen por un largo periodo de tiempo en el ambiente, dañando así de forma paralela a los microorganismos benéficos presente en el lugar de aplicación de dichos productos sintéticos (Guerrero-Padilla, 2018).

Independientemente del control de los fitopatógenos, dichos productos van a afectar simultáneamente a la microbioma presente, el 10 % de los pesticidas usados tiene su efecto solamente sobre el microorganismos patógeno sin embargo el resto se distribuye sobre el agua, y a nivel del suelo se deposita elevados niveles de residuos tóxicos, afectando a la microbiota benéfica, debido a que carece de selectividad y especificidad (Silveira-Gramont *et al.*, 2018); estos se dispersan en el

ambiente ocasionando daño a la salud de los trabajadores debido a un adecuado implemento de bioseguridad y por la exposición a cantidades excesiva de pesticidas. Cabe señalar que varios de los agroquímicos usados en la actualidad han sido prohibidos y su uso ha sido restringido en algunos países, sin embargo, en nuestro país continúan empleándolo como controlador (Silveira-Gramont *et al.*, 2018); por lo que se debe inculcar una práctica agrícola eco amigable; dicha situación causa preocupación debido a que la población carece de un conocimiento real de los problemas asociados a una falta de regulación de agroquímicos que son empleados en la aplicación de diversos cultivos agrícolas (Delgado-Zegarra *et al.*, 2018).

A nivel mundial la demanda por cultivos comestibles de calidad exentos de pesticidas de origen químico dañinos va en aumento (Asela *et al.*, 2014), por lo que es importante introducir las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) como una alternativa de desarrollo sustentable para el control de fitopatógeno y la obtención de una agricultura orgánica. La tecnología del control biológico consiste en emplear microorganismos benéficos como una opción eco amigable con el ambiente y la salud de las personas. Dichos microorganismos benéficos presentan potencial antagonista; tal es el caso del género *Bacillus*, que produce compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica haciendo referencia a las “micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, fungistáticas y micosubtilinas” (Souto *et al.*, 2004). *Bacillus amyloliquefaciens* presenta la capacidad de estimular el crecimiento y promover el desarrollo de cultivos de maíz por medio de su capacidad de fijación de nitrógeno, por lo que es usado como controlador biológico en el tratamiento de fitopatógenos; asimismo suministran nutrientes a la planta induciendo a la producción de fitohormonas, e inhiben la actividad de fitopatógenos por lo que se debería considerar como una potencial

opción a ser usadas como un bioinsumo empleado en el control de fitopatógenos (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020).

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

- ¿Cuál es el efecto de la cepa de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal y su potencial como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero.

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cómo se puede caracterizar fenotípicamente la cepa de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp.?
- ¿Cuál es la capacidad de la cepa de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal (PGPR) a nivel in vitro?
- ¿Cómo se puede identificar a nivel molecular la cepa de *Bacillus* sp. empleando marcadores moleculares?
- ¿Cuál es el proceso de estandarización en el desarrollo de un biofungicida a partir de la cepa de *Bacillus* sp.?
- ¿Cuál es la respuesta del cultivo de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) ante la inoculación del biofungicida en condiciones de invernadero?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto la cepa de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal y su potencial como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero.

1.3.2. Objetivos específicos

- Realizar una caracterización fenotípica de la cepa de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp.
- Evaluar la capacidad de *Bacillus* sp. como promotor de crecimiento vegetal (PGPR) a nivel *in vitro*.
- Realizar la identificación a nivel molecular la cepa de *Bacillus* sp. empleando marcadores moleculares.
- Establecer un protocolo de estandarización para el desarrollo de un biofungicida a partir de la cepa de *Bacillus* sp.
- Evaluar la respuesta del cultivo de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) ante la inoculación del biofungicida en condiciones de invernadero.

1.4. Justificación de la investigación

En la actualidad se debe optar por una agricultura sostenible haciendo uso de tecnologías eco amigables con el ambiente y la salud del consumidor; sin embargo los cultivos agrícolas comestibles son susceptibles a numerosas plagas que poseen distintas formas de infección e interacción por lo cual se usa plaguicidas de origen químico, cuyo excesivo uso y una falta de política de regulación contribuye a una crisis en la agricultura dificultando la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales y la salud de los consumidores en general. Blanco *et al.*, (2020) mencionan

que la agricultura es fundamental para genera bienestar social y que la falta de una adecuada política sumado a un uso indiscriminado de agroquímicos derivados de síntesis química afecta el ambiente a través de la emisión de gases de efecto invernadero; reportándose casos de intoxicación y daños a la salud humana; por lo que se debe de dar un nuevo enfoque en estas prácticas, con el propósito de buscar agrupar al consumidor, su salud y la producción agrícola; usando un óptimo manejo integrado de plagas (MIP), con el fin de impulsar a la mayor productividad de cultivos orgánicos (Asela *et al.*, 2014).

En nuestro país; el maíz es el segundo producto agrícola más cultivado después de la papa, debido a su valor estratégico y su papel fundamental en la alimentación humana y animal. Según el MINAGRI (2020) estima que la siembras ascienden a 280 400 hectáreas, de las cuales el 56 % pertenece al maíz amarillo duro, y que presenta una tendencia al incremento en los próximos años (Morales *et al.*, 2018), siendo un cultivo estratégico de gran importancia agrícola, económica y nutricional; sin embargo, se reportan perdidas ocasionados por fitopatógenos que disminuyen la producción agrícola (Méndez-Úbeda *et al.*, 2018; Vélez & Zambrano, 2012).

Entre los principales fitopatógenos que atacan el cultivo de maíz encontramos a los hongos del género *Fusarium*, que se considera como uno de los problemas fitosanitarios más importantes en los cultivos de maíz a nivel mundial, debido a su alta tasa de infección (González-Sandra *et al.*, 2016; Martínez-Solórzano *et al.*, 2020). Chavarri *et al.*, (2017) menciona que este género es causante de la pudrición en la raíz, tallos y mazorca en cualquiera etapa de cultivo de la planta a la vez desarrolla clamidosporas; el cual es un indicador de su alto nivel de adaptación a cambios de condiciones ambientales como temperatura y humedad (Suaste-Franco *et al.*, 2020), lo que induce a su capacidad de adaptación y supervivencia durante largos periodos

de tiempo, por lo que un tratamiento a base de control biológico usando microorganismos sería una potencial opción para mitigar el proceso infectivo hacia la planta y las interacciones de antibiosis entre *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp..

Diversos estudios sostienen que el género *Bacillus* presenta potencial como controlador biológico sobre fitopatógenos de cultivos de intereses agrícolas y económicos; mediante mecanismos como la excreción de antibióticos, producción de sideróforos, capacidad de inducir resistencia sistémica, producción de enzimas líticas, etc. (Layton C. *et al.*, 2011), la capacidad de adaptación al estrés biótico y abiótico induce a la formación de endosporas de *Bacillus amyloliquefaciens* le permitirá diseminarse y prevalecer en los ecosistemas, creciendo de manera exponencial mediante fisión binaria por las condiciones ambientales, además sintetiza sideróforos y regulan la concentración de hierro mediante la quelación, evitando de esta manera que los microorganismos fitopatógenos absorban hierro para su metabolismo y desarrollo generando una competencia de nutrientes entre los microorganismos asociados a la planta (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

Por lo que en esta investigación se enfoca en evaluar el efecto de *Bacillus* sp. sobre *Fusarium* sp. en plántulas de híbridos de Maíz amarillo duro, con el fin de evaluar si el bioinsumo tiene efecto de biocontrol sobre el *Fusarium* sp. presente en las plántulas para poder extrapolar a nivel de campos de cultivos y usarlo en otros cultivos de interés local, regional y nacional; con el propósito de lograr reducir el índice de pérdidas en la productividad, mejorar la calidad del cultivo, generar mayores ingresos económicos y preservar el cuidado de la biodiversidad. Castañeda & Sánchez (2016); mencionan que el manejo de plagas usados por los agricultores ha demostrado ser muy deficientes por el aumento de resistencia de los fitopatógenos; por lo que la aplicación de esta tecnología permitirá aprovechar los mecanismos de

las reacciones metabólicas, bioquímicas y mecánicas de *Bacillus* sp. en la inhibición del *Fusarium* sp. sin alterar el equilibrio ecológico, evitando daños agrícolas e impulsando una agricultura sostenible.

1.5. Delimitaciones del estudio

La primera fase de la ejecución de esta investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología y microbiología agrícola de la empresa CONERDAL S.A.C ubicado en el distrito de Chincha Baja, provincia de Chincha, región de Ica; mientras que la segunda parte se desarrolló en el Instituto de Investigación de Desarrollo de Ceja de Selva- UNTRM, provincia de Chachapoyas, región de Amazonas. La investigación de estudio se delimitará con el estudio del efecto de *Bacillus* sp. sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. a nivel *in vitro* e *in vivo* y su capacidad de promoción de crecimiento vegetal

1.6. Viabilidad del estudio

La presente investigación será financiada por CONERDAL, empresa dedicada a la producción de insumos biológicos a base de microorganismos benéficos para la agricultura y por el Instituto de Desarrollo Sostenible de Ceja de Selva.

CAPITULO II: MARCO

TEORICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Investigaciones internacionales

Cruz *et al.*, (2021), evaluaron la actividad antifúngica a nivel *in vitro* de los filtrados *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa CCIBP-A5 sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* mediante la medición del porcentaje de antibiosis y la evaluación de los efectos inhibitorios sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* a nivel *in vitro* bajo condiciones controladas de laboratorio, proponiendo el uso de *Bacillus amyloliquefaciens* como un microorganismo benéfico en la agricultura mediante la bioformulación de un producto comercial para aplicación en nivel de campos de cultivo para manejar la marchitez ocasionado por *Fusarium* spp.

Rodríguez-Hernández *et al.*, (2020) aislaron y caracterizaron cepas nativas de *Bacillus* spp. procedentes de la raíz de maíz forrajero, enfocándose en la selección de cepas fijadoras de nitrógeno; asimismo realizaron la extracción de ADN usando 16S rDNA para su posterior secuenciación. Para la actividad de evaluación en campos de cultivo de maíz forraje, lo realizaron en 2 ciclos agrícolas de primavera-enero y otoño-invierno; e inocularon los bioformulados a base de microorganismos del género *Bacillus* a 110 semillas de maíz con un volumen de 15 mL. Finalmente, de la lectura obtenida de la secuenciación mediante 16S rDNA identificaron las especies de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* que mostraron cepas de estimulación en el desarrollo vegetal del cultivo de maíz híbrido.

Yang *et al.*, (2020) estudiaron el desarrollo de las bacterias endófitas con fines benéficos para aumentar la producción de los cultivos maíz y la calidad, para la cual identificaron las bacterias endófitas mediante análisis filogenético del gen *gryA* y rRNA 16S que basado en un análisis taxonómico encontraron una alta similitud entre

sus secuencias estudiadas perteneciente al género *Bacillus*, asimismo realizaron tipificación de cepas endófitas y mediante la técnica RAPD usaron cebadores universales. Sus cepas nativas endófitas presentaron actividad antagonista frente a cepas de hongos patógenos de *Talaromyces funiculosus*, *Penicillium oxalicum* y *Fusarium verticillioides*. La diversidad de endófitos bacterianos asociados a la germinación del maíz permitiría identificar el mecanismo de inhibición de las bacterias sobre los hongos fitopatógenos de interés de su investigación.

Cobo (2017) realizó un estudio de evaluación de medios de cultivo líquidos de bajos costos para la multiplicación de *Bacillus subtilis*, para la cual establecieron cuatro sustratos diferentes; el primer sustrato a base de leche azucarada adicionada con un caldo base rico en minerales, el segundo sustrato a base del subproducto lacto suero, el tercer sustrato a base de bebida de soya fortificada y el cuarto sustrato a base de un medio de levadura activada. Los investigadores sometieron los tratamientos bajo un sistema de fermentación y agitación continua con diluciones seriadas consecutivas y recuentos de esporas. Resultando el sustrato a base de bebida fortificada con soya el más efectivo y con un costo de producción menor para la multiplicación de *Bacillus subtilis* comparativo con productos comerciales.

Álvarez *et al.*, (2012) investigaron los compuestos antifúngicos de cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con capacidad de biocontrol y PGPR, para la cual realizaron purificación RP-HPLC, evaluación de actividad antagonista y bioensayos en campo en cultivos de planta de Soja, obteniendo como resultados que mediante una aplicación a nivel foliar de cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* producen compuestos antifúngicos y es una potencial opción de biocontrol sobre pudrición del tallo causado por la enfermedad de esclerotinia que es considerada una de las principales enfermedades a nivel mundial.

Méndez-Úbeda *et al.*, (2018) evaluaron la actividad antagonista a nivel *in vitro* del género *Bacillus* frente a *Fusarium equiseti* y *Alternaria alternata* de insumos biológicos que aislaron mediante diluciones seriadas y evaluación morfológica en agar nutritivo (AN); realizaron ensayos de antagonismos mediante cultivos duales que inhibieron en un rango de 83 % y 100 % en un periodo de 14 días; e identificación molecular del ADN genómico mediante secuenciamiento del 16S rADN e ITS en la que identificaron especies de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tumefaciens*, *Bacillus succinus* y *Bacillus cereus*.

2.1.2. Investigaciones nacionales

Chanta & Ruiz (2018) aislaron cepas del género *Bacillus* para determinar su potencial en el control biológico del fitopatógeno *Fusarium*, mediante aislamiento e inoculación del suelo, donde se sembró las semillas de tomate, para establecer su patogenicidad. A este género de bacilos se le determinó su efecto antagonista *in vitro* mediante métodos de enfrentamientos duales. En condiciones de invernadero se determinó el efecto del género *Bacillus* y en el control de *Fusarium* spp. el porcentaje de plántulas de tomate germinados, observando un incremento en la sobrevivencia y en la evaluación de la biomasa de las plantas estudiadas.

Díaz-Camezán (2019) realizó aislamientos de cepas nativas de *Bacillus* y *Trichoderma* de rizosfera de café con capacidad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*; evaluando 30 cepas de *Bacillus* spp. y 20 cepas de *Trichoderma* spp. que determinaron su capacidad antagonista frente al patógeno *F. oxysporum* mediante enfrentamientos duales en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA). Asimismo, realizaron identificación por pruebas bioquímicas, caracterización macroscópica y microscópica a las cepas con actividad antagonista y se identificó por claves taxonómicas; finalmente concluyeron que de las cepas aisladas de *Bacillus* spp. y

Trichoderma spp. respectivamente, tienen potencial como controladores biológicos en el tratamiento de pudrición vascular en cultivos de café.

Arcos & Zúñiga (2015), evaluaron el efecto de PGPRs de dos cepas de *Bacillus subtilis* en cultivos de *Rhizoctonia solani*, en la cual infestaron 1m² de suelo con *R. solani* bajo condiciones de invernadero; en la que evaluaron índices de mortalidad, altura, rendimiento de tubérculos en Kg/m², incidencia y severidad en suelos infectados con *R. solani*, sin inoculación de *R. solani* y suelo infectado con *R. solani* y bacterias PGPRs; en la que observaron un daño de hasta 30 % de severidad en cultivos infectados con *R. solani* a diferencia del tratamiento con bacterias PGPRs que su severidad disminuyó al 6,76 %; demostrando de esta manera que la inoculación de cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* presentan efectos inhibitorios sobre cultivos infectados con *R. solani*.

Álvarez *et al.*, (2018) describieron la incidencia de la aplicación en campo de microorganismos con potencial de biocontrol en plantas de *Fragaria* sp. colectados en tres diferentes pisos altitudinales, a nivel *in vitro* se inoculó la solución madre y se dejó fermentar con el fin de generar un microbioma identificándose levaduras y bacterias del género *Bacillus* y *Lactobacillus* en los 12 tratamientos, usando medios selectivos e identificación molecular mediante amplificación del 16S usando PCR. Posteriormente inocularon bioformulados de los microorganismos benéficos al 5% en cultivos de fresa para la evaluación de control biológico, y corroboraron el efecto benéfico de los microorganismos presentes de la colecta de los 3 pisos altitudinales.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Descripción del cultivo del maíz “*Zea mays* L.”

Pertenece a la familia de las de las *Poaceae*, es una planta monocotiledónea que se cultiva a nivel mundial debido a su gran importancia en la industria alimentaria y de forraje, en la actualidad la práctica de la siembra se extiende por muchas regiones de clima templado y cálidos, en todas las épocas del año (Ortega, 2014).

2.2.1.1. Taxonomía

Según TERÁN (2008), la clasificación botánica del maíz es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *Zea mays* L.

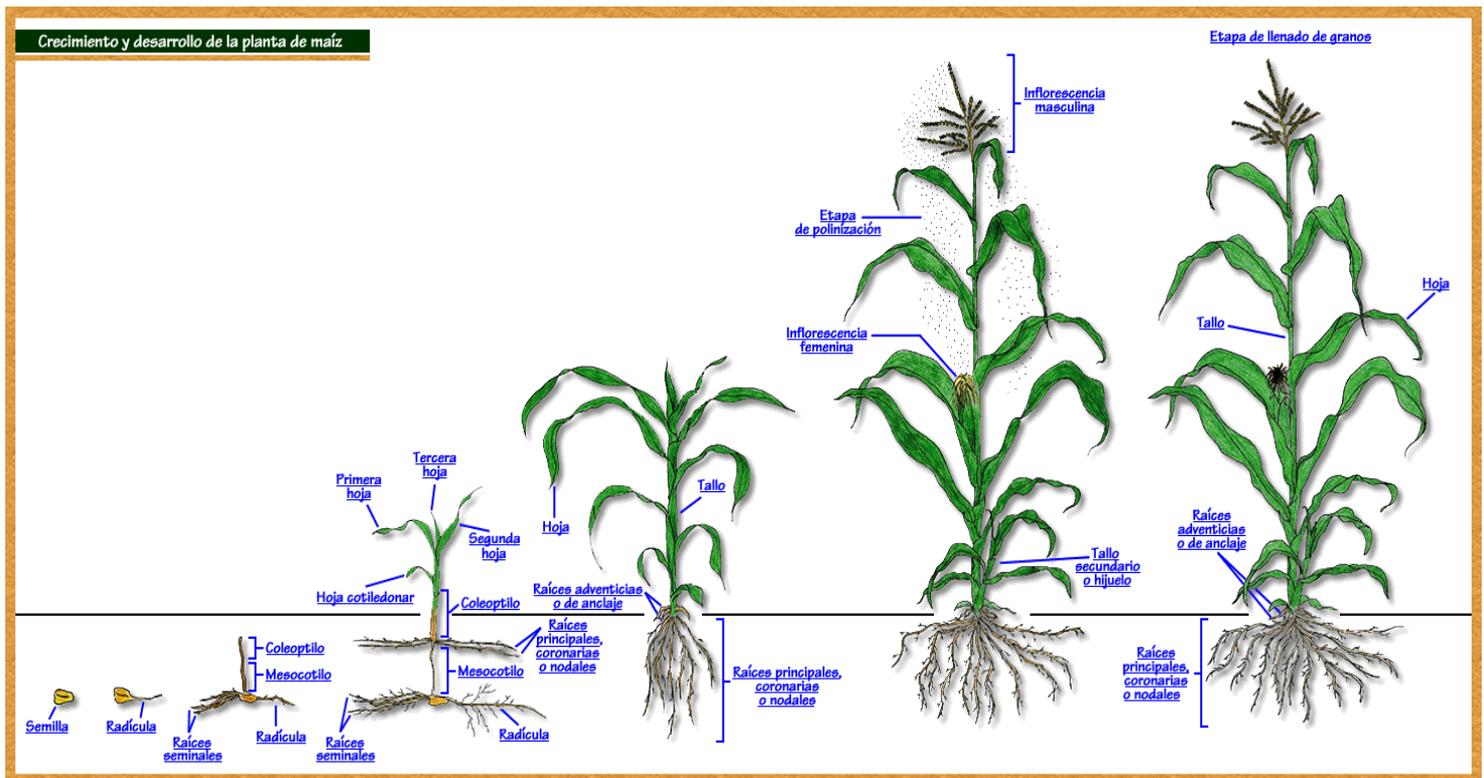


Figura 1. Crecimiento y desarrollo de la planta de maíz (*Zea mays* L.)

2.2.2. Biotecnología microbiana

Los microorganismos como las bacterias y hongos poseen una increíble diversidad y habilidades metabólicas que mediante el uso de la biotecnología pueden ser empleadas para el desarrollo de soluciones innovadoras. Santomartino *et al.*, (2023) plantean que la idea de utilizar biotecnologías microbianas como una estrategia especialmente adecuada para establecer procesos sostenibles que aprovechen los recursos in situ; además que el desarrollo de esta biotecnología podrá emplearse para abordar problemas ambientales y contribuir así a los ODS establecidos por las Naciones Unidas. Sin embargo, su aplicación a nivel industrial sigue siendo un gran desafío que se debe superar (Ding & Ye, 2023). Los últimos avances en biotecnología microbiana tienen el potencial de impulsar el desarrollo económico y social al mismo tiempo que promueven la conservación de recursos y la protección del medio

ambiente. Ding & Ye (2023) afirman que primero se necesitar comprender los diversos mecanismos fisiológicos para lograr expandir el potencial de producción de microorganismos. En este sentido Schommer *et al.* (2023) plantean que la inmovilización de microorganismos surge como una alternativa para mitigar el estrés que ejercen sobre los microorganismos a condiciones ambientales lo que permitiría mejorar la función y el desempeño de su aplicación. Figura: Técnica de inmovilización de *Bacillus* spp. en Biochar.

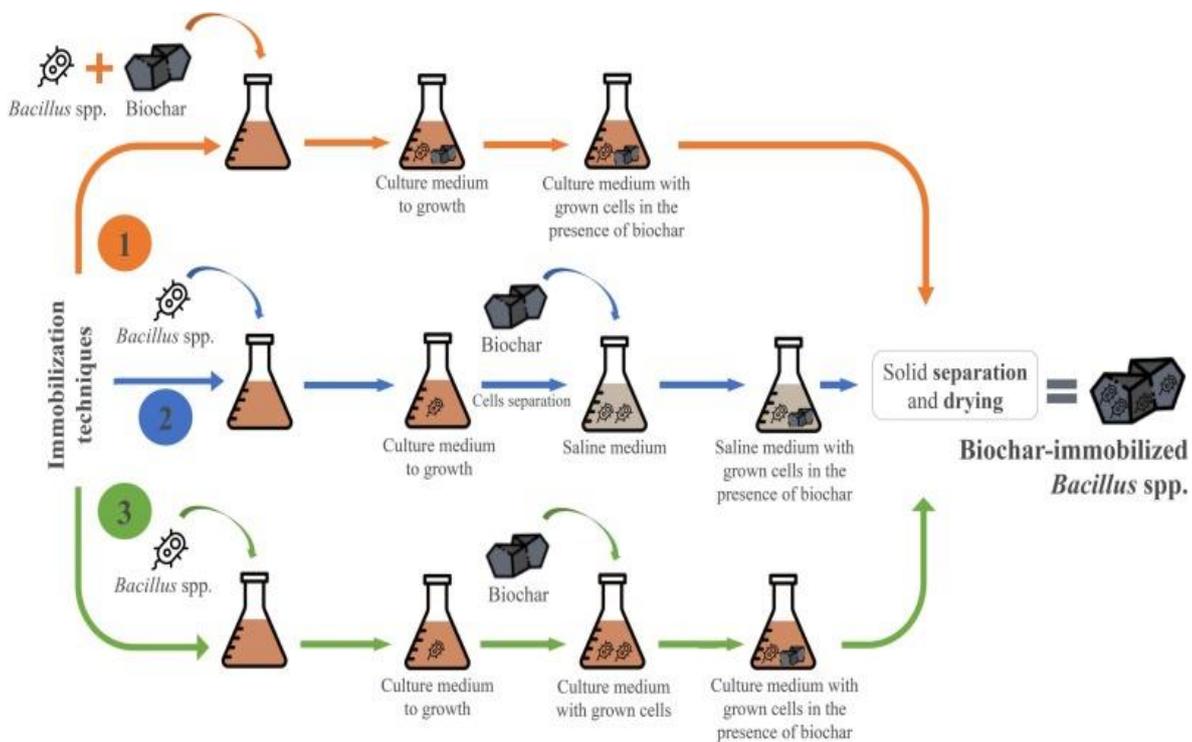


Figura 2. Técnicas de inmovilización de *Bacillus* spp. en biocarbón

Fuente: (Schommer *et al.*, 2023)

2.2.2.1. Alcances y aplicaciones

El uso de microorganismos beneficiosos y técnicas biotecnológicas puede ayudar a mejorar la productividad agrícola, reducir el uso de productos químicos y promover prácticas más sostenibles en la agricultura. Las interacciones entre plantas, microorganismos y sus asociaciones beneficiosas son reconocidas por su capacidad para eliminar contaminantes dañinos tanto en la parte aérea de las plantas (filosfera)

como en sus raíces (rizosfera) (Maurya *et al.*, 2023) . Cuando se introducen plantas y microorganismos específicos en ambientes contaminados, los microbios asociados ayudan a que las plantas prosperen y, al mismo tiempo, reducen los niveles de contaminación (Valderrama *et al.*, 2015).

Entre las aplicaciones más conocidas encontramos a:

Biofertilizantes:

Los microorganismos beneficiosos, como las bacterias fijadoras de nitrógeno, las solubilizadora de Zinc y fosforo; pueden ser utilizados como biofertilizantes para mejorar la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Cough-Moo *et al.*, 2022) . (Leite *et al.*, 2022) afirman que estos microorganismos pueden promover el crecimiento de las raíces, aumentar la absorción de nutrientes y mejorar la salud de las plantas.

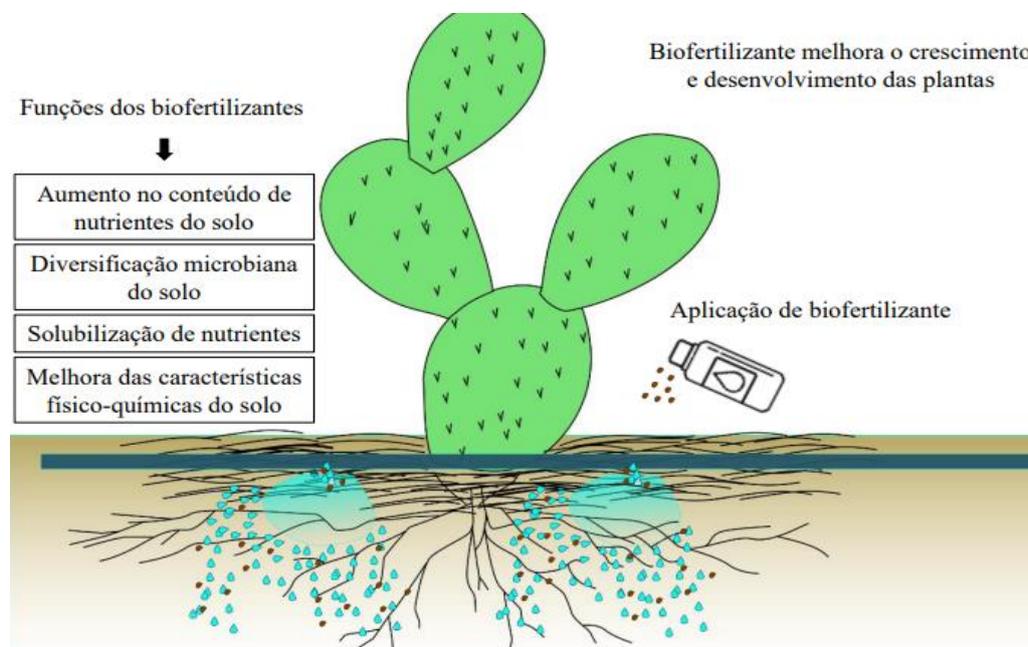


Figura 3. Papel de los biofertilizantes en el crecimiento de las plantas.

Fuente: (Leite *et al.*, 2022)

Biocontrol de plagas y enfermedades:

Los microorganismos antagonistas, como ciertas cepas de bacterias y hongos, pueden utilizarse como agentes de biocontrol para combatir plagas y enfermedades de las plantas. Pérez-Luna & Alvarez-Solis (2021), afirman que estos microorganismos pueden inhibir el crecimiento de organismos patógenos o producir compuestos que los controlen generando impactos positivos por la introducción de microorganismos benéficos, evidenciando también la relevancia de incluir cultivos de cobertura para aumentar el rendimiento agrícola.

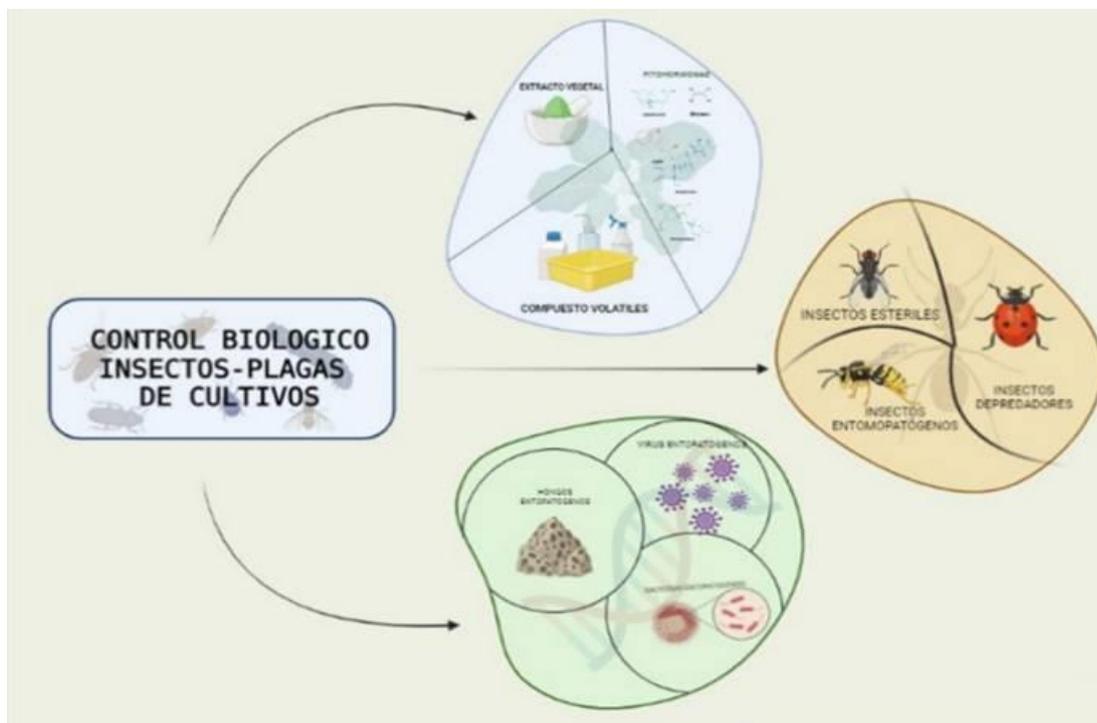


Figura 4. Aplicaciones biotecnológicas empleadas en el biocontrol de fitopatógenos.

Fuente: Pérez-Luna & Alvarez-Solis (2021)

Descomposición de residuos agrícolas:

Estos microorganismos ayudan a descomponer los residuos y liberar nutrientes al suelo, mejorando así la fertilidad, destacan por su capacidad de producción de

diversos metabolitos de interés biotecnológico y ambiental; principalmente por sus sistemas de fermentación para la degradación de residuos lignocelulósicos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), que a nivel in vitro se podría optimizar mediante el uso de biorreactores mejorando así las condiciones de cultivo y maximizar la producción de biomasa (Ramos, 2014).

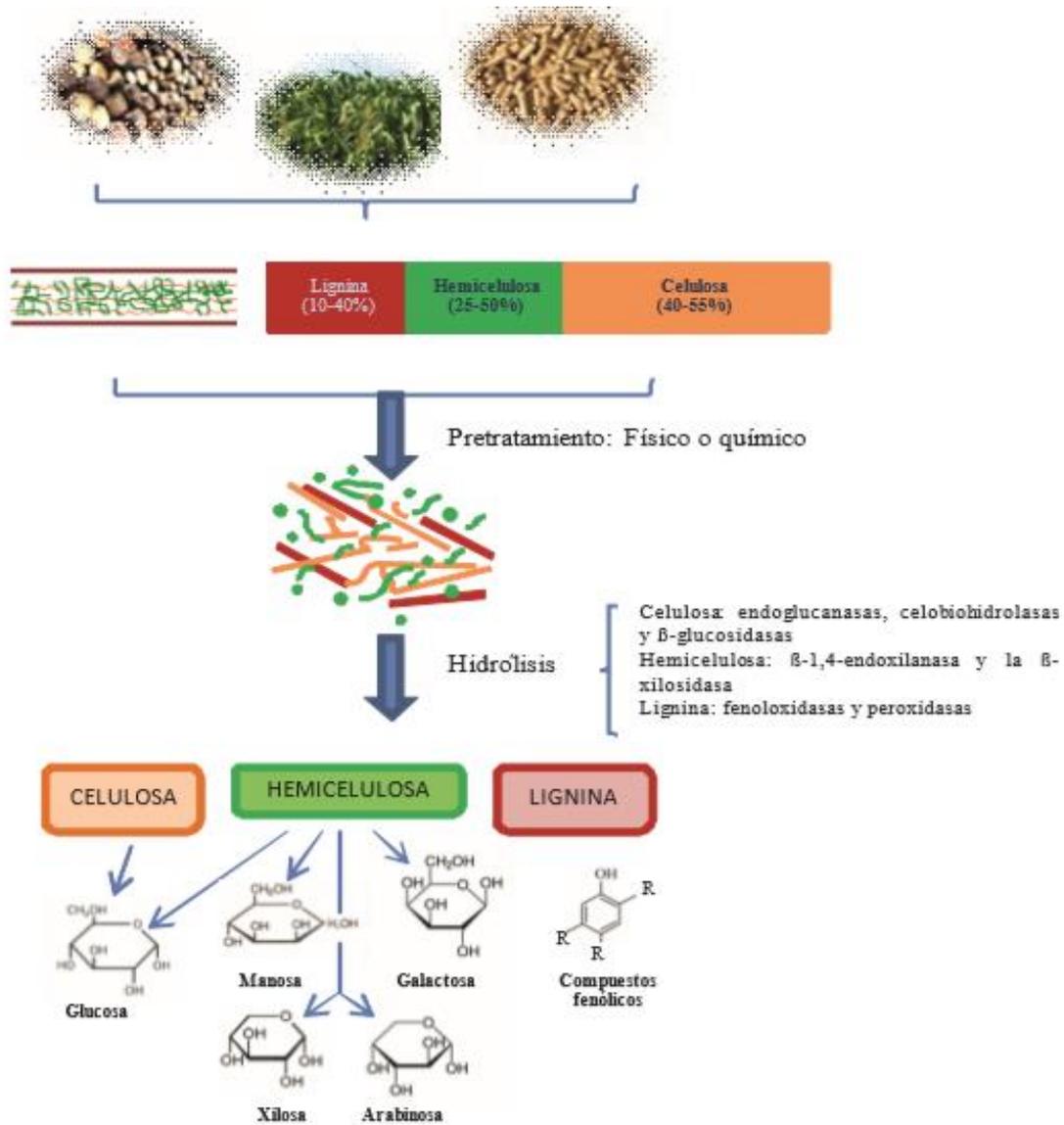
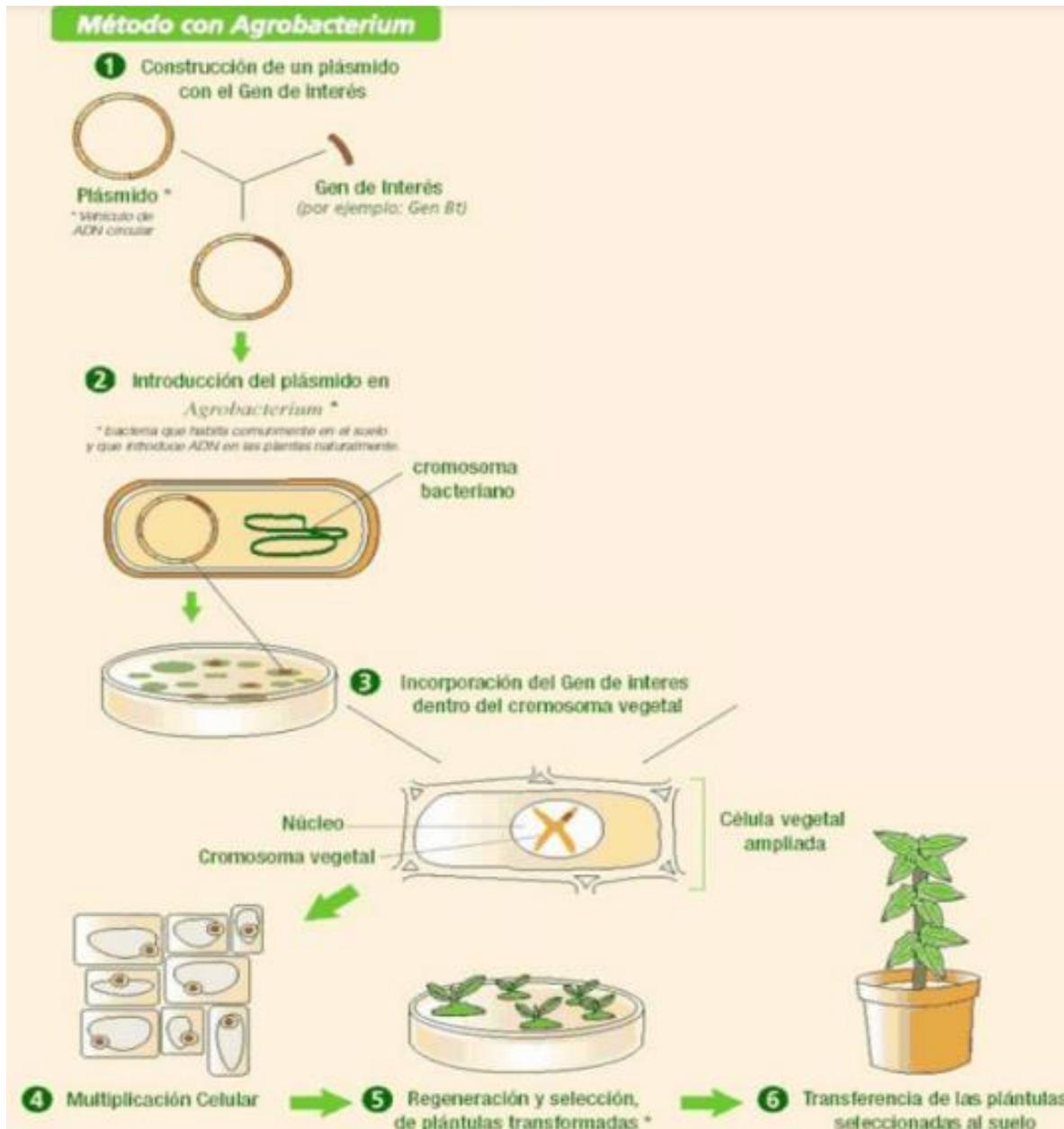


Figura 5: Derivados de la hidrólisis enzimática a partir de residuos lignocelulósicos.

Fuente: (Hernández-Melchor *et al.*, 2019)

Mejora de cultivos:

La ingeniería genética microbiana puede utilizarse para desarrollar microorganismos modificados genéticamente que pueden ayudar a mejorar características deseables en los cultivos buscando transferir información genética entre individuos no emparentados (ArgenBio, 2021), para adquirir la resistencia a enfermedades, la tolerancia al estrés y la calidad de los productos agrícolas; dicho proceso es mediante



una Transformación mediada por un vector biológico a partir de *Agrobacterium tumefaciens* (Valderrama et al., 2015).

Figura 6: Transformación génica por *Agrobacterium*

Fuente:(ArgenBio, 2021)

Producción de biopesticidas:

Los microorganismos pueden ser utilizados para producir biopesticidas, que son alternativas más seguras y respetuosas con el medio ambiente a los pesticidas químicos. Estos biopesticidas pueden ser eficaces para controlar plagas y enfermedades de los cultivos sin causar daño a otros organismos que no son de nuestro interés, a diferencia de la contraparte de los pesticidas de origen sintético que su uso sin una adecuada política de regulación es muy dañino para el ambiente y la salud pública.

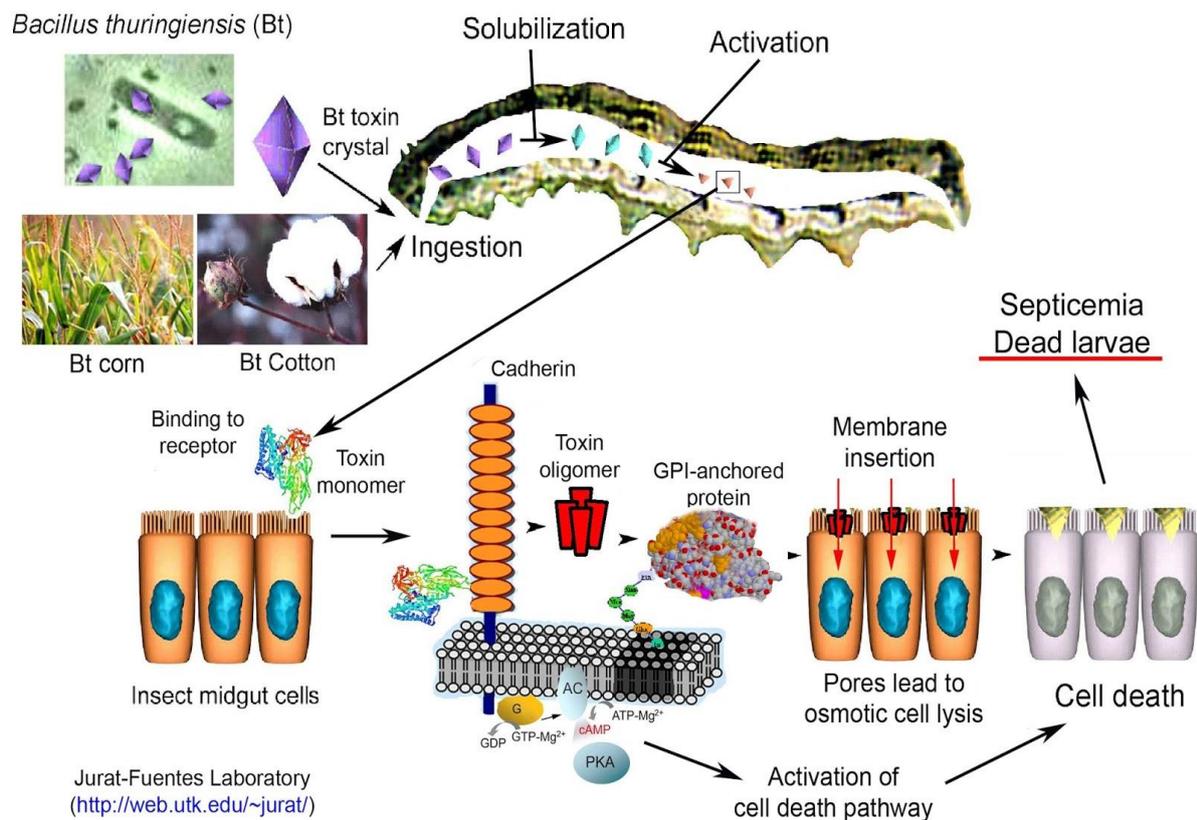


Figura 7: Mecanismos de acción de la proteína cry

2.2.2.2. Interacción planta-patógeno-ambiente

Los organismos superiores no se encuentran solos, actúan en estrecha relación con el microbiota asociada a ella, por lo que las plantas bajo condiciones naturales interactúan constantemente con fitopatógenos que podrían ocasionar daños a la planta (Bautista *et al.*, 2018). Diaz-Camezan, (2019) mencionan que las plantas están asociadas a microorganismos rizosférico y ambientales que le proporcionan sistemas de resistencia y defensa, dichos factores pueden influir de manera significativa en la dinámica de las interacciones ya sea a través de factores abióticos o factores bióticos; sin embargo (Madriz., 2002) resalta la importancia de la especificidad dependerá del genotipo entre la planta y el organismo patógeno que se describiéndolo como interacciones biotróficas.

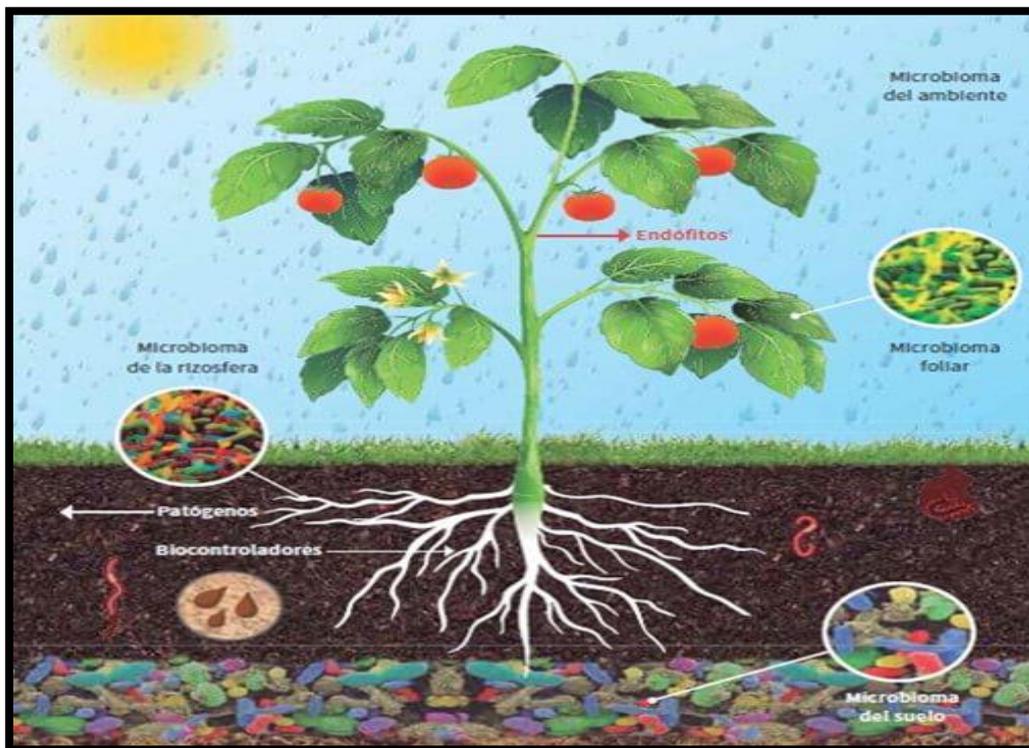
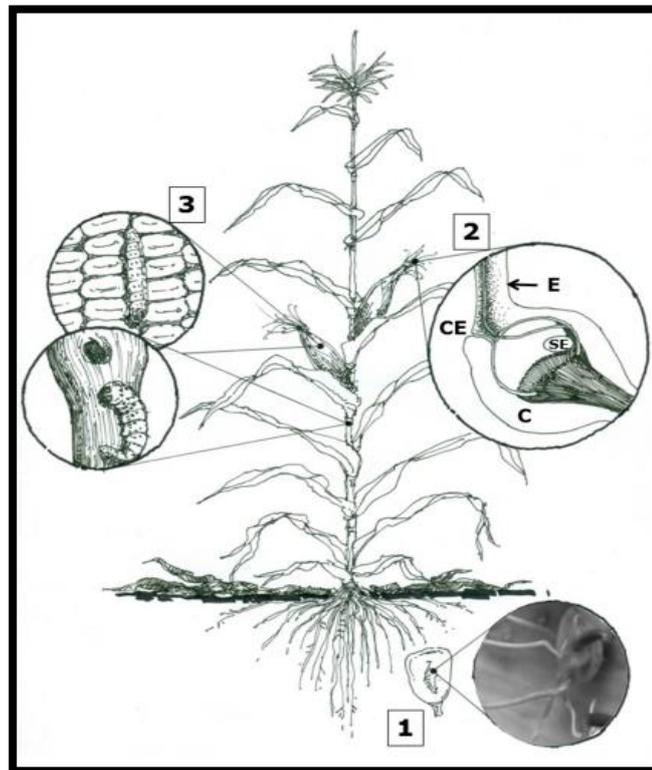


Figura 8: Composición de las poblaciones microbianas

Fuente: Caro *et al.*, (2018)

2.2.3. El género *Fusarium*.

Son hongos filamentosos que se encuentran comúnmente en el suelo y en las plantas hospedadas, presentan una amplia distribución en gran parte de los cultivos agronómicos, destaca por su impacto negativo en la economía, debido a que causan enfermedades (Bonelo & Sánchez, 2018; Duarte *et al.*, 2016) . Rojas *et al.*, (2017) hacen referencia a que este fitopatógeno son hongos saprofitos, que utilizan mecanismos de mutación lo que le permite sobrevivir durante mucho tiempo en el ambiente, penetran en las raíces de las plantas induciendo a la pudrición del hospedante, actualmente se les identifica mediante cuatro tipos de razas que son



específicas.

Figura 9: Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz; 1. Inducción de resistencia sistémica de plántulas. 2. Infección a través del estigma. 3. Infección a través de heridas

Fuente: (De La Torre-Hernández *et al.*, 2014)

2.2.3.1. Identificación y clasificación de *Fusarium* sp.

Tapia & Amaro (2011) establece que la taxonomía de *Fusarium* es un campo complejo y ha experimentado varios cambios desde sus primeras descripciones en 1803 por Link. Rentería-Martínez *et al.* (2018), menciona que su caracterización se basa en su morfología y en la presencia de características específicas, clasificándose en diferentes secciones y subsecciones en función de sus características genéticas y morfológicas. Asimismo, su clasificación es importante para comprender su biología y ecología con el propósito para desarrollar estrategias efectivas de control de enfermedades en la agricultura.

Uno de los métodos más comunes para la identificación de *Fusarium* sp. es mediante siembras microbiológicas en cultivo en agar, se busca observar el crecimiento y la morfología de las colonias. Duarte *et al.*, (2016) comentan que dichos medios contienen ingredientes que promueven el crecimiento y la diferenciación de las estructuras fúngicas características. Salazar *et al.*, (2020) mencionan que el uso de marcadores moleculares permite establecer las diferencias entre especies intra e interespecíficas.

2.2.3.2. Patogenicidad de *Fusarium* sp.

Las esporas de *Fusarium* pueden ingresar al tejido vegetal a través de cortes en los tejidos vegetales, induciendo una colonización endófitas empleando enzimas y toxinas que debilitarían las barreras de protección de la planta hospedera; seguirá con su desarrollo y multiplicación dentro de la planta produciendo sus esporas. Posteriormente se empezará a observar los síntomas propios del fitopatógeno como la marchitez, el amarillamiento, las manchas necróticas en el tejido foliar, retrasos de

crecimiento vegetal y pudriciones en las raíces y tallos (Guerrero-Aguilar *et al.*, 2015; Suaste-Franco *et al.*, 2020).

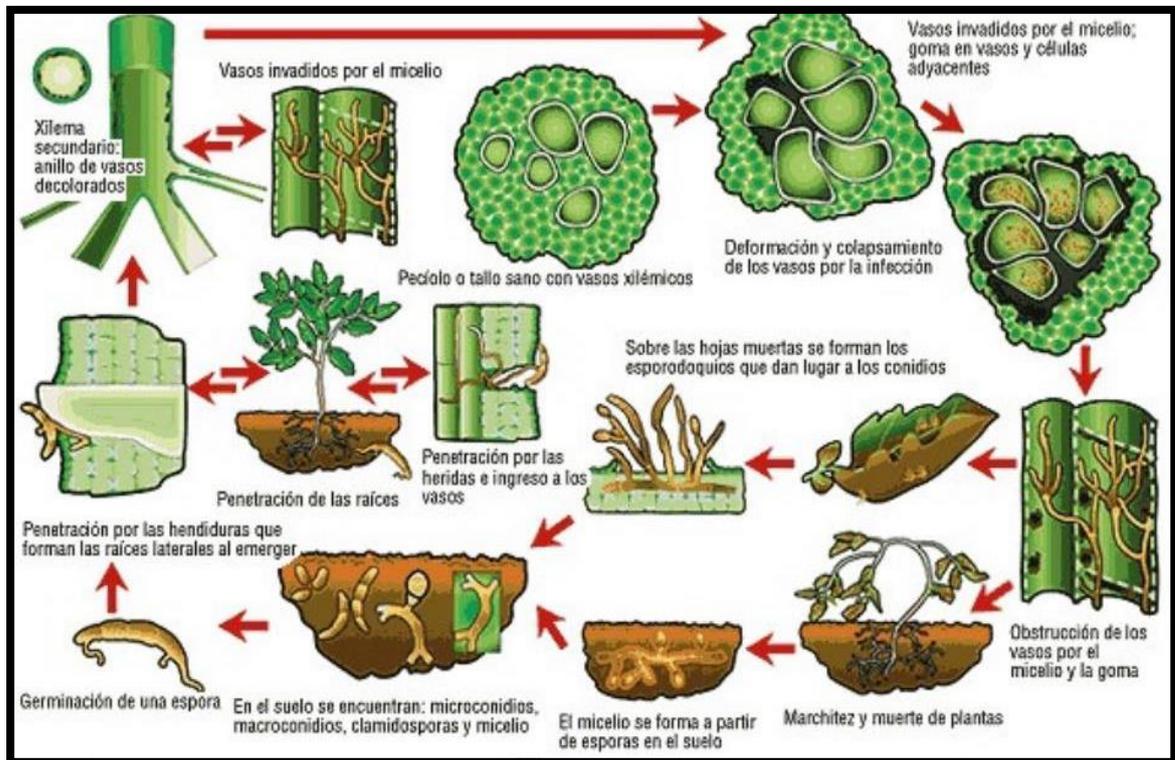


Figura 10: Ciclo de infección de marchitez por *Fusarium*

2.2.4. El género *Bacillus* sp.

2.2.4.1. Características generales de *Bacillus* sp

Es un género bacteriano perteneciente a la familia Bacillaceae de la clase Bacilli, son bacterias grampositivas, por lo que van a presentar una gruesa capa de peptidoglicano en su pared celular, son aerobias, lo que significa que requieren oxígeno para su crecimiento y metabolismo (Corrales-Ramírez & Caycedo-Lozano, 2020). Presentan movilidad gracias a la presencia de flagelos, lo que les permite desplazarse en medios líquidos. Además, tienen la capacidad de formar esporas resistentes, que son estructuras de que les permiten sobrevivir en condiciones

adversas, como altas temperaturas, sequía y supervivencia a desinfectantes o radiación (Calvo & Zúñiga, 2010).

2.2.4.2. Producción y liberación de metabolitos por *Bacillus* sp.

Bacillus sp. es conocido por su capacidad de biocontrol contra fitopatógenos, debido a que producen compuestos antimicrobianos, como péptidos y enzimas, que inhiben el crecimiento y propagación de patógenos de suelo y enfermedades foliares (Villarreal-Delgado, 2018) . Asimismo, *Bacillus* sp. producen fitohormonas y metabolitos que promueven el crecimiento vegetal, capaces de sintetizar ácido indolacético (AIA) que está vinculada con la elongación de las raíces y el crecimiento de brotes. Cisneros *et al.*, (2016) menciona la capacidad de solubilizar nutrientes como el fósforo, de manera que puedan ser asimiladas por las plantas.

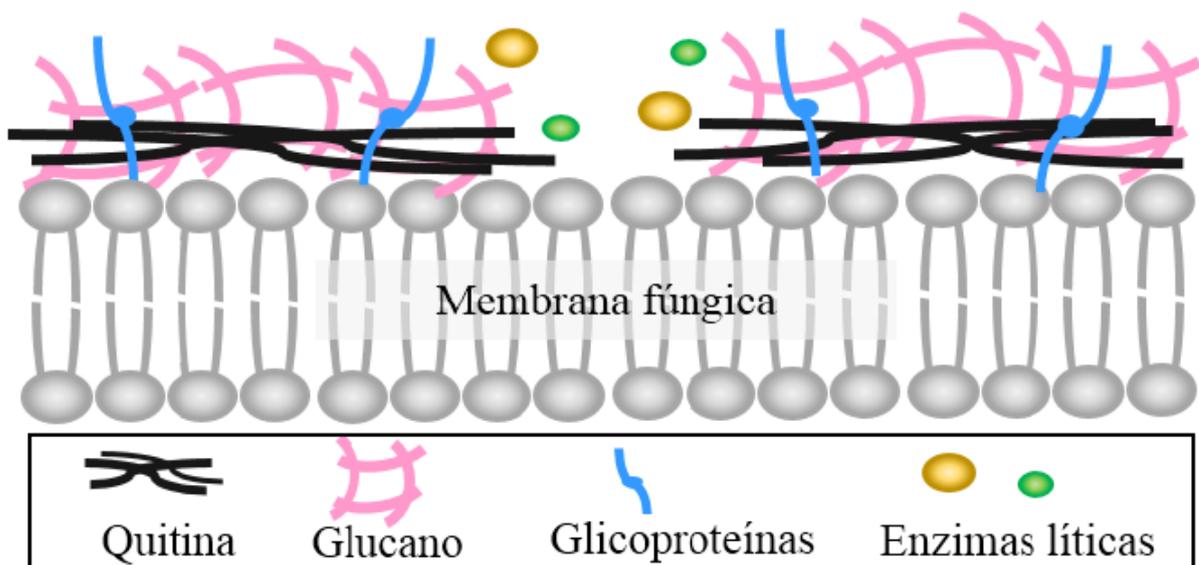


Figura 11: Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas.

Fuente: (Villarreal *et al.*, 2018)

2.2.4.3. Biocontrol del *Bacillus* sp. sobre *Fusarium* sp.

Los mecanismos que más destacan son la producción de oligopéptidos como las iturinas, las fengicinas y surfactinas que presentan actividad antibacteriana y antifúngica, mediante la interacción de la membrana citoplasmática del fitopatógeno, ocasionando la formación de poros en la membrana celular y un desbalance osmótico, desencadenando la muerte celular del *Fusarium* spp. (Villarreal-Delgado, 2018). Li *et al.*, (2014) realizaron procesos de mutación a *Bacillus amyloliquefaciens* cepa SQR9 a nivel del gen “sfp”, que es vital en la síntesis de lipopeptidos.

La producción de enzimas líticas con capacidad de degradar la pared celular es uno de los mecanismos de acción antifúngico, dentro de las cuales encontramos a las quitinasas y β -glucanasas, responsables de la degradación de polisacáridos de la pared celular de *Fusarium* spp., mediante hidrólisis de sus enlaces glucosídicos. Shafi *et al.*, (2017) sintetizaron dos enzimas de quitinasas en *Bacillus amyloliquefaciens* cepas V656 con el propósito de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

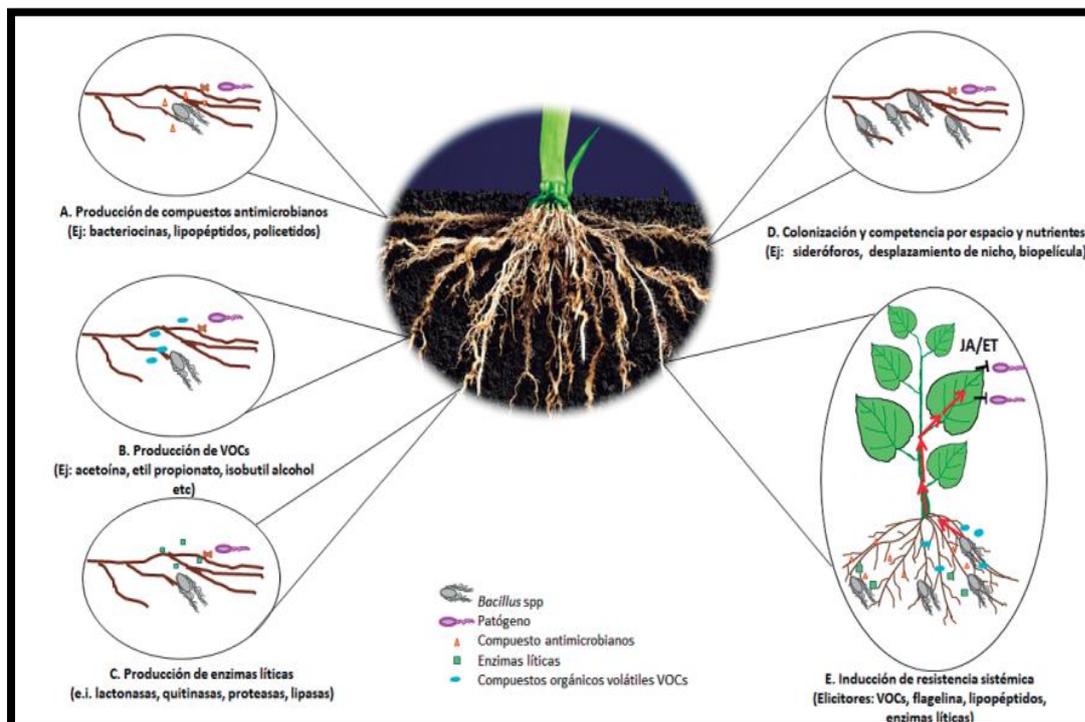


Figura 12: Mecanismos de control biológico de cepas de *Bacillus* spp. **A.** Producción de compuestos antimicrobianos, **B.** Producción de VOCs, **C.** Colonización y competencia, **D.** Producción de enzimas líticas, **E.** Inducción de resistencia vegetal.

Fuente: Pedraza *et al.*, (2020)

2.3. Definición de términos básicos

- **Antibiosis:** Es la interacción biológica de diferentes especies de microorganismo, en la cual un microorganismo segrega sustancias nocivas para el desarrollo del otro microorganismo, lo que le imposibilita desarrollarse.
- **Agricultura sostenible:** Enfoque de la agricultura que tiene como objetivo satisfacer las necesidades actuales de producción de alimentos sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades, al garantizar la conservación y la gestión responsable de los recursos naturales.
- **Agricultura sustentable:** Enfoque de la agricultura que busca mantener la productividad a largo plazo mientras se minimizan los impactos negativos en el medio ambiente y se promueve el bienestar social y económico de las comunidades agrícolas.
- **Agroquímicos:** Son productos a base de compuestos químicos que se usan en la agricultura con el fin de controlar e inhibir el ataque de fitopatógenos, enfermedades y plagas.
- **DNA 16S:** Es un gen que codifica el DNA y constituye la proteína ribosomal de procarionte siendo una secuencia altamente conservada.

- **Biofungicidas:** Son fungicidas que usan como compuesto activo un microorganismo con capacidad antagonista frente a determinados fitopatógenos.
- **Biotecnología microbiana:** Campo de estudio que utiliza microorganismos, como bacterias y hongos, para desarrollar aplicaciones tecnológicas en diversas áreas, como la agricultura, la industria, la medicina, etc.
- **Cepario:** Lugar donde se almacena un conjunto de microorganismos a temperaturas extremadamente bajas con el fin de conservar su diversidad biológica y ralentizar su metabolismo.
- **Conidios:** Son esporas asexuales inmovilizada cuya formación deriva de una hifa o célula conidiógena
- **Control biológico:** Uso de diferentes organismos (compuestos o derivados obtenidos de ellos) que solos o en combinación son capaces de disminuir los efectos deletéreos que causa una población patógena sobre el crecimiento y/o productividad de un cultivo agrícola de interés.
- **Cultivos duales:** Siembra de dos microorganismos que se realiza en lados opuestos de una placa Petri con un medio de cultivo, en la cual se busca obtener el porcentaje de actividad antagonista del microorganismo benéfico sobre el fitopatógeno.
- **Endosporas bacterianas:** son estructuras resistentes y duraderas producidas por algunas bacterias. Están envueltas por una capa protectora y se encuentran en un estado de dormición, lo que les permite sobrevivir a condiciones adversas, como desecación, cambios de temperatura, radiación y presión. Las endosporas pueden reactivarse y convertirse en bacterias activas cuando las condiciones son favorables.

- **Microorganismos antagonistas:** Microorganismos conformados por hongos bacterias o levaduras que presentan la capacidad de inhibir y realizar un control biológico sobre el crecimiento de patógenos.
- **Mico parasitismo:** Es el fenómeno de parasitismo de un hongo sobre otro hongo, mediante una interacción que genera las hifas de un hongo mediante parasitismo directo y la producción de hifas haustorios desencadenando una lisis de una hifa hacia la otra.

2.4. Hipótesis de investigación

2.4.1. Hipótesis general

- La caracterización de la cepa de *Bacillus* sp. permitirá su evaluación como promotor de crecimiento vegetal y su potencial como biofungicida en el control de *Fusarium* sp. en plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones de invernadero.

2.4.2. Hipótesis específicas

- La caracterización fenotípicamente las cepas de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp permitirá identificar sus características y comportamientos.
- La cepa de *Bacillus* sp demostrara capacidad de promoción de crecimiento vegetal (PGPR) a nivel *in vitro*.
- La identificación a nivel molecular de la cepa de *Bacillus* sp. mediante el uso de marcadores moleculares permitirá una mejor caracterización a nivel de especie.
- La respuesta del cultivo de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) estará influenciada por la inoculación de un biofungicida en condiciones de invernadero.

- La respuesta del cultivo de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) estará influenciada por la inoculación del biofungicida a nivel de invernadero

CAPITULO

III:

METODOLOGIA

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

3.1.1. Tipo de investigación

La investigación será aplicada por que busca generar y explicar nuevos conocimientos mediante la aplicación de un biofungicida a partir de una cepa de *Bacillus* sp. evaluando su potencial de controlador biológico en plántulas de Maíz amarillo duro con síntomas de infección de *Fusarium* sp. buscando manipular las variables durante el desarrollo de la investigación con el fin de proponer una alternativa a la problemática de ataque de fitopatógenos en cultivos de interés.

3.1.2. Nivel de investigación

Presentará un nivel de investigación explicativo.

3.1.3. Diseño de investigación

Es un diseño experimental, por el manejo de las variables en la que se busca evaluar el efecto de *Bacillus* sp. sobre el fitopatógeno de *Fusarium* sp.

3.1.4. Enfoque

La presente investigación tendrá un enfoque mixto

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Será conformada por plántulas de maíz amarillo duro

3.2.2. Muestra

Sera 120 plántulas de maíz amarillo duro en estado germinativo, correspondiente a los 4 tratamientos: T1: Tratamiento con *Fusarium* sp.; T2: Tratamiento con *Bacillus* sp.; T3: *Fusarium* sp. + *Bacillus* sp. y T4: Tratamiento control

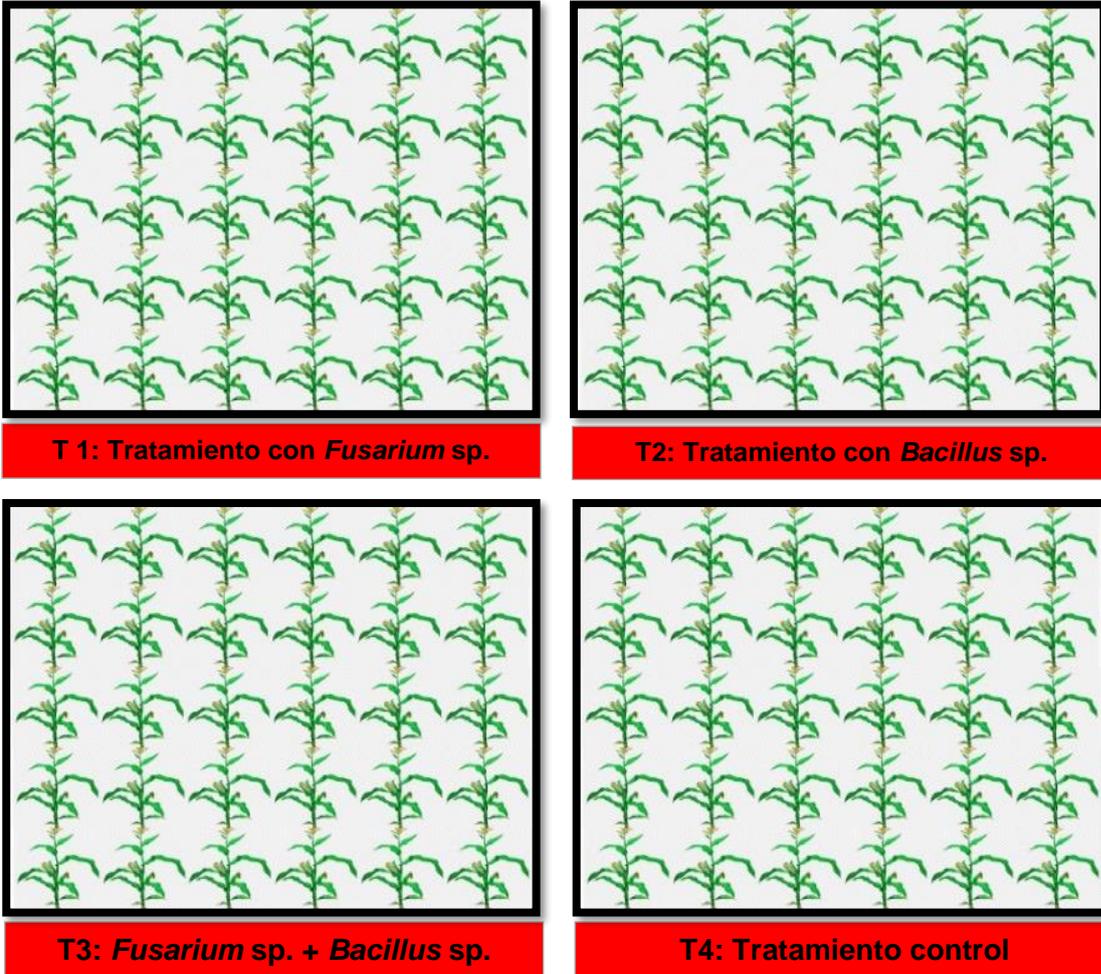


Figura 13: Diagrama del diseño experimental para la cual se empleó un Diseño completamente al azar (DCA) de los tratamientos.

3.3. Operacionalización de variable

Variable	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Instrumento
<p>Variable independiente</p> <p>Biofungicida a partir de una cepa de <i>Bacillus</i> sp.</p>	<p>Biofungicida a partir de <i>Bacillus</i> sp. que presenta actividad antagonista sobre hongos fitopatógenos, mediante mecanismos de excreción de metabolitos, producción de sideróforos, capacidad de inducción de resistencia sistémica y producción de enzimas líticas.</p>	<p>Evaluación la capacidad antagonista del biofungicida a partir de la cepa de <i>Bacillus</i> sp. sobre <i>Fusarium</i> sp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • % de inhibición • Densidad óptica 	<ul style="list-style-type: none"> • Observación directa • Fichas técnicas.
<p>Variable dependiente</p> <p><i>Fusarium</i> sp. en plántulas de híbridos de maíz amarillo duro (<i>Zea mays</i> L.)</p>	<p>Evaluación de las plántulas de maíz amarillo duro (<i>Zea mays</i> L.) mediante lectura de porcentaje de biomasa, porcentaje de germinación de semillas e incidencia de daño a los tejidos vegetales.</p>	<p>Respuesta de la actividad antagónica sobre el bio control de <i>Bacillus</i> sp sobre <i>Fusarium</i> sp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Germinación de semillas • Biomasa • Altura • Diámetro 	<ul style="list-style-type: none"> • Observación directa • Fichas técnicas

3.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos

3.4.1. Material biológico

La cepa de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp. en este estudio fue previamente aislada y caracterizada a partir de muestras de suelo agrícola. La cepa se encontraba almacenada en forma de cultivo puro en agar nutritivo a 4 °C.

3.4.1.1. Reactivación de la cepa de *Bacillus* sp.

Para la reactivación de la cepa, se preparó una suspensión de esporas a partir del cultivo almacenado. Se utilizó un asa estéril para transferir una colonia a un tubo estéril de caldo de cultivo nutritivo y se incubó durante 24 horas a 37 °C en un agitador orbital a una velocidad de agitación de 150 rpm.

Después de la incubación, se tomó 1 ml de la suspensión de cultivo bacteriano y se sembró en placas de agar Luria Bertoni autoclavado utilizando la técnica de siembra en estría. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas hasta obtener colonias aisladas.

3.4.1.2. Conservación de la cepa de *Bacillus* sp.

Para una óptima conservación a largo plazo de las cepas de *Bacillus* sp y *Fusarium* sp., se utilizó la técnica de crio preservación a -80 °C. Se prepararon tubos estériles de crio preservación con 700 µl de glicerol al 30 % V/V y 700 µl de caldo bacteriano y caldo fúngico provenientes de un cultivo *overnight*, se les adiciono solución salina al 0.85% a cada tubo de crio preservación, se homogenizo empleando un vortex; dicha conservación se realizó por cuadruplicado.

Además, se realizó una conservación a corto plazo de las cepas estudiadas mediante la siembra en agar Luria Bertoni que fue almacenada a 4°C. Asimismo, se verifico la viabilidad y la pureza de las cepas conservadas, mediante una siembra en agar LB y su posterior observación del crecimiento microbiano; adicionalmente se realizó una prueba de pureza mediante la observación de características morfológicas.

Dichos procedimientos se llevaron a cabo siguiendo rigurosas técnicas asépticas y cumpliendo con los procedimientos de bioseguridad microbiológica

3.4.2. Caracterización fenotípica de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp

3.4.2.1. Pruebas confirmatorias de *Bacillus* sp.

3.4.2.1.1. Prueba de catalasa:

Se realizo un raspado con el asa de siembra a una colonia de *Bacillus* sp. cultivada en agar LB durante 24 horas; mediante un frotis se extendió sobre un portaobjeto, se añadió de tres gotas de peróxido de hidrogeno (H₂O₂), dejando reposar durante 1 minutos. Se observo la efervescencia mediante la liberación de una molécula de Oxígeno, considerando un resultado positivo de la prueba de catalasa. Asimismo, se consideró la inclusión de un control positivo y un control negativo para la validación de los resultados y poder garantizar una fiabilidad de la prueba de catalasa.

3.4.2.1.2. Tinción gram

Se realizo un frotis de una colonia de *Bacillus* sp cultivada en agar nutritivo durante 24 horas a 37 °C. Se esterilizo un portaobjeto de vidrio mediante un flameo en el mechero, seguidamente con un asa estéril se tomó una cantidad pequeña de

cultivo de la colonia de *Bacillus* sp. y se extendió suavemente sobre el portaobjeto obteniendo un frotis uniforme. Se dejó reposar durante 2 minutos al aire libre.

Se fijó el frotis bacteriano mediante calor, empleando la llama de un mechero, pasando suavemente y considerando la distancia adecuada para evitar un sobrecalentamiento.

Se añadió cristal violeta al frotis bacteriano y se dejó actuar durante 60 segundos, se enjuagó para eliminar exceso de colorante con agua destilada; se aplicó una gota de Lugol sobre el frotis bacteriano para que actúe durante 60 segundos, seguidamente se hizo un enjuague con agua destilada. Luego, se realizó una decoloración con alcohol ácido-acético para que actúe durante 30 segundos y se enjuagó nuevamente con agua destilada. Posteriormente, se adicionó una gota de safranina al frotis bacteriano durante 60 segundos y se enjuagó con agua destilada dejando secar al aire libre durante 5 minutos. Finalmente, los frotis teñidos se observaron al microscopio óptico a un aumento de 60 X y en un microscopio invertido de la marca a un aumento de 100 X.

3.4.2.2. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp.

La cepa empleada fue sub-cultivada en medio PDA a y conservada a 4°C, se tomaron discos de un diámetro de 5mm de micelio incubado durante 5 días con fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se repicaron en agar PDA, se incubó por 7 días a 28 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

3.4.2.2.1. Caracterización morfológica macroscópica

Se realizó considerando la característica micelial, forma, textura, color, discos concéntricos y el patrón de crecimiento de la cepa de *Fusarium* sp. Asimismo, se midió los diámetros de la colonia empleando un vernier digital.

3.4.2.2.2. Caracterización morfológica microscópica

Se realizó identificaciones microscópicas empleando la técnica de micro cultivo; que consistió en colocar papel toalla en forma de disco del tamaño de la base de una placa Petri de 9 cm de diámetro y sobre eso colocar 2 varillas de vidrio en forma de "V", en la parte superior se dejara reposar una lámina de portaobjeto, se forro con hojas recicladas de papel bond A4 y se esterilizo en una estufa a 180 °C durante 2 horas. En una cabina de flujo laminar se sacó el sistema esterilizado y se colocó 2 discos de PDA de 5 mm de diámetro en los extremos del portaobjeto, se sembró por punción con un asa de siembra esterilizada el micelio fúngico de la cepa de *Fusarium* sp. se adiciono 500 µl de agua destilada estéril sobre el papel toalla. Se incubo durante a 28 °C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 3 días.

Posteriormente se retiró el cubreobjetos con el micelio fúngico crecido y se colocó en la parte céntrica de una nueva lamina con una gota de azul de lactofenol, que permitirá resaltar las estructuras fúngicas como los conidios, conidióforos, macro conidios, micro conidios y fiálides. Se registro el tamaño, la forma y la disposición de las estructuras fúngicas, lo que nos permite facilitar la identificación de la cepa de *Fusarium* sp.

Finalmente, se foto documento los registros morfológicos de la cepa de *Fusarium* sp. empleando un microscopio invertido de la marca Olympus equipado con una cámara digital. Asimismo, se realizó las comparaciones de nuestros registros

fotográficos con descripciones y referencias taxonómicas disponibles para el género *Fusarium* sp.

3.4.2.3. Cinética de crecimiento de *Fusarium* sp.

Se utilizó una suspensión a base de agua destilada estéril con una concentración de 1×10^6 esporas/ml de *Fusarium* sp. Se inoculó 10 μ L la suspensión en un extremo de la placa Petri con PDA, se selló usando Parafilm, seguidamente se incubó por 7 días a 28 °C ($\pm 2^\circ$ C), se tomaron registros de manera periódica cada 24 horas del crecimiento del diámetro micelial del hongo empleando un vernier digital para la cual se consideró el punto de siembra del inóculo de crecimiento sobre una línea horizontal perpendicular al inóculo micelial. A partir del crecimiento micelial, se calculó la cinética de crecimiento al noveno día, empleando la siguiente fórmula propuesta por Duarte *et al.*, (2016)

$$v_{\text{crecimiento}} = \left[\frac{(\text{Diámetro de colonias (mm)})}{\text{Tiempos de días concurridos (h)}} \right]$$

3.4.3. Determinación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus* sp.

3.4.3.1. Capacidad antagonista a nivel *in vitro*.

Se empleó un cultivo overnight de la cepa de *Bacillus* sp cultivado en TY. Se realizó un enfrentamiento directo entre *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp crecido en la placa Petri con medio PDA. Para ello se utilizó un cultivo bacteriano de *Bacillus* sp. fresco crecido en medio TY cuya densidad óptica (DO 600=1.0), luego se tomó una alícuota de 100 μ l que fue inoculado en la placa de PDA mediante siembra por extensión con asa de digralsky, luego se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *Fusarium* sp. (Fitopatógeno). Como control se sembraron únicamente discos de 5

mm de *Fusarium* sp. en placas Petri con PDA. El ensayo fue realizado considerando 10 réplicas. Los cultivos fueron incubados a 28 °C durante 9 días. Asimismo, se realizaron mediciones cada 72 horas del área de crecimiento micelial, con el fin de determinar las áreas de crecimiento de cada microorganismo.

Según Uysal & Kantar, (2020) mencionan que dicha capacidad antagónica se debe a que algunas bacterias del género *Bacillus* producen compuestos antifúngicos y competencia por nutrientes y espacio con los fitopatógenos, lo que podría interferir en su crecimiento *in vitro*, ocasionando por un comportamiento antagonista por parte del microorganismo benéfico.

3.4.3.2. Capacidad solubilizadora de fosfato

El fósforo es uno de los macronutrientes esenciales más importantes como fuente nutricional de las plantas; sin embargo, solo se encuentra una pequeña fracción menor al 1% de fósforo inorgánico y orgánico (Cumpa-Velásquez *et al.*, 2021) ; por lo cual el (Pi) biodisponible se convierte en un factor limitante para las plantas y en el rendimiento de la producción agrícola (Cisneros *et al.*, 2016).

Dicha capacidad solubilizadora se evaluó a partir de cultivos bacterianos frescos cultivados en caldo Luria Bertoni cuya densidad óptica (OD 600 = 1.0). Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y posteriormente fue lavado con agua destilada estéril. Posteriormente los *pellets* lavados fueron re-suspendidos en 100 µl de agua destilada estéril, de las cuales 10 µl se inoculó en el medio selectivo NBRIP. Finalmente, se determinó la capacidad de solubilización de fosfato mediante la determinación de halo translucidos de solubilización, para la cual se empleó la siguiente fórmula.

$$SE = \left[\frac{(\text{Halo del diametro de solubilizacion de Fosforo})}{\text{Diametro de colonia}} \right] (100)$$

3.4.3.3. Capacidad solubilizadora de Zinc

El zinc es uno de los micronutrientes indispensables en el metabolismo y desarrollo de las plantas, desempeñando funciones importantes en la fisiología y su ciclo biológico. La deficiencia de dicho micronutriente es una de las más comunes que produce disminución en la productiva agrícola (Cumpa-Velásquez *et al.*, 2021). Dicha deficiencia se puede mejorar empleando bacterias solubilizadora de Zinc insoluble a Zinc soluble

Se evaluó la capacidad solubilizadora de Zinc a partir de inóculos bacterianos frescos de 24 horas cultivados en medio LB a 150 rpm, se centrifugo a 12000 rpm durante 4 minutos y luego se realizó lavados con agua destilada estéril. Luego se inoculo 10 µl en medio de cultivo a base de medio Tris -minimal médium y se incubo a 28 °C durante 72 horas. Finalmente, se midió el halo de solubilización para calcular el porcentaje de solubilización de Zinc.

$$SE = \left[\frac{(\text{Halo del diametro de solubilizacion de Zinc})}{\text{Diametro de colonia}} \right] (100)$$

3.4.3.4. Producción de sideróforos.

Se evaluó la capacidad de producción de sideróforos, a partir de caldo Luria Bertoni frescos cultivado a 28 °C durante 24 horas, luego se inoculo 10 µl en placa con medio de cultivo Luria Bertoni y se incubo a 28°C durante 24 horas. Luego se agregó una capa del medio Cromo azurol Agarizado, se agregó medio crecido anteriormente. Se determino la producción de sideróforos mediante un halo de color naranja-amarillo alrededor de colonias.

El hierro se encuentra de manera abundante en el suelo de forma no asimilable por los organismos; sin embargo, existen bacterias con la capacidad de captación de hierro denominados también sideróforos, transformando el hierro ferroso (FeSO_4) a su forma férrica (FeSO_3), cuyas moléculas son asimilables por las plantas. (Pérez-Miranda *et al.*, 2007)

3.4.4. Identificación molecular de *Bacillus* sp.

3.4.4.1. Extracción y cuantificación de ADN microbiano.

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos bacterianos repicados en medio Luria Bertoni a 28 °C, para la cual se empleó el kit de extracción de ácidos nucleicos de Promeoga (Wizard® Genomic DNA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se colocó micro perlas en tubos eppendorf de 1,5 ml, se adicionó 600 µl de lisis del primer Buffer, y se agregará la muestra del *Bacillus*. Seguidamente se agitó en el vortex durante 10 minutos, luego se sometió a un termoblock por 30 minutos a 65°C, a continuación, se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos.

En nuevos tubos se agregó 200 µl el Buffer 2 del Kit de extracción de solución precipitador de proteína, se adicionó 500 µl del sobrenadante. Se agitó en vortex durante 1500 rpm, luego se desechó el sobrenadante y se conservó solo el pellet al que se le adicionó 600 µl de alcohol de 70 %v/v, se agitó en vortex durante 10 segundos, se centrifugó durante 3 minutos a 1500 rpm y se eliminó el líquido sobrenadante. Finalmente se dejó secar los tubos eppendorf durante 15 minutos y se agregó 100 µl del tercer buffer y luego se agitó en vortex durante 10 segundos.

Para la cuantificación de ADN se cargó una muestra de 2 µl del buffer *elution* como blanco y se calibró el bioespectrofotómetro (Basic eppendorf) de cubeta de 1

mm, posteriormente se cargó 2 µl del DNA genómico. Se tomaron registros de las concentraciones en ng/µl, así también el A260/A280 y A260/A230.

3.4.4.2. Amplificación de región DNA16s por PCR

Para la identificación a nivel de especie se empleó el cebador de PCR del gen del DNA ribosomal 16S bacteriano (DNA 16S), debido a que es una secuencia altamente conservada en todos los procariotas, lo cual facilita la clasificación e identificación de los organismos a niveles taxonómicos (Sambo et al., 2018). La reacción de cadena polimerasa (PCR) para la región DNA 16S se colocó un volumen total de 25 µl conformado por una mezcla de 12,5 µl de PCR Master mix, 1,25 µl de cebador *forward* y 1,25 µl de cebador *reverse*, 10 µl de ADN diluido a 10 ng/µl. Se colocó en el termociclador de BIORAD T100, durante 30 ciclos para la amplificación de nuestra secuencia de interés. La técnica de PCR consta de tres etapas, siendo la primera la desnaturalización del ADN que paso de doble hebra a una sola hebra mediante el aumento de temperatura a 94°C durante 5 minutos; seguidamente se realizó el alineamiento, proceso por el cual los oligonucleótidos se adhirieron a sus respectivas secuencias de un lado de la hebra de ADN a una temperatura de 50 °C durante 45 segundos; finalmente fue el proceso de elongación, donde se realizó la adición de los deoxinucleosidos trifosfatos a una temperatura de 72°C durante 7 minutos (Chiluisa-Utreras et al., 2020).

3.4.4.3. Electroforesis

Los productos amplificados por el termociclador fueron verificados mediante una corrida en gel de electroforesis para la cual se empleó 2 µl del producto amplificado por PCR y 2 µl de Dye 6X (Blue/Orange) se mezcló con solución Tris Acetato EDTA (TAE) a una concentración de 1X. Seguidamente se procedió a hacer

la corrida durante 20 minutos a 100 voltios. El ADN amplificado por cargas de polaridad fue desplazado hacia el lado positivo de la cámara de electroforesis para la observación de las bandas de ADN iluminadas con luz azul.

3.4.4.4. Secuenciamiento, edición y alineamiento de secuencias.

Los productos de la PCR fueron secuenciados usando la tecnología de sanger; como parte de un servicio de contratación externa (Macrogen- Laboratorio de biotecnología de Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas, empleando el software Sequencer v.5.4.6 (*gene Codes*, Ann Arbor, Michigan). Posteriormente se analizaron las secuencias editadas empleando el portal NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) del programa de BLAST. Mediante un análisis de similitud de secuencia, se pudo confirmar la identificación a nivel de especie.

3.4.5. Estandarización del desarrollo del biofungicida.

3.4.5.1. Desarrollo de inóculos fermentativos.

Se empleó 2 medios fermentativos usando como base (Tabla N°1), para la producción de inóculos bacterianos. Se preparó una suspensión de 1 ml a partir de la cepa de a partir de *Bacillus* sp. proveniente de un cultivo *overnight* en caldo TY en dos medios fermentativos.

Sales	Cantidad
K ₂ HPO ₄	2 g
KCl	1 g
MgSO ₄	1 g
FeSO ₄	0.02
Agua destilada	2 L

Tabla1. Sales empleadas en la elaboración del bioinsumo.

3.4.5.2. Desarrollo del biofungicida

3.4.5.2.1. Medios fermentativos líquidos

3.4.5.2.1.1. Biopreparado a base de leche y soya fortificada:

Compuesto de 350 ml de leche gloria UHT, 350 ml de bebida de soya fortificada y 300 ml de la Tabla N°01; se homogenizo, se esterilizo en autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3.4.5.2.1.2. Biopreparado a base de melazas y extracto de levadura.

Compuesto de 200 ml de melaza, 175 g de levadura comercial que se activara con 40 g de azúcar en 200 ml de agua destilada y 600 ml de la Tabla N°01; se homogenizo, se esterilizo en autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3.4.5.2.2. Incubación y procesos de fermentación

Los procesos de fermentación de la cepa de *Bacillus* sp. se llevaron a cabo bajo condiciones controladas una de temperatura de 35°C, agitación de 150 rpm y tiempo de incubación de 48 horas. Se añadió dicha alícuota a ambos biopreparados por duplicado.

3.4.5.2.3. Cinética de crecimiento y producción de células.

La cepa empleada fue conservadas a 4°C en medio agar Luria Bertoni, que fue subcultivado en caldo LB, para determinar la cinética de crecimiento durante 72 horas. Para la cual se realizó siembras de las diluciones 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} ; empleando un asa de digraslky; se incubo a 35°C durante 24 horas. Las siembras se realizaron a tiempo 0 horas, 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 15 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas respectivamente. Transcurrido las 24 horas de

incubación se procedió a tomar lecturas de las Unidades formadoras de colonias (UFC).

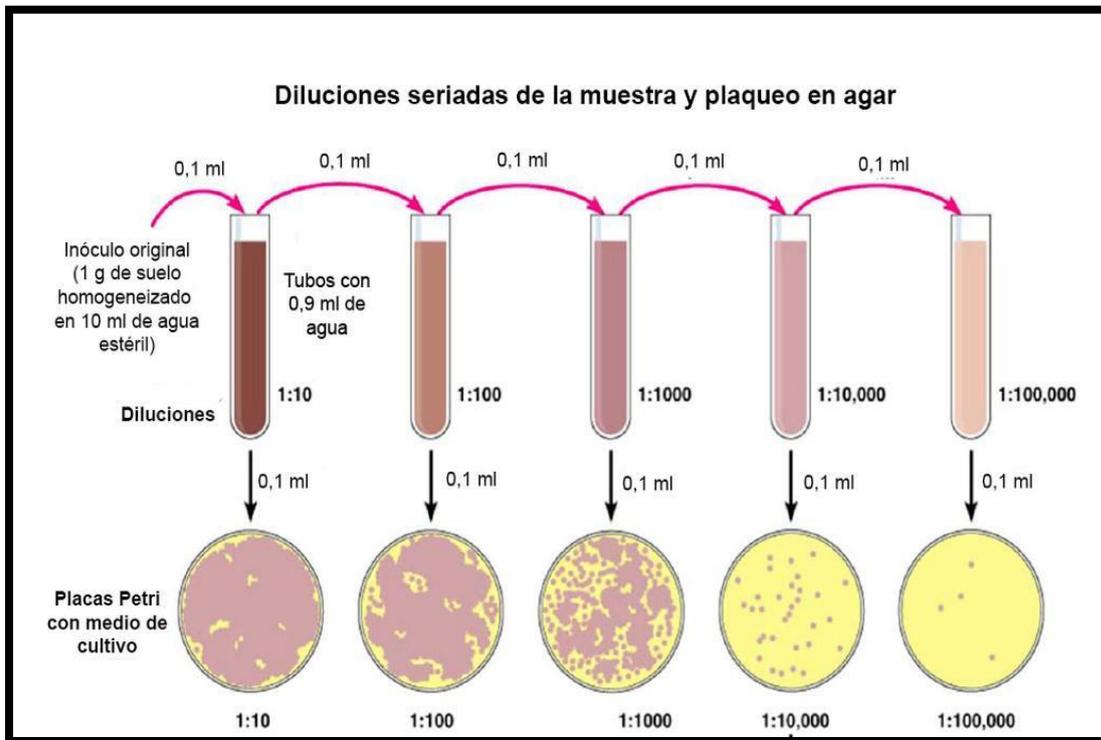


Figura 14: Esquema de diluciones seriadas

3.4.6. Ensayo de efectividad de aplicación a nivel invernadero.

3.4.6.1. Tratamiento de semillas de maíz.

Se seleccionaron y sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % durante 5 minutos, luego se sumergió en alcohol al 70 % durante 30 segundos y finalmente se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 5 minutos. Cada tratamiento consto de 18 semillas, obteniéndose una configuración de 4 tratamientos con 72 semillas en total.

3.4.6.2. Aplicación de los inoculantes microbianos a la semilla de maíz.

Se preparo una suspensión bacteriana de *Bacillus* sp. en el medio con mejores resultados obtenidos en la UFC. Para el T1 a base de *Bacillus* sp. se sumergió las semillas de maíz en 50 ml de suspensión bacteriana durante 1 minuto. Para el T2, se sumergió las semillas en 50 ml de agua corriente durante 1 minutos y se dejó seca. Para el T3 se sumergió las semillas en un volumen de 50 ml, conformado por 25 ml del inóculo bacteriano y 25 ml del inóculo fúngico y para el T4, se sumergió en 50 ml de inóculo fúngico a base de esporas de *Fusarium* sp. con una concentración de 1×10^6 . Finalmente se depositaron las semillas sobre un papel toalla estéril y se dejó secar dentro de una cabina de flujo laminar.

3.4.6.3. Germinación de las semillas de maíz.

Se sembraron las semillas expuestas a los 4 tratamientos en una bandeja de 72 pocillos respectivamente, son sustrato compuesto de arena y vermiculita con una proporción de 1:3; dicho sustrato fue esterilizado bajo condiciones de autoclave a 121°C por 15 libras de presión durante 20 minutos; dicho procedimiento se realizó bajo condiciones de invernadero durante 30 días cuya temperatura oscilo entre 20°C y 25 °C mientras que la humedad relativa fue alrededor de 60 %. Posteriormente después de 15 días se volvió a realizar la aplicación de los inoculantes microbianos en un volumen de 1 ml por muestra de su tratamiento respectivo.

Se fue registrando y monitoreando regularmente los parámetros de germinación, la aparición de síntomas de enfermedad causadas por *Fusarium* sp. sobre los plantines de maíz amarillo duro.

3.4.6.4. Determinación del efecto del bioinsumo sobre las plántulas

3.4.6.4.1. Evaluación de la germinación:

Durante 2 semanas se evaluó la cinética de germinación, para la cual se contabilizó el número de semillas germinadas en un periodo de 15 días desde la siembra en los sustratos inertes; finalmente se obtuvo el porcentaje de germinación de semillas usando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de germinación} = \left[\frac{(\text{Semillas germinadas})}{\text{Semillas germinadas} + \text{semillas no germinadas}} \right] (100)$$

3.4.6.4.2. Evaluación de crecimiento:

Se lavaron las raíces con agua corriente, hasta conseguir la separación total de las plántulas respecto al sustrato empleado, seguidamente se registró las medidas del diámetro y altura de las plántulas de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) de los 4 tratamientos a evaluados, empleando un vernier digital.

3.4.6.4.3. Evaluación de biomasa:

Se colocaron cada plántula (Hojas, tallos y raíces) por separado en papel aluminio, colocándose en estufa a 120 °C durante 24 horas. Finalmente se determinó la biomasa seca empleando una balanza analítica, para la cual se usó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{(\text{peso plantines frescos} - \text{peso plantines secos})}{\text{peso plantines frescos}} \right) * 100$$

3.5. Descripción de los instrumentos

- **Autoclave de laboratorio BKQ-B Series:** Equipo empelado para esterilizar medios de cultivos usando calor húmedo a 121 °C durante 20 minutos por 15 libras de presión. El proceso de esterilización se realiza mediante la exposición del material a vapor de agua a alta temperatura y presión, lo que mata a los gérmenes, virus y bacterias que pueden estar presentes en el material.
- **Balanza de laboratorio analítica MS-TS series:** Equipo usado para la lectura de biomasa de las plántulas de *Zea mays* L. (Maíz amarillo duro) y pesaje de los medios de cultivos empleados en la reactivación y repique de los microorganismos estudiados.
- **Bioespectrofometro:** es un instrumento utilizado en la rama de la biología para medir la cantidad de luz absorbida por una muestra biológica cierta longitud de onda. Permitiendo determinar la concentración de moléculas específicas del cultivo de *Bacillus* sp. crecido en caldo TY; funciona midiendo la intensidad de la luz que pasa a través de las cubetas y comparándola con la intensidad de la luz de entrada. La diferencia en la intensidad de luz se debe a la absorción de la luz por las moléculas presentes en la solución.
- **Cabina de laboratorio BAVnp-01-"Laminar-S."-1,5 LORICA:** Equipo que será usado para la reactivación y siembra en los medios de cultivo de los microorganismos estudiados, brindando garantía de condiciones de esterilidad y asepsia
- **Cámara de Neubauer:** Es una placa de vidrio con una serie de cuadrados pequeños y bien definidos en la superficie, cada uno de los cuales es un campo de conteo, utilizado para el recuento de esporas de *Fusarium* sp. y poder obtener las concentraciones en función de esporas/ ml. La cámara de Neubauer es una

herramienta valiosa en la investigación biológica, ya que permite una medición precisa y confiable del número de células en una muestra.

- **Cámara de electroforesis:** Instrumento utilizado en biología molecular para separar y analizar moléculas biológicas de ADN. Su funcionamiento se basa en la aplicación de un campo eléctrico positivo a una muestra de material biológico disperso en un gel de agarosa, lo que provoca que las moléculas se desplacen a través del gel en función de su tamaño y carga eléctrica. La separación resultante permite identificar y comparar diferentes tipos de moléculas y su composición.
- **Incubadora estufa de mesa BOV-D series:** Equipo empleado para brindar las condiciones óptimas de temperatura para el cultivo de microorganismos.
- **Microscopio modelo BOECO BM-190 SP:** Equipo usado para observar las estructuras morfológicas, recuento de esporas y muestras de tinción gran de *Fusarium sp.* y *Bacillus sp.*
- **Termociclador:** Es un equipo utilizado en biología molecular para realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa, funciona para ciclar repetidamente a través de tres temperaturas: una temperatura elevada para desnaturalizar los ácidos nucleicos, una temperatura intermedia para permitir que los primers se anclen a los extremos de los fragmentos de ácido desnaturalizado y una temperatura baja para permitir que la enzima Taq polimerasa amplifique el material.
- **Potenciómetro ISOLAB:** Instrumento de medición que usa propiedades electroquímicas para medir el pH de los medios de cultivos líquidos empleado en la producción de *Bacillus sp.*
- **Software R -Project versión 3.4.3.** Programa que se usara para el procesamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos durante el ensayo, el

análisis se realice mediante un conjunto específico de archivos, scripts y datos que se utilizan para lograr un objetivo específico o resolver un problema en particular. Un proyecto de R normalmente incluye uno o más scripts de R que realizan análisis de datos o crean modelos estadísticos, archivos de datos y cualquier recurso adicional, como gráficos, imágenes o documentación

- **Vernier digital:** Instrumento empleado para la toma de data de mediciones del crecimiento de los plantines de *Zea mays* L.

3.6. Técnicas para el procesamiento de la información

Los análisis estadísticos se realizarán después de cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad, seguidamente se realizará los análisis de varianza (ANOVA), usando el software InfoStat versión estudiantil.

CAPITULO

IV:

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de cepas microbianas.

4.1.1. Reactivación y conservación de la cepa microbiana.

Se hizo subcultivos de la cepa de *Bacillus* sp. a través de 2 siembras consecutivas cultivados en agar Luria Bertoni mediante siembras por agotamiento a partir de los tubos de crio preservación. Presentado unas colonias de color amarillo cremoso, borde ondulado y una superficie rugosa (Fig.15 A). En el orbital shaker hubo crecimiento microbiano, el cual se pudo apreciar por la turbidez después de las 24 horas de incubación. Asimismo, se conservó la cepa en el tubo de crio preservación con el inculo microbiano en glicerol al 30 % cultivado a 150 rpm en caldo Luria Bertoni (Fig. 15B), por quintuplicado en una ultra congeladora a -80°C (Fig. 15C), de la cual se tuvo la cepa purificada para los ensayos (Fig.15D)

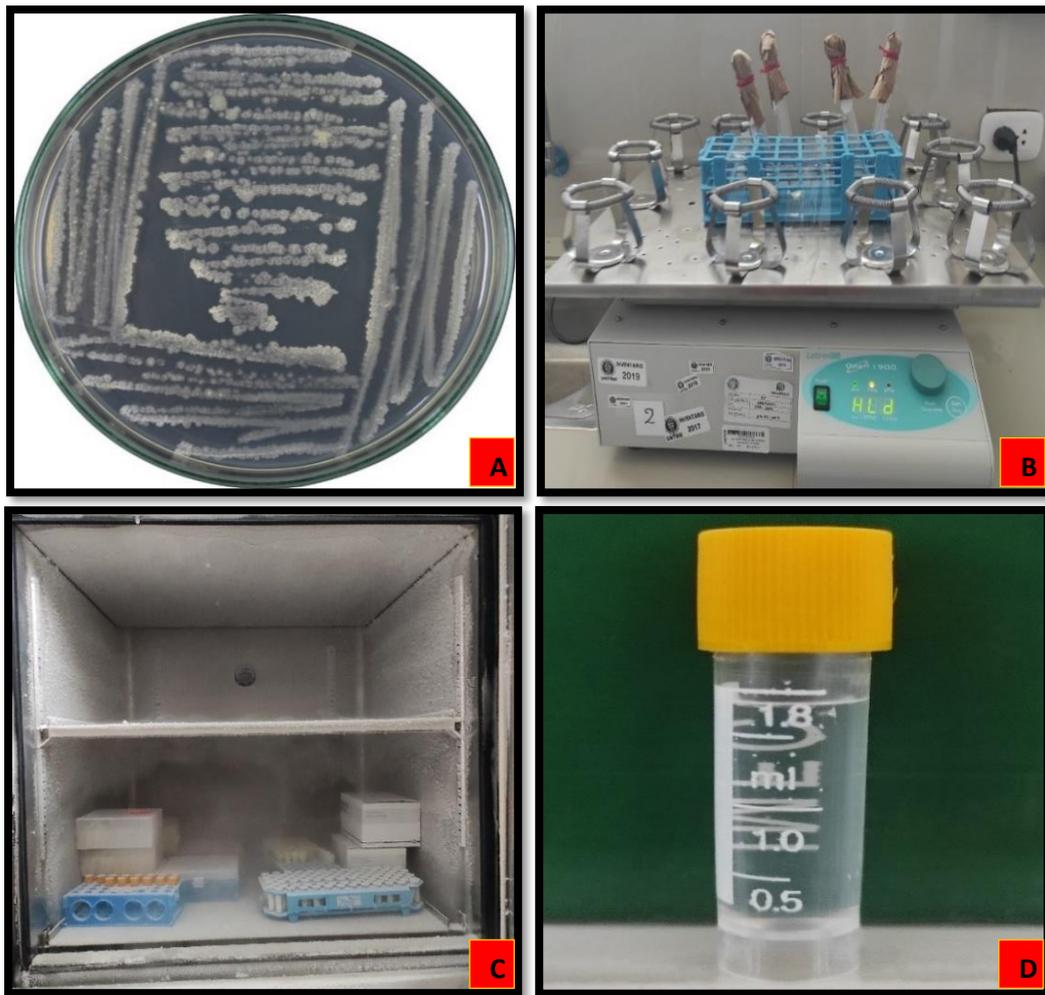


Figura 15: Reactivación y conservación de cepas microbianas **A**: Siembra por agotamiento; **B**: Caldo LB cultivado en orbital Shaker; **C**: Cepa purificada conservada en ultracongeladora a -80°C ; **D**: Cepa purificada al 30 % de glicerol.

4.1.2. Pruebas bioquímicas.

4.1.2.1. Catalasa

Se obtuvo una reacción de catalasa positiva mediante la formación de burbujas, por la separación de una molécula de H_2O y un átomo de oxígeno; al reaccionar el Peróxido de hidrogeno frente a la colonia de *Bacillus* sp. (Fig. 16 B).

4.1.2.2. Tinción gran

Se obtuvo una coloración gram positiva de color azul violeta extraído de una colonia y fue observada 100 X (Fig. 16 A).

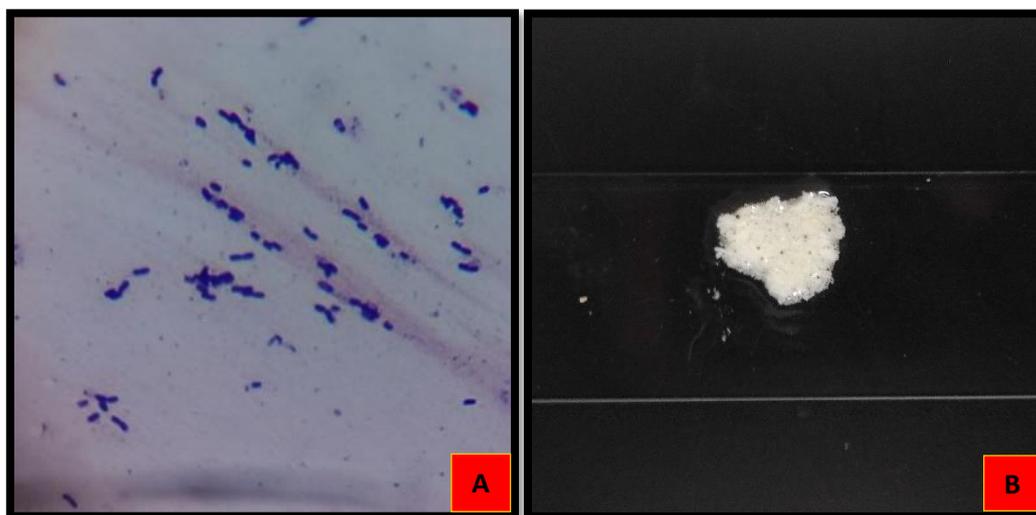


Figura 16: Pruebas bioquímicas de *Bacillus* sp. **A:** Tinción gram positiva a 100 X. **B:** Prueba de catalasa positiva.

4.1.3. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp.

4.1.3.1. Macroscópica

El crecimiento de la colonia fue de rápido crecimiento, en los primeros días se obtuvo una colonia blanca; a partir del cuarto día empezó a tornar de color a rosa purpura, las réplicas en general presentaron micelio uniforme, coloreado; respecto a la forma de la superficie fue convexa. Se apreció una textura muy densa y suave; rápido crecimiento micelial y algodonosa. El reverso de la placa se pudo apreciar un color más oscuro y textura lisa. Por ambos lados se apreció la formación de los discos concéntricos propios del género *Fusarium* (Fig. 17A).

4.1.3.2. Microscópica

Se observo hifas hialinas y septadas con una abundante ramificación; de igual modo se visualizaron os conidios unicelulares cuya ramificación forman los conidióforos, las macroconidias presentaron forma curvada similar a una media luna o de una banana septada; asimismo, se pudo observar los esporangios visualizándolo en forma esférica. Dichas estructuras descritas anteriormente se apreciaron al ser teñidas con azul de lactofenol a un aumento de 60 X en el microscopio modelo BOECO BM- 190 SP. (Fig. 17C) estructuras microscópicas teñidas con azul de lactofenol (Fig. 17D)

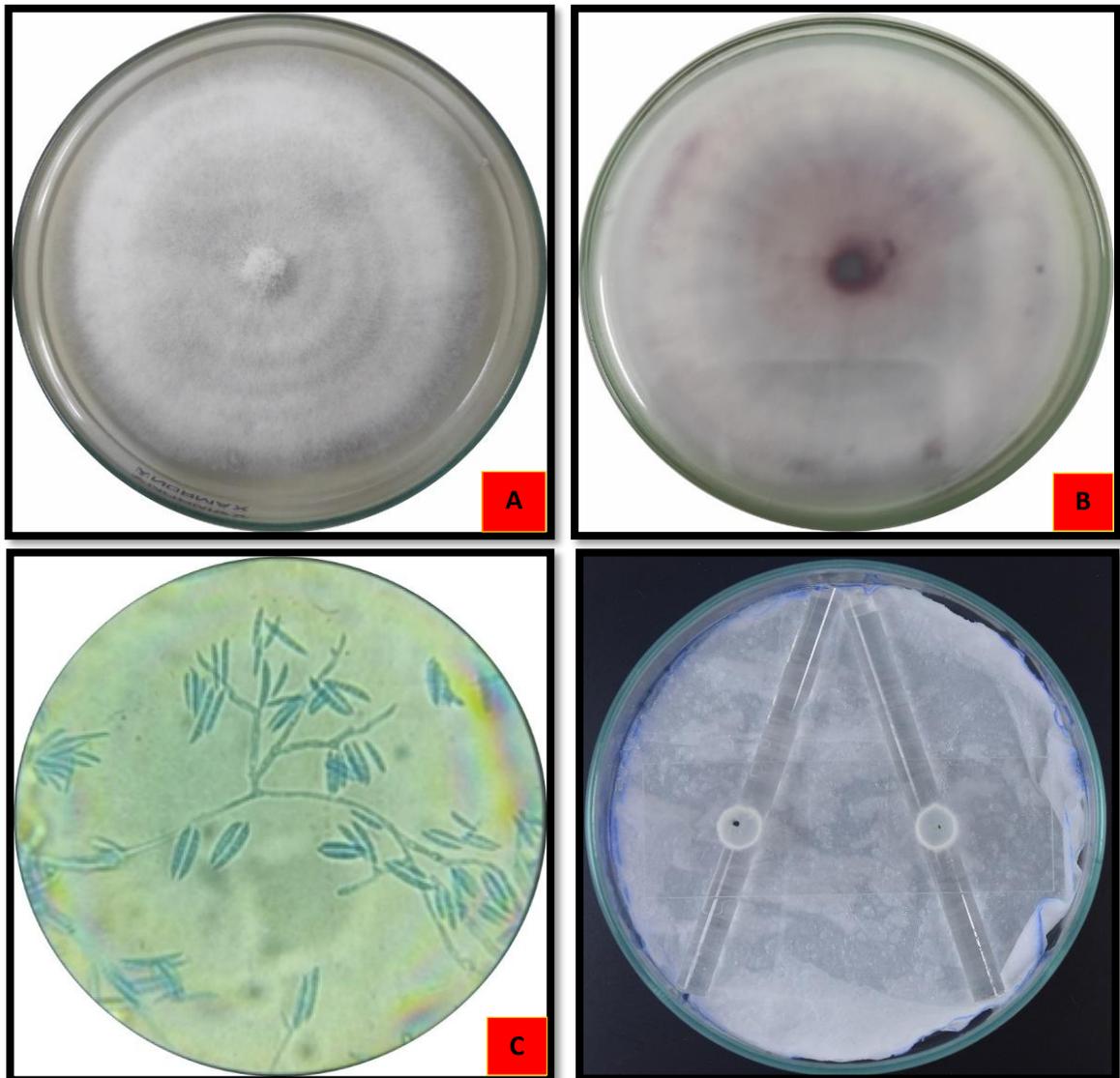
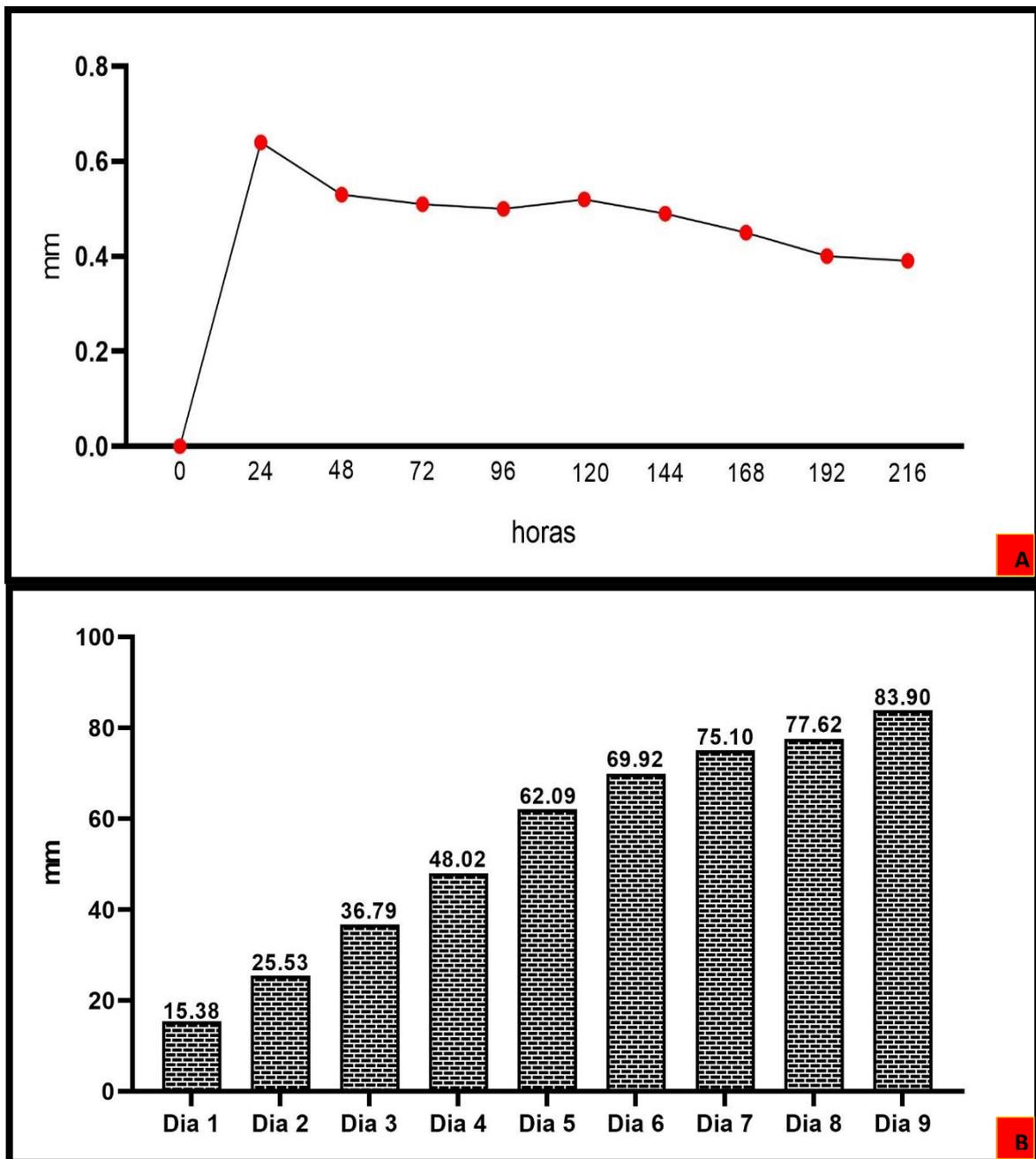


Figura 17: Estructuras morfológicas de *Fusarium* sp. **A:** Colonia de *Fusarium* sp. en medio PDA, vista anversa. **B:** Vista de reverso de la cepa de *Fusarium* sp.; **C:** Estructuras de conidias y conidióforos a un aumento de 60X.; **D:** Micro cultivó de la cepa de *Fusarium* sp.

4.1.4. Cinética de crecimiento de *Fusarium* sp.

Se tomaron los registros de medición de los halos de crecimiento de la cepa de *Fusarium* sp. hasta durante 9 días lo cual fue. Se aprecia que en las primeras 24 horas después de la siembra del disco, hay un acelerado crecimiento micelial alcanzando su punto máximo y eventualmente empieza a disminuir su crecimiento conforme avanza el tiempo e incubación. Este estudio nos proporciona información importante sobre el comportamiento de *Fusarium* sp. en cultivo in vitro y una mejor comprensión de su biología. Así como se aprecia en la figura 7 (A y B)

Figura 18: Evaluación de cinética de crecimiento de la cepa de *Fusarium* sp. cada 24 horas. (A y B)



4.2. Capacidad de promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus* sp.

Se realizó el cultivo overnight de la cepa de *Bacillus* sp. fue evaluado después de 12 horas de incubación a 28°C en un orbital Shaker, se observó crecimiento microbiano, que se cuantificó mediante la turbidez vista en el medio de cultivo líquido TY.

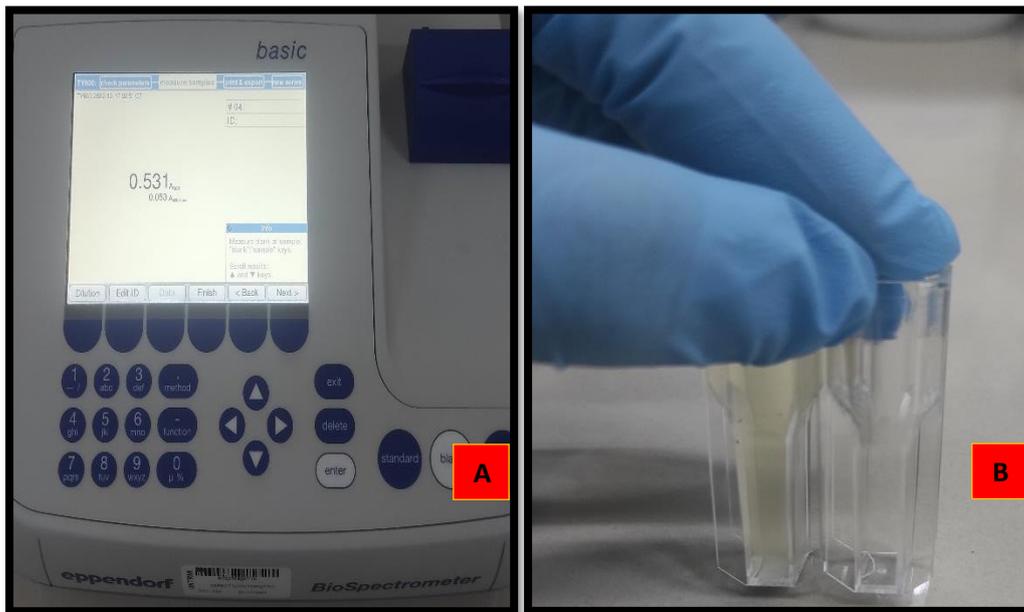


Figura 23: Cuantificación microbiana mediante bioespectrofotometro; **A**; Lectura de la densidad óptica en el bioespectrofotometro. **B**; Cubetas con el caldo de cultivo bacteriano de Luria Bertoni.

4.2.1. Capacidad antagonista mediante inhibición directa.

Se determino el potencial antagonista de *Bacillus* sp. sobre sobre *Fusarium* sp. El enfrentamiento *in vitro* se realizó de manera directa sobre agar Luria Bertoni durante 9 días con fotoperiodos de luz y oscuridad (12h/12h); en las primeras 24 horas se pudo apreciar el crecimiento bacteriano en el agar, alrededor del disco de *Fusarium* (5mm), asimismo el crecimiento bacteriano se dio en menor medida cuanto más cerca se encontraba al disco de *Fusarium* sp. apreciándose un halo más trasparente; asimismo se observaron que las colonias *Fusarium* presentaron elevamiento y distorsiones en su morfología respecto a la placa control de *Fusarium* sp.; dicha característica se mantuvo durante todo el tiempo del ensayo. Se pudo constatar una alta capacidad de inhibición que el crecimiento bacteriano inhibió en un 93.29 % al crecimiento fúngico, el cual se pudo contrastar con el grupo control (Figura 24).

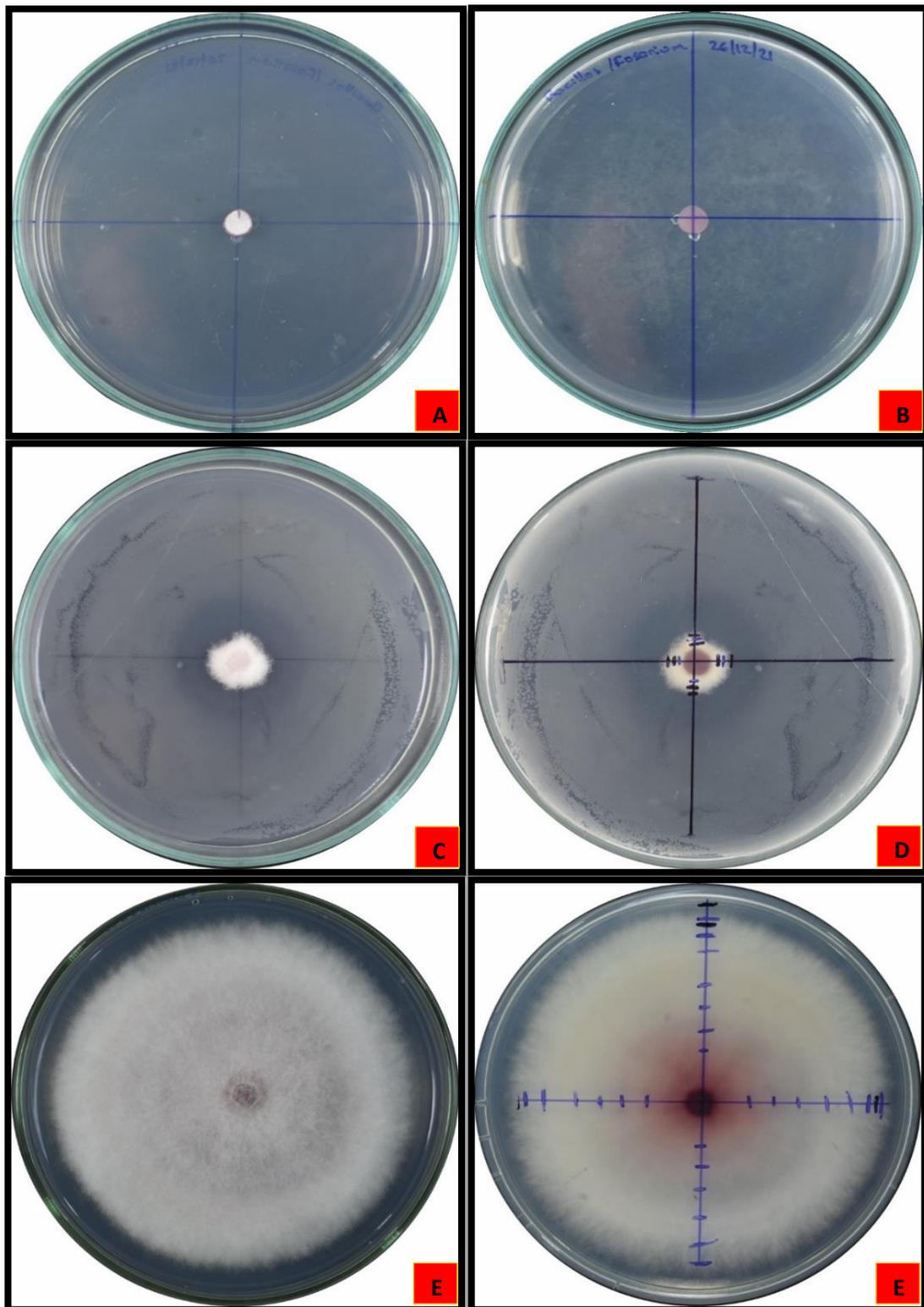


Figura 24: Capacidad antagonista de *Bacillus* sp. sobre *Fusarium* sp. Réplicas del crecimiento de *Fusarium* sp. en medio PDA. **A:** Anverso de la placa en el día 1; **B:** Reverso de la placa en el día 1; **C:** Anverso de la placa con *Bacillus* sp. frente a

Fusarium sp. **D**: Reverso de la placa con *Bacillus* sp. frente a *Fusarium* sp. **E**: Anverso de la placa control de *Fusarium* sp. **D**: Reverso de la placa control de *Fusarium* sp.

4.2.2. Capacidad solubilizadora de fosfato

La capacidad de solubilización de fosfato de la cepa de *Bacillus* sp. fue determinado por la formación de un halo translucido alrededor de la colonia bacteriana, que está asociada al proceso de solubilización de fosfato inorgánico (Figura 25), que fue 87 % la medición del halo traslucido fue realizado después de 72 horas de incubación

La cepa estudiada fue capaz de solubilizar fósforo, desempeñando un papel crucial en la mejora de la biodisponibilidad de este elemento en el suelo y la asimilación por parte de las plantas, destacando la capacidad para solubilizar formas no disponibles de fósforo y convertirlas en formas solubles y utilizables promueve el crecimiento y desarrollo de plantas de manera simbiótica.

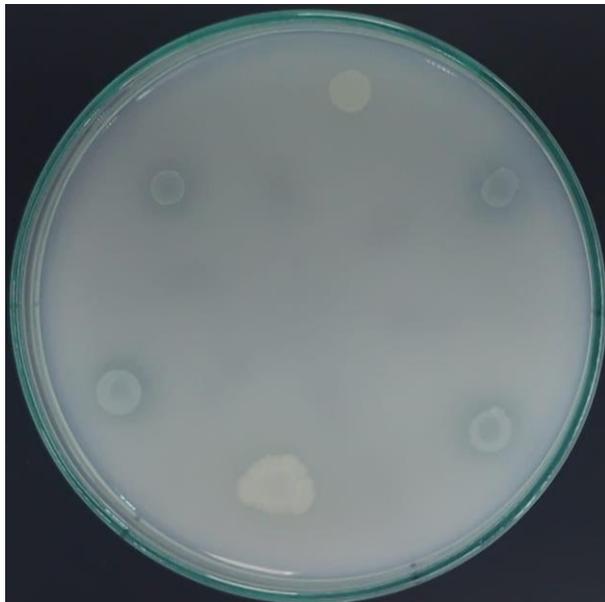


Figura 25: Solubilización de fosfato

4.2.3. Capacidad solubilizadora de Zinc

La cepa bacteriana de *Bacillus* sp. fue capaz solubilizar el zinc presente en el medio, dicha capacidad se corroboró mediante la formación de un halo traslucido alrededor de la colonia, que fue evaluado después de 72 horas de incubación, alcanzando un 75 % de crecimiento.

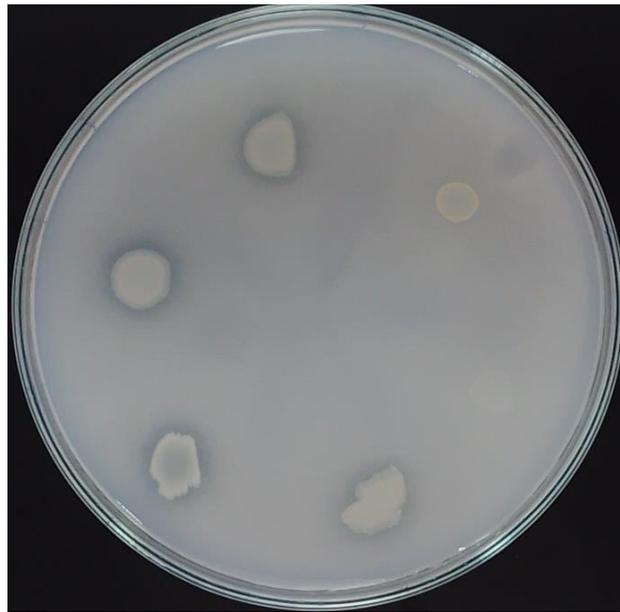


Figura 26: Solubilización de Zinc.

4.2.4. Producción de sideróforos

La cepa bacteriana de *Bacillus* sp. fue capaz de realizar la disolución de Fe al formar complejos con Fe (III) en el medio, dicha capacidad se corroboró mediante la formación de un viraje de color en el medio de agar alrededor de la colonia, que fue evaluado después de 72 horas de incubación.

Los sideróforos facilitan la disolución de Fe al formar complejos con Fe (III) en la superficie del mineral. Estos complejos luego se transfieren a la solución del suelo circundante, lo que hace que el Fe esté disponible para ser absorbido por microorganismos o plantas.

4.3. Caracterización molecular de las cepas microbianas

4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN microbiano

Se realizó la extracción de ADN empleando el kit de extracción de ácidos nucleicos de Promega (Wizard® Genomic DNA), (Fig.19). Después, de una serie de centrifugaciones, lisados y lavados el ADN fue precipitado y reconstituido en tampón adecuado. Seguidamente dicho DNA fue cuantificado obteniendo una concentración de 535.4 ng/μl. Finalmente fue almacenado en un rack a - 80°C.



Figura 19: Extracción y cuantificación de DNA microbiano A: Muestra de DNA genómico B: Cuantificación en bioespectrofotometro.

4.3.2. PCR y corrida en gel de electroforesis

Se realizó la reacción en cadena de Polimerasa durante 2 horas, obteniéndose una amplificación exitosa de los primers rpoB; cuyos primers empleados rpoB-F: ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT y rpoB-R: ACACCCTTGTTACCGTGACGACGACC; al igual que el primer gyrA (gyrA3-F:

GCDGCHGCNATGCGTTAYAC y gryA3-R: ACAAGMTCWGCKATTTTTTC); dichos primers fueron empleando para la identificación de especies pertenecientes al género *Bacillus* (Figura 20). Esto nos indica que el cebador empleado se unió correctamente al DNA diana. Además, se verifico la especificidad de la ampliación mediante un análisis de secuencia de las bandas en gel de agarosa amplificadas de manera exitosa nuestra región de interés, lo cual es importante y relevante para estudios de identificación a nivel de especie y caracterización microbiana.

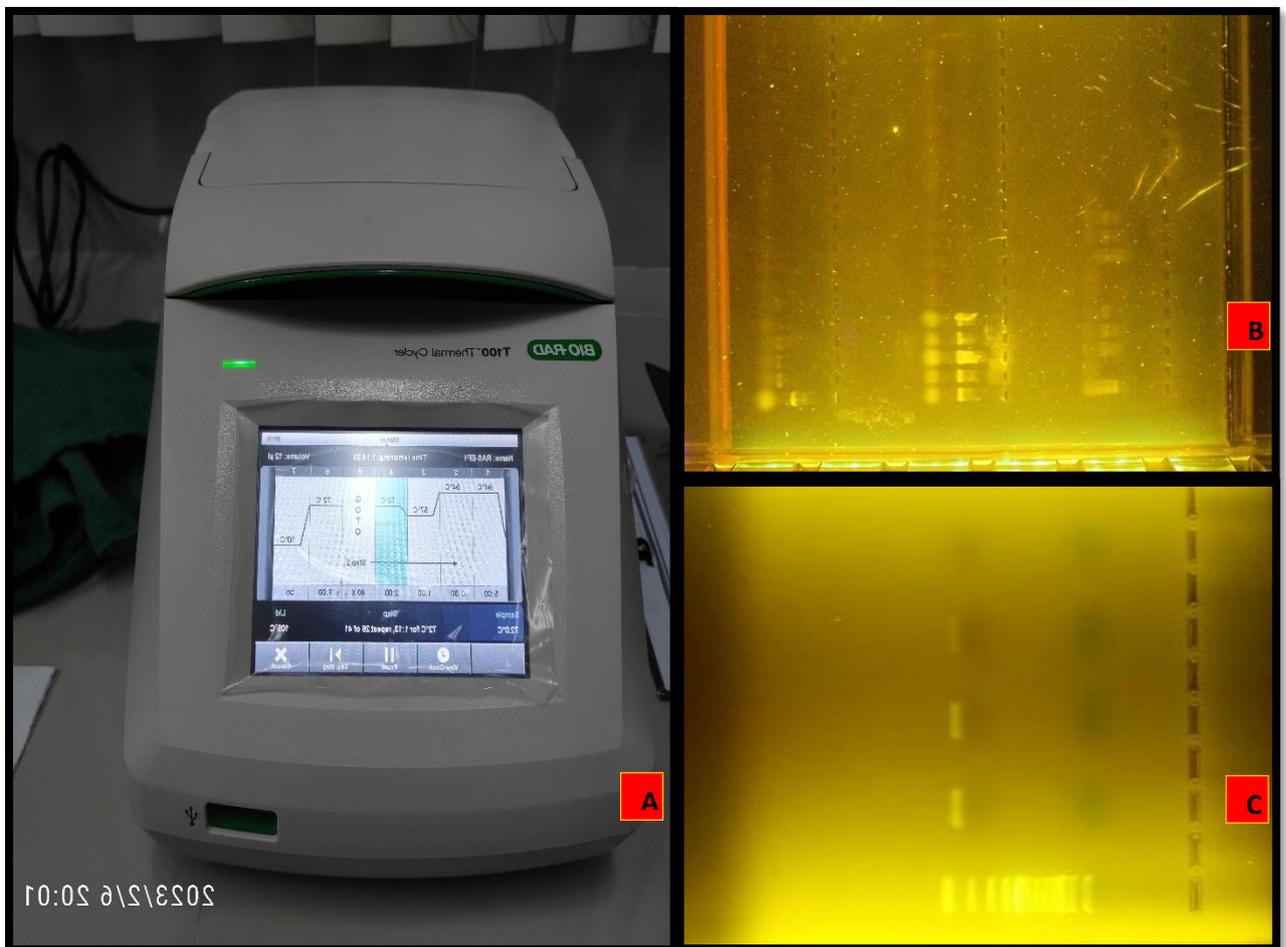


Figura 20: PCR y corrida en gel de electroforesis; A: Ciclado en el termociclador; B: Amplificación de DNA genómico; C: Amplificación de producto de PCR.

4.3.3. Identificación y análisis filogenético

Se obtuvo la secuencia de la región ADN 16S del aislado de *Bacillus* sp.; las secuencias del DNA 16S, compartió similitud de secuencias de un 100 % respecto a las secuencias procedentes de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Asimismo, el código de acceso de las secuencias con las que se compartió la identidad fue de 99.5 % (Figura 21)

Dichos resultados son respaldados por la caracterización de morfología macroscópica y microscópica, pruebas confirmativas realizadas para el género *Bacillus* sp. Este análisis filogenético ha permitido la identificación de especie por similitud por pares.

Figura 21: Identificación y análisis filogenético

4.4. Producción de inóculos en medios fermentativos

4.4.1. Incubación y procesos de fermentación

Se evaluaron la fermentación del inóculo de *Bacillus* sp. en ambos medios líquidos fermentativos; se observó un incremento en la densidad celular y en la densidad óptica medida por el bioespectrofotometro, así mismo se apreció un cambio en la turbidez de color del medio líquido (Figura 22)



Figura 22: Incubación y procesos de fermentación líquida.

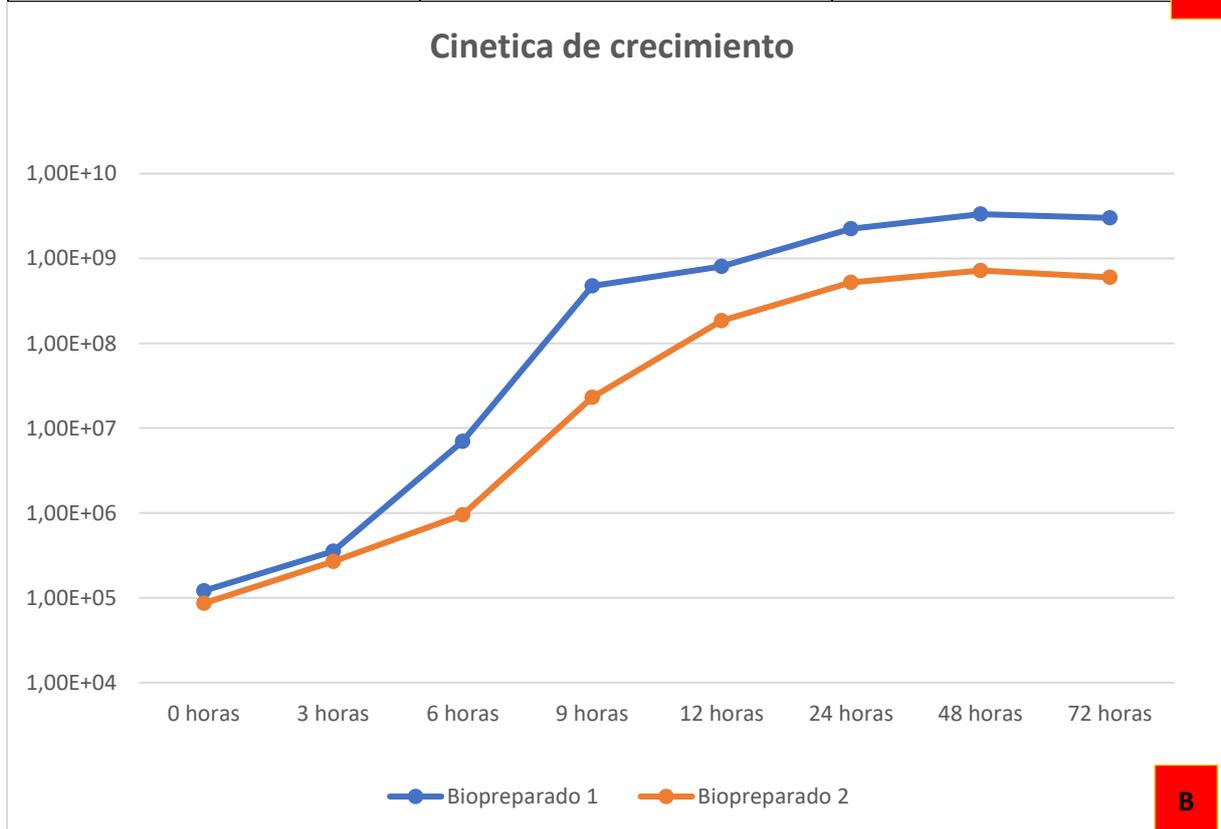
4.4.2. Cinética de crecimiento y producción de células de *Bacillus* sp.

Se realizó las lecturas de las UFC que crecieron en el medio Agar Luria Bertoni, se registraron la data obtenida y se compararon las UFC de ambos medios fermentativos, en donde se seleccionó el medio fermentativo a base de “leche + soya” por la mayor cantidad de colonias obtenidas en la siembra mediante las diluciones seriadas, durante los tiempos establecidos en la metodología. La tabla N°2 muestra la cinética de crecimiento en donde el biopreparado tuvo un crecimiento máximo de

3,13E+09 frente al biopreparado 2 que tuvo un máximo de 6,21E+08 a las 48 horas de incubación

Tiempo	Biopreparado 1	Biopreparado 2
0 horas	1,21E +05	0,86 E*05
3 horas	3,53E+05	2,68E+05
6 horas	6,96E+05	4,50E+05
9 horas	4,74E+08	2,30E+08
12 horas	8,04E+08	6,85E+08
24 horas	2,23E+09	1,21E+08
48 horas	3,13E+09	6,21E+08
72 horas	3,31E+09	9,21E+08

A



B

Tabla 2. Lectura de las Unidades Formadoras de Colonia de 2 inóculos fermentativos (UFC); B: Grafica de la cinética de crecimiento de la concentración a Log10 (UFC.mL⁻¹)

4.5. Ensayo de aplicación a nivel invernadero

El ensayo fue realizado bajo condiciones de invernadero para evaluar el crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.); parámetros que se midieron empleando un diseño experimental completamente al azar (DCA), con 20 repeticiones por tratamientos; para el cual se recopilaron la data obtenida de los siguientes parámetros. Sin embargo, se observó que algunas semillas no germinaron por lo cual el número de repeticiones entre cada tratamiento fue diferente.

4.5.1. Determinación del efecto del bioensayo sobre las plántulas

4.5.1.1. Evaluación en la germinación de semillas de maíz.

Se observo que en T1 obtuvo la tasa de germinación de semillas más bajo en contraste con el T2 a base de *Bacillus* sp., seguida por el T4 que es el grupo control y finalmente por T3 perteneciente a la inoculación mixta.

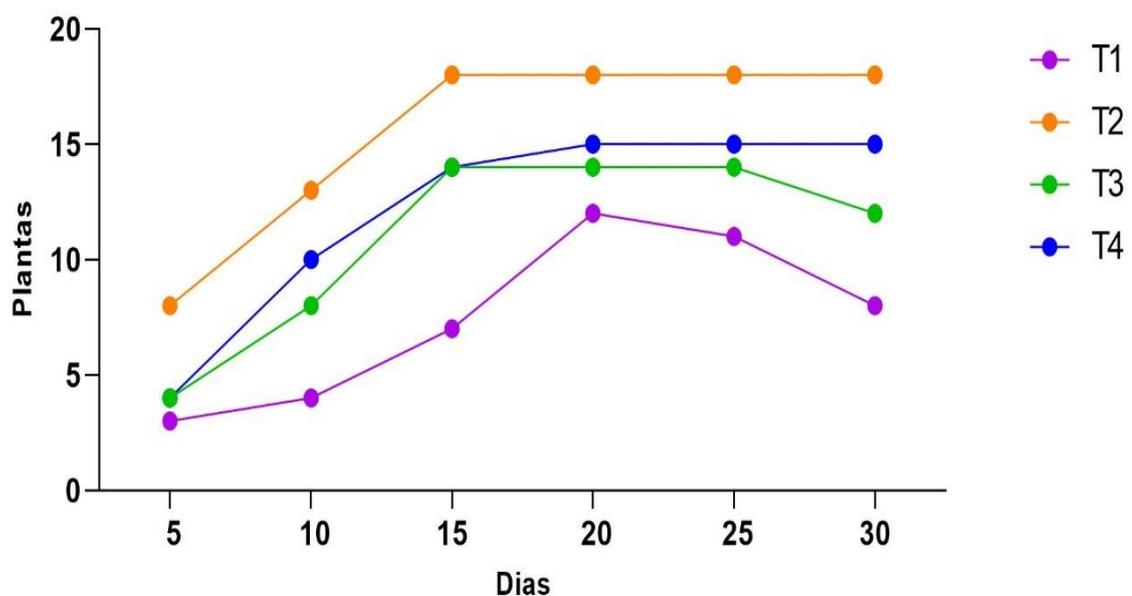


Figura 28: Germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.)

4.5.1.2. Evaluación de crecimiento:

Se midió la altura de las plántulas a los 30 días de siembra; mediante análisis estadístico empleando el test de ANOVA, se observó una diferencia significativa en la altura de las plántulas en todos los grupos tratados en comparación con el grupo de control.

En el tratamiento 1 a base con inóculo de *Fusarium* sp con una concentración de $1 \cdot 10^6$ esporas/ml, se observó síntomas de infección característicos de *Fusarium* sp. empezando por el marchitamiento y el amarillamiento de las hojas jóvenes, conllevando a lesiones en el tallo y el marchitamiento; asimismo se observó que las raíces de las plántulas de maíz se volvieron blandas con signos de pudrición. En el Tratamiento 2 a base de inóculo bacteriano de 1 (D.O) se detectó una mayor vigorosidad y crecimiento más homogéneo en las plántulas de maíz amarillo duro cultivados en las bandejas; esto podría asociarse a que *Bacillus* sp. aumenta la mejor absorción de nutrientes. En el tratamiento 3 a base de inóculo bacteriano de 1 (D.O) e inóculo de *Fusarium* sp. con una concentración de $1 \cdot 10^6$ esporas/ml, se observó que, en algunas plántulas de maíz amarillo duro, algunas hojas presentaron marchitamiento, mientras que otras plántulas no mostraron síntomas de infección por *Fusarium* sp. Finalmente en el tratamiento 4 correspondiente al grupo control se observaron plántulas libres de síntomas de infecciones por *Fusarium* sp.

Asimismo, mediante un análisis estadístico de ANOVA, se pudo comprobar el efecto de crecimiento vegetal de las plántulas de maíz amarillo duro mediante diferencias significativas, respecto a los otros tratamientos.

4.5.1.3. Evaluación de biomasa:

El análisis de varianza a un nivel de significancia de ($\alpha = 0,05$) presento diferencias significativas ($p < 0.0001$) para los tratamientos realizados en la evaluación de biomasa a los 30 días de siembra. Lo que nos permite inferir que el T2, correspondiente al tratamiento con inoculante microbiano de *Bacillus* sp. presento mayor porcentaje de materia seca (48.43 %); seguido del T4 correspondiente al tratamiento control con inoculaciones de agua estéril con una materia seca de 42.99 %; seguido del T3 correspondiente al tratamiento con *Bacillus* sp y *Fusarium* sp. obteniendo una materia seca de 37.40 %; finalmente el T1 correspondiente al tratamiento con inoculante fúngico de *Fusarium* sp. fue el tratamiento que menor materia seca se obtuvo con un 30.03 %. (Fig. 29)



Figura 29: Evaluación de biomasa de Maiz (*Zea mays* L.)

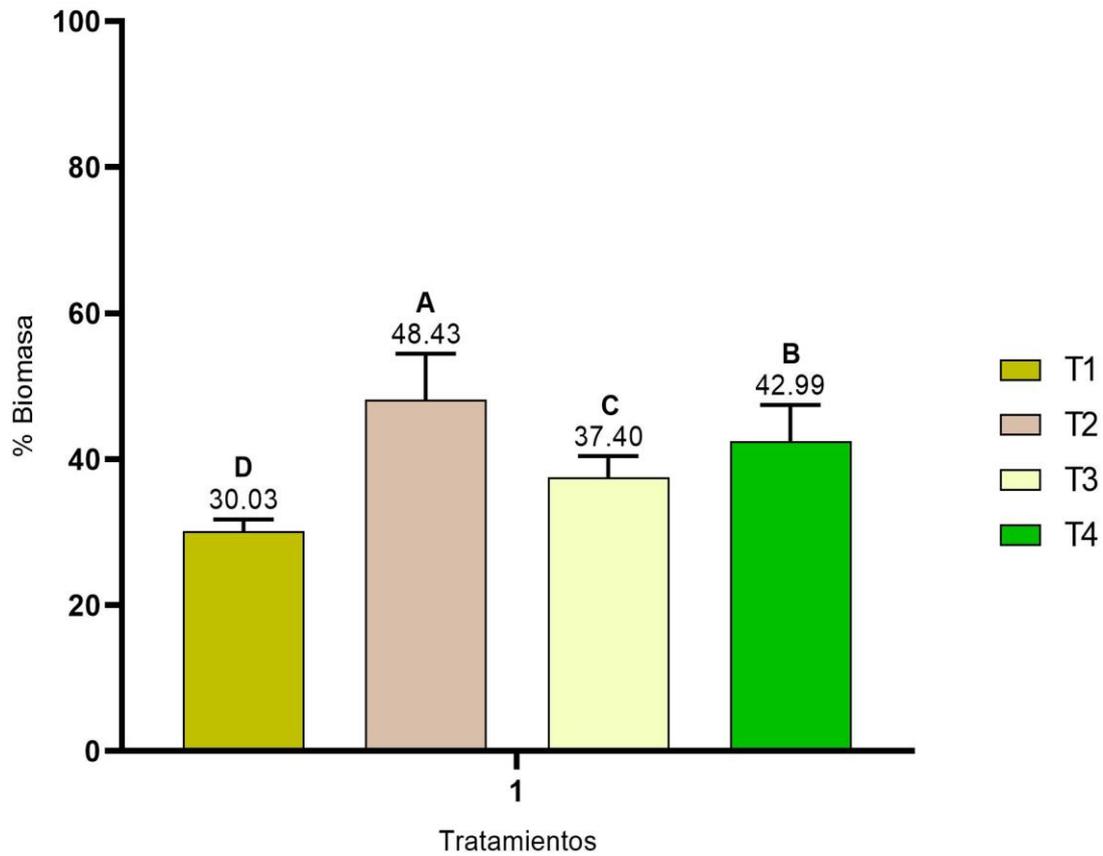


Figura 30: Grafica de test de Tuckey (Alfa =0.05) para la comparación de medias de crecimiento de los tratamientos de maíz (*Zea mays* L.)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
biomasa	49	0,87	0,87	6,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2000,78	3	666,93	103,92	<0,0001
Tratamiento	2000,78	3	666,93	103,92	<0,0001
Error	288,79	45	6,42		
Total	2289,57	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,81262

Error: 6,4175 gl: 45

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T2	48,43	15	0,65	A
T4	42,99	14	0,68	B
T3	37,40	12	0,73	C
T1	30,03	8	0,90	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 31: Test de ANOVA (0.05) de la biomasa de Maíz (*Zea mays* L.)

Prueba de Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO biomasa	49	0,00	2,45	0,97	0,5320

Prueba de Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15,13	3	5,04	2,72	0,0556
Tratamiento	15,13	3	5,04	2,72	0,0556
Error	83,47	45	1,85		
Total	98,60	48			

En base al Test de ANOVA se acepta la hipótesis alternativa, en donde verifica que si existe diferencia significativa entre los 4 tratamientos evaluados.

CAPITULO

V:

DISCUSIONES

5. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, la crio preservación a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de nuestras cepas microbianas nos permitirá conservar la viabilidad, estabilidad fisiológica, variación genética y patogenicidad de nuestras cepas, tanto de *Bacillus* sp. como de *Fusarium* sp.; una preservación $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ está enfocado a corto plazo; a diferencia de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la que es necesario adicionar agentes crio protectores; (Pérez-Reytor & Sosa (2010) mencionan que moléculas como glicerol, etilenglicol mejoran la estabilidad celular al reducir la actividad y contenido de agua intracelular, de manera que se evitaría una cristalización o vitrificación de las estructuras internas de la célula. Es importante mantener las características fisiológicas de nuestra cepa bacteriana, para en un futuro estudio la data obtenida no presente variaciones con respecto a los objetivos estudiados. Belmonte *et al.* (2009) indican que a pesar de haber crio preservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtuvieron un porcentaje de sobrevivencia entre 70- 80%, las cepas microbianas que no sobrevivieron lo pueden asociar a que fueron afectadas por fenómenos fisicoquímicos y a una inestabilidad en las organelas. En base a nuestros resultados a pesar de haber conservado nuestras cepas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no pudimos evaluar la viabilidad a largo plazo de nuestra cepa, porque no abarco los límites de este estudio; sin embargo, si queda abierta la posibilidad para futuros estudios como lo realizo. Pérez-Reytor & Sosa (2010) que plantean que la crio preservación se asocian a un daño oxidativo y puede inducir a mutagénesis.

En un periodo de 6 meses de conservación, se pudo apreciar que la capacidad de crecimiento bacteriano fue diferente a antes de crio preservar; se observaron colonias de la cepa de *Bacillus* sp. entre las 24 y 48 horas de incubación a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que nos hace sugerir que, a pesar de mantener una viabilidad, las células sufren algunos retrasos respecto a su cinética de crecimiento (Cayra *et al.*, 2017); por lo que

(Gutierrez-Jimenez *et al.*, 2015) resaltan la importancia de emplear controles de calidad donde se evalué parámetros.

Las 2 pruebas preliminares de nuestra cepa bacteriana para genero de Bacillus tanto de prueba de catalasa como de tinción gran resultaron positivas; la prueba de catalasa mediante la descomposición del peróxido de hidrogeno en una molécula de H₂O y O como lo menciona Arteaga-Chávez *et al.* (2017) que también realizo tinción gran obteniendo que son bacterias gran positivas con una coloración azul violeta propia de este género que presentan una pared gruesa de peptidoglucano; y es que las bacterias gran positivas retienen el colorante cristal violeta a diferencia de las bacterias gran negativas que cuando se les adiciona el colorante cristal violeta es removido, obteniendo así un contraste en la coloración (Marquez, 2007; Realpe *et al.*, 2022).

Se observo caracteres morfológicos propios del género *Fusarium* sp. al igual que Betancourth Garcia *et al.*, (2020) quienes observaron colonias fúngicas de acelerado crecimiento, y una apariencia algodonosa que tenía coloraciones blancas, resultados similares en nuestra cepa que mantuvo esa coloración hasta el cuarto día en donde empezó a tornar a un color purpura en su mayoría; los bordes de la colonia fúngica se tornaron a un color más claro (Duarte *et al.*, 2016). En la caracterización micro morfológica se apreció las esporas propias del género *Fusarium* con una forma de media luna segmentada (Bonelo & Sánchez, 2018; Rodríguez- Castro *et al.*, 2020), rodeada por una estructura filamentosa compuesta por hifas septadas unicelulares que presentan la capacidad de colonizar y penetrar los tejidos vegetales (Chavarri *et al.*, 2017; Miguel-Ferrer *et al.*, 2021) con capacidad de producir los conidios

característicos que son dispersadas en el ambiente ocasionado su propagación e infección (Maulidia *et al.*, 2021).

Los resultados obtenidos de la identificación de la morfológica de las cepas tanto bacteriana como fúngica a nivel macroscópico y microscópico son un método complementario para la identificación genética microbiana

Desde una perspectiva biológica estas caracterizaciones morfológicas radican en su aplicabilidad en diversas áreas. Por ejemplo, la morfología de *Bacillus* sp. puede ser relevante en la producción de biofertilizantes y biopesticidas, donde el conocimiento de su forma y estructura microbiana ayudara en la selección de cepas adecuadas para promover el crecimiento vegetal y controlar patógenos como lo menciona (Portela-Dussán *et al.*, 2013). Por otro lado, la caracterización morfológica de *Fusarium* sp. es esencial para identificar y controlar infecciones fúngicas asociados a cultivos agrícolas (Cruz Martín *et al.*, 2021).

En nuestro estudio caracterizamos la cepa de *Bacillus* sp. empleamos técnicas de análisis molecular como la secuenciación del gen 16S DNA mediante 2 marcadores moleculares; esto permite identificar y clasificar la cepa de *Bacillus* a nivel de especie siendo *Bacillus amyloliquefaciens*, el nombre científico de la cepa estudiada.

La caracterización molecular de la cepa *Bacillus* sp. es fundamental para el desarrollo de aplicaciones prácticas en estos campos (Sambo *et al.*, 2018) , por lo que se podría realizar la identificación de genes de interés, seleccionando cepas de *Bacillus* con características específicas para su uso en la producción de enzimas industriales, biofertilizantes, bioplaguicidas y otros productos biotecnológicos (Bisang *et al.*, 2009). El uso de *Bacillus* sp. en la biotecnología ofrece un gran potencial para el desarrollo de soluciones sostenibles en la agricultura y otras áreas de interés

(Portela-Dussán *et al.*, 2013); promoviendo así el avance de la biotecnología y contribuyendo al desarrollo de prácticas agrícolas más eficientes y respetuosas con el medio ambiente.

Se llevó a cabo la evaluación de cinética de crecimiento de nuestra cepa de *Bacillus* sp comparando 2 medios líquidos fermentativos. Inicialmente, se realizó la caracterización en matraces. La tabla N°2B muestra la dinámica de crecimiento, donde en el biopreparado N°1 logró un crecimiento máximo $3,33E+09$ UFC mL¹ a las 48 horas, mientras que en el medio soya se obtuvo un crecimiento de $7,21E+08$ UFC mL¹ a las 8 horas. Estos resultados indican que el biopreparado N°1 presenta una concentración de 4.62 veces más que el biopreparado N°2 en relación a las UFC de bacterias. El análisis de la cinética de crecimiento de la cepa de *Bacillus* sp. proporciona información sobre las diferentes fases de crecimiento de la bacteria. La comparación de las cinéticas de crecimiento en ambos medios fermentativos muestra que el comportamiento de crecimiento de la cepa es similar en ambos medios, pero el crecimiento y la esporulación ocurren en un tiempo superior en el biopreparado N°1. Se descarta la posibilidad de que esta diferencia sea causada por el tamaño del inóculo, ya que se obtuvo la misma concentración de células para ambos cultivos en un volumen de 5 mL (OD=1). Sin embargo, se demostró graficar las 4 etapas de crecimiento microbiana como lo menciona

En un estudio previo realizado por Sarmiento (2012) con la cepa de *B. subtilis* 105, se comparó el crecimiento de la cepa en ambos medios utilizando un conteo directo de las bacterias en una cámara de Neubauer. Sin embargo, esta técnica no permite distinguir entre células vivas y muertas. Por lo tanto, en este estudio se tuvo que caracterizar el crecimiento de la cepa utilizando la técnica de UFC, la

cual excluyó las células incapaces de formar colonias; algo que sí se pudo verificar en nuestra investigación

Se obtuvo una alta capacidad antagonista de la cepa de *Bacillus* sp. sobre *Fusarium* sp., siendo un resultado prometedor por una reducción de crecimiento del hongo fitopatógeno en un 93 % de crecimiento. Los mecanismos por el cual *Bacillus* sp. ejerce esta actividad antagonista puede estar relacionado con la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, así como la competencia por nutrientes y espacio; estos factores contribuyen a la inhibición del crecimiento y desarrollo de *Fusarium* sp. Mejía-Bautista *et al.* (2016) afirman que dichas variaciones del fitopatógeno podrían estar asociados a la actividad antifúngica de la cepa de *Bacillus* sp. Este tipo de ensayos son de suma importancia porque permiten la extrapolación de resultados prometedores para la generación de nuevos productos biotecnológicos enfocados al control biológico en cultivos agrícolas como estrategias de manejo integrado de enfermedades en diferentes cultivos (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019) , especialmente aquellos afectados por *Fusarium* sp.; abriendo nuevas posibilidades en la búsqueda de alternativas sostenibles para la protección de los cultivos agrícolas (Viera-Arroyo *et al.*, 2020).

Se obtuvo un 47 % la medición del halo traslucido después de 72 horas de incubación. (Ascencio-Lino *et al.*, 2007) afirma que solo un pequeño porcentaje (0.1%) del fósforo (P) en el suelo está disponible para ser absorbido directamente por las plantas, es necesario importante emplear bacterias solubilizadora de fósforo (BSF) para convertir la forma insoluble del P en una forma soluble, de manera que pueda estar disponible para las plantas, quien obtuvo 54 aislados bacterianos con capacidad de solubilización de fosforo, destacando el uso de bacterias asociadas a la rizosfera.

(Vieira *et al.*, 2021) menciona que el uso de fertilizantes fosfatados es necesario para el crecimiento y desarrollo adecuado de los cultivos, para la cual emplearon unas plantas inoculadas con dos aislamientos bacterianos con capacidad de solubilización de fosfato, encontrando un mayor peso seco y una mayor captación de fósforo y nitrógeno en la parte aérea cuando se cultivaron sin la adición de fertilizante fosfatado; sugiriendo el uso potencial de los aislamientos bacterianos T79 y K36 como inoculantes para el cultivo de frijol cultivado en suelos no esterilizados con bajo contenido de fósforo disponible. Sin embargo, se debe considerar que la solubilización de fosfato no sea el único mecanismo responsable de la mejora en el crecimiento vegetal.

Nuestra cepa bacteria presento un 55 % de solubilización de Zinc a nivel *in vitro*, lo cual demuestra un alto potencial del zinc ambiental y favorecer su asimilación por parte de las plantas, por lo que se puede reafirmar como una bacteria promotora de crecimiento. La absorción del zinc ocurre principalmente en forma de Zn^{2+} , un catión divalente, aunque en suelos calcáreos con pH alto se ha observado su absorción como $ZnOH^+$, un catión monovalente. Al aumentar la disponibilidad de zinc biológico a través de procesos, se puede reducir la dependencia de fertilizantes químicos de zinc, que pueden tener impactos negativos en el suelo y el medio ambiente. Además, los microorganismos solubilizadores de zinc, como el *Bacillus*, pueden establecer una relación simbiótica con las raíces de las plantas, lo que no solo promueve la absorción de zinc, sino que también puede mejorar la resistencia de las plantas a condiciones de estrés abiótico. Las interacciones entre el zinc, las plantas y los suelos son complejas y desempeñan un papel fundamental en la determinación del momento y la forma adecuada de aplicar zinc a los cultivos (Gontia-Mishra *et al.*, 2016). Aumentar la concentración de zinc y hierro en los cultivos alimentarios es esencial para lograr

una mayor producción agrícola y una mejor salud humana, y representa un desafío global significativo. La deficiencia de zinc es común tanto en cultivos como en seres humanos (Welch *et al.*, 2009). Los tejidos vegetales requieren Zn en cantidades relativamente pequeñas, en el rango de 5 a 100 mg kg⁻¹. La deficiencia mundial de zinc en los cultivos se debe principalmente a la baja solubilidad de este elemento en el suelo, más que a su disponibilidad limitada (Bahadur *et al.*, 2016) . Es por ello la capacidad de solubilización del zinc se vuelve de vital importancia en la optimización de su absorción y uso eficiente por parte de las plantas, siendo la bacteria empleada en esta investigación una alternativa de gran potencial como solubilizadora de Zinc, lo cual se apreció en los ensayos a nivel *in vitro* y a nivel invernadero desarrollado; por lo que a modo de conclusión se puede afirmar que dicha capacidad solubilizadora puede tener un impacto significativo en la productividad agrícola y la salud humana.

Nuestra cepa bacteria de *Bacillus* sp presento un 49 % de producción de Sideróforos a nivel *in vitro*, lo cual se observó mediante el viraje del color del medio de cultivo. González (2022) destaca la importancia de sus aislamientos bacterianos endófitos en la promoción del crecimiento de las plantas resaltando la cepa de *Bacillus* con alta capacidad de producción de sideróforos, lo cual es relevante debido a que los sideróforos son compuestos orgánicos secretados por las bacterias que promueven la absorción de hierro por las plantas.

Esta capacidad de producción de sideróforos por parte de la cepa de *Bacillus* puede contribuir a mejorar la disponibilidad de hierro en el suelo y favorecer el crecimiento saludable de las plantas (López, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio resaltan el potencial de nuestra cepa de *Bacillus* con alta capacidad de producción de sideróforos, como una estrategia promisoría para mejorar el crecimiento de las plantas, presentar implicaciones importantes en el manejo sostenible y en la

reducción de la dependencia de fertilizantes químicos, promoviendo prácticas más amigables con el medio ambiente y económicamente viables para los agricultores. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para comprender mejor los mecanismos de acción de estas bacterias y su interacción con las plantas en condiciones de campo. demostró que los Fito sideróforos, producidos por plantas, aceleran la disolución de minerales que contienen Fe como el ferrihidrato y la goethita. Los estudios de ingeniería genética han demostrado que la expresión de los genes transportadores de Fe-fitosideróforo en las plantas mejora su capacidad para disolver el Fe de los minerales del suelo.

El género *Bacillus* tiene una gran variedad de especies que presenta una amplia variedad de metabolismo y fisiología, que presentan una gran capacidad de crecimiento de promoción vegetal. El papel de los lipopéptidos (LP) en las interacciones bacterianas con las plantas aún no están claros. en la resistencia sistémica inducida (ISR) y la colonización bacteriana de las superficies de las plantas son de particular interés. que la capacidad de una cepa para colonizar y permanecer en varias superficies de plantas está directamente relacionada con la cantidad de surfactina que produce, lo que limita su capacidad para iniciar ISR. Las rizobacterias que fomentan el crecimiento de las plantas (PGPR), son un conjunto de bacterias asociadas a las raíces que desempeñan una importante función en la regulación de la salud de las plantas y la productividad del suelo mediante la generación de compuestos bioactivos (Harish *et al.*, 2009) .

Sin embargo, se debe considerar que para una adecuada producción de biofungicida, se requiere incorporar la composición nutricional adecuada para la

cinética de crecimiento, esporulación; por lo cual se debe considerar la fuente de carbono y nitrógeno.

En general, los resultados indican que las inoculaciones microbianas influenciaron en la germinación, crecimiento y biomasa de las plántulas de maíz amarillo duro, en contraste con el grupo control. Esto demuestra la importancia de emplear *Bacillus* sp como promotor de crecimiento vegetal y su capacidad biofungicida, ya que pueden influir en el desarrollo saludable de las plántulas y, potencialmente, en la producción de cultivos a gran escala.

Se evaluó la promoción de crecimiento vegetal por parte de la cepa de *Bacillus* sp., para la cual se consideró los parámetros clásicos de evaluación de biomasa, siendo el peso seco un indicador de la cantidad de carbono total en la planta, permitiéndonos analizar aspectos importantes de la fisiología, que oscilaron entre el 11 y 20 % del peso total. En nuestro estudio, se evaluó el peso seco de biomasa de las plántulas de maíz, el cual osciló entre el 11% y el 20%. Para obtener estos valores, se deshidrataron las plántulas durante 48 horas a una temperatura de 120 grados Celsius. Estos resultados coinciden con resultados de Bécquer *et al.*, (2021) que han informado un rango similar de peso seco de biomasa en plántulas de con inoculaciones microbianas. El peso seco de biomasa es un parámetro importante para evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que refleja la acumulación de materia orgánica (Bedoya-Justo & Julca-Otiniano, 2021).

Es importante destacar que la cantidad observada en el peso seco de biomasa de las plántulas de maíz puede estar influenciada por diversos factores, como el genotipo de las plantas, las condiciones de cultivo y los tratamientos aplicados. Los resultados obtenidos en reflejan una producción de biomasa relativamente normal en

las plántulas de maíz bajo las condiciones específicas utilizadas. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para comprender completamente los factores que contribuyen a la escasez en el peso seco de biomasa y su relación con el crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz en diferentes etapas de crecimiento y bajo diversas condiciones de cultivo como lo afirma Zulueta-Rodríguez *et al.*, (2020).

CAPITULO

VI:

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- Se caracterizó fenotípicamente las cepas de *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp., mediante evaluaciones morfológicas a nivel macroscópico y microscópico lo que permitió comprender mejor su interacción vegetal.
- Se determinó que la cepa de *Bacillus* sp. tiene capacidad para actuar como promotor de crecimiento vegetal (PGPR), lo cual sugiere su potencial para mejorar el desarrollo y crecimiento vegetal.
- A través del uso de marcadores moleculares, se logró identificar nivel de especie la cepa de *Bacillus* sp., siendo *Bacillus amyloliquefaciens* la especie empleada para esta investigación.
- Se logró desarrollar un biofungicida a partir de la cepa de *Bacillus* sp., lo que implica la producción y formulación de un producto efectivo y consistente para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.
- Mediante ensayos en condiciones de invernadero, se evaluó la respuesta del cultivo de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) infectado por *Fusarium* sp. frente a la inoculación del biofungicida a partir de la cepa de *Bacillus* sp.

6.2. Recomendaciones

- Considerando la importancia del control biológico como una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente para combatir enfermedades en los cultivos agrícolas, se recomienda llevar a cabo un estudio exhaustivo que explore el potencial de otros microorganismos nativos como agentes de control en la supresión de la infección por fitopatógenos en diversos cultivos de interés agrícola.

CAPITULO

VII:

FUENTES

DE

INFORMACION

7. FUENTES DE INFORMACIÓN

7.1. Fuentes bibliográficas

- Acurio-Vásconez, R. D., Mamarandi-Mossot, J. E., Ojeda-Shagñay, A. G., Tenorio, E. M., Chiluisa-Utreras, V. P., & Vaca-Suquillo, I. D. los Á. (2020). Evaluación de *Bacillus* spp. como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y lechuga (*Lactuca sativa*). *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1–16. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1465
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofré, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP 218 and ARP 23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>
- Alvarez, M., Tucta, F., Quispe, E., & Meza, V. (2018). Incidence of the inoculation of beneficial microorganisms in the strawberry (*Fragaria* sp.) crop. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 33–42. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.04>
- Arcos, J., & Zúñiga, D. (2015). EFFECT OF RHIZOBACTERIA IN THE CONTROL OF *Rhizoctonia solani* IN POTATO CROPS. *Ecología Aplicada*, 14(2), 95–101.
- ArgenBio. (2021). *Elaboración de una planta transgénica: Técnica de Agrobacterium tumefaciens*.

- Arteaga-Chavez, F., Lopez-Vera, M., Laurencio-Silva, M., Rondon-Castillo, A., Milan-Florido, G., Barrios-Gonzales, V., & Bozourt-Salabarría, R. (2017). Selección e identificación de aislados de *Bacillus* spp. del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 55–64.
- Ascencio-Lino, T., Matamoros-Alcívar, E., Sandoya-Sánchez, V., Barcos-Arias, M., & Naranjo-Morán, J. (2007). Estudio exploratorio de bacterias solubilizadoras de fosforo en 2 habitas asociados con *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. *Revista Bionatura*, 1575(1578), 743–759. <https://doi.org/10.1201/9781420005271.ch57>
- Asela, D., del Puerto Rodríguez, M., Susana, D., Tamayo, S., Daniel, L., & Palacio Estrada, E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud Effects of pesticides on health and the environment. In *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* (Vol. 52, Issue 3). <http://scielo.sld.cu>
- Bahadur, I., Maurya, B. R., Kumar, A., Meena, V. S., & Raghuwanshi, R. (2016). Towards the soil sustainability and potassium-solubilizing microorganisms. In *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (pp. 255–266). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_18
- Bautista, E., Mesa, L., & Gómez, M. (2018). Alternatives for the production of microbial biopesticides based on fungi: the case of Latin America and the Caribbean. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 585–604. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>
- Bécquer, C. J., Puentes, A. B., Cabrera, A., Hernández, M., Sánchez, A., & Bécquer, C. J. (2021). Efecto de la inoculación con microorganismos

benéficos en variables agroproductivas de *Morus alba*. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 55(2). <https://orcid.org/0000-0002-5738-7838>

Bedoya-Justo, E., & Julca-Otiniano, A. (2021). Efecto de la materia orgánica en el cultivo de palto variedad fuerte en moquegua, Perú. *IDESIA*, 39(4), 111–119.

Belmonte, A., Noguerras, M. G., Belén Contigiani, M., Gandini, V., & Sutich, E. G. (2009). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Bioquímica y Patología Clínica*, 72(2).

Betancourth García, C., Salazar González, C., Lagos Mora, L. E., Díaz Rodríguez, V., & Mora Chaves, S. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1). <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>

Bisang, R., Campi, M., & Cesa, V. (2009). *Biotechnología y desarrollo*.

Blanco, B. M., Antonio Vejar, V., Bello-Martínez, J., Palemón, F. A., Romero Ramírez, Y., Orbe Díaz, D., & Toribio Jiménez, J. (2020). *Bacterias promotoras de crecimiento vegetal para incrementar la producción de Lactuca sativa L. en campo*. <http://www.fao.org/docrep/003/w3613s/>

Bonelo, C. L. Y., & Sanchez, L. L. C. (2018). Control biorracional de hongos del género *Fusarium*. *Biociencias*, 41(2), 77–95. <https://orcid.org/0000-0001-7796-1326>

- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de *Bacillus* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*) PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Bacillus* spp. STRAINS FROM POTATO (*Solanum tuberosum*) RHIZOSPHERE. *Ecología Aplicada*, 9(1), 30–39.
- Caro Quintero, A., González, C., Balbín-Suárez, A., Wisniewski, M., Berg, G., Smalla, K., & Cotes, A. M. (2018). *Capítulo 4 Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos Microbiome studies in the biological control of plant pathogens.*
- Castañeda Alvarez, E., & Consuelo Sánchez, L. (2016). *Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género Bacilo sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre Fusarium sp.*
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2015). *Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases.*
- Cayra, E., Dávila, J. H., Villalta, J. M., & Rosales, Y. (2017). Evaluación de la estabilidad y viabilidad de dos cepas probióticas microencapsuladas por lecho fluidizado. *Informacion Tecnologica*, 28(6), 35–44. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000600005>
- Chanta Agurto Joselin, & Ruiz Lorenzo Maryuri. (2018). *Potencial de Bacillus s pp. en el control de hongos del género Fusarium causantes de pudrición en raícesde Lycopersicon esculentum Mill.*
- Chavarri, Barroyeta Juan, Ochoa Yessica, Rumbos Nohants, & Alezones Jesus. (2017). Detección de fusarium verticillioides y fujimonisinas en granos de

maíz blanco proveniente de los estados de Yaracuy y Guarico Venezuela. *Nova Scientia*, 19, 173–184.

Chávez-Díaz, F. I., Zelaya Molina, L. X., Iván, C., Cárdenas, C., Rojas Anaya, E., Ruíz Ramírez, S., De Los, S., & Villalobos, S. (2020). *Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro-biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México.*

Chiluisa-Utreras, V., Verdesoto, M. C., & Acurio, R. D. (2020). Microbiological and molecular determination by real-time PCR of two bacteria of the genus *Bacillus* of agro biotechnological interest. *Bionatura*, 5(2), 1106–1110. <https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.02.4>

Chura Chuquija, J., & Tejada Soraluz, J. (2014). *Comportamiento de híbridos de maíz amarillo duro en la localidad de La Molina, Perú* (Vol. 32).

Cisneros, C. A., Sánchez, M. P., & Menjivar, J. F. (2016). Influencia de microorganismos solubilizadores de fosforo del suelo y su absorción por plántulas de café. *Bioagro*, 28(2), 95–106.

Contreras, R. B., López, P. S., Reyes, J. P., & Cárdenas, C. D. (2010). Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Journal of Engineering Science*, 16(2), 100–110.

Corrales-Ramírez, L. C., & Caycedo-Lozano, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes. *Nova*, 18(33). <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>

Couoh-Moo, J. A., Castillo-Caamal, J. B., Balam-Cocom, B. A., & Caamal-Maldonado, J. A. (2022). BIOFERTILIZERS FOR MAIZ PRODUCTION IN A

MILPA SYSTEM ON A LUVISOL IN YUCATAN, MÉXICO. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(3). <https://doi.org/10.56369/tsaes.4225>

Cruz Martín, M., Leyva, L., Acosta Suárez, M., Pichardo, T., Bermúdez Carabaloso, I., & Alvarado Capó, Y. (2021). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1. *Agronomía Mesoamericana*, 466–478. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.39720>

de La Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-De La Parra, J. (2014). Fumonisin- Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77–91.

Delgado-Zegarra, J., Alvarez-Risco, A., & Yáñez, J. A. (2018). Indiscriminate use of pesticides and lack of sanitary control in the domestic market in Peru. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 42. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.3>

Díaz-Camezán. (2019). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp de la rizosfera de café con potencial antagonista frente a *Fusarium oxysporum* del valle de Monzón – Huánuco-Perú. *Tesis de Pregrado*, 1, 1–102.

Ding, Q., & Ye, C. (2023). Microbial cell factories based on filamentous bacteria, yeasts, and fungi. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02025-1>

- Duarte, L. Y., Echevarria, H. A., & Martinez, C. B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3), 173–183.
- Fernandez-Orietta, & Larrea-Vega. (2022). *Tecnología de producción de Bacillus thuringiensis*.
- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A., & Tiwari, S. (2016). Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1000–1012. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9598-x>
- González, R. Á. M. (2022). *Aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal con actividad quorum quenching frente a estrés biótico y abiótico* [Universidad de Granada]. <http://hdl.handle.net/10481/73628>
- González-Sandra, I. R., López-Báez, O., Espinosa-Zaragoza, S., & Wong-Villarreal, A. (2016). Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 1879–1891.
- Guerrero-Aguilar, B. Z., Acosta-Gallegos, J. A., Sanchez-Garcia, B. M., Ortega, - Murrieta, Pedro F, & Gonzales-Chavira. (2015). RAZAS PATOGÉNICAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* EN GARBANZO CULTIVADO EN GUANJUATO MEXICO. *Revista Fitotecnica Mexicana* , 38(2), 183–190.
- Guerrero Padilla, A. M. (2018). Manejo de plaguicidas en cultivos de *Zea mays* L. (Poaceae), *Brassica cretica* Lam. (Brassicaceae), *Apium graveolens* L., *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae), *Allium fistulosum* L. (Amaryllidaceae) en

la campaña de Moche, Trujillo, Perú. *Arnaldoa*, 25(1), 159–178.
<https://doi.org/10.22497/arnaldoa.251.25110>

Gutierrez-Jimenez, J., Luna-Cazares, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Diaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutierrez, J. C., & Feliciano-Guzman, J. M. (2015). Organizacion, mantenimiento y preservacion de la coleccion de cultivos bacterianos del instituto de ciencias biologicas de la Universidad de Ciencias y artes de Chiapas (UNICACH), Mexico. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiologia*, 35(1), 95–102.

Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P., & Samiyappan, R. (2009). Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. *Biological Control*, 51(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.06.002>

Hernández-Delgado, S., Reyes-López, M. Á., García-Olivares, G., & Mayek-Pérez, N. (2007). *Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (Zea mays L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México.*

Hernández Juárez, A., Uribe, L. A. A., Flores Dávila, M., Cerna Chávez, E., Flores, J. L., Ochoa Fuentes, Y. M., Treviño, G. A. F., & Juárez, A. H. (2016). Incidencia y severidad de pudrición de mazorcas de maíz genéticamente modificado y convencional en Sinaloa, México. In *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (Vol. 7).

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y

ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 35(1), 98–112.

Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Acebo-Guerrero, Y., Velazquez-del Valle, M. G., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2008). Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology*, 39(2), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.008>

Iglesias, S., Alegre, J., Salas, C., & Egüez, J. (2018). Corn yield (*Zea mays* L.) improves with the use of eucalyptus biochar. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 25–32. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.03>

Illa, C., Pérez, A. A., Torassa, M., & Pérez, M. A. (2019). Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1910-6>

Layton . C.; Maldonado. E.; Monroy. L.; Constanza. L.; & Consuelo. L.; (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA- Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 9, 177–187.

Lazaro Evaristo, L., Vega Cordova, E., & Lizbarde cordova, J. (2020). ADAPTACIÓN Y EFICIENCIA AGRONÓMICA EN EL MAÍZ AMARILLO DURO (ZEA MAYS L.) EN DIFERENTES LOCALIDADES DE LA COSTA CENTRAL Y NORTE DEL PERÚ. *Revista Boletín Redipe*, 9, 260–271.

- Leite, R. M. C., Jardim, A. M. R. F. J., Araújo Júnior, G. N., Alves, C. P., Silva, G. I. N., Rocha, A. K. P., Souza, L. S. B., & Silva, T. G. (2022). *Uso biofertilizantes para intensificação sustentável da produção de palma forrageira irrigada e uso indicadores agrometeorológicos para avaliação*. <https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbgfe>
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>
- Liu, Y., Yang, Y., & Wang, B. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>
- López-Morales, F., Chura-Chuquija, J., & García-Pando, G. (2019). *Interacción genotipo por ambiente del rendimiento de maíz amarillo en híbridos trilineales, Perú*.
- López, S. B. D. (2011). *EFEECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum Lycopersicum* var. Sofía) BAJO INVERNADERO*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Madriz Ordeñanan Kenneth. (2002). *Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno*.

- Marquez, T. F. J. (2007). *Aislamiento y taxonomía de bacterias del genero Bacillus recolectadas en suelos de un bosque de Pinus Radiata y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo*. Universidad Austral de Chile.
- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Enrique-Manzanilla, E. (2020). Fusarium wilt by tropical race 4: Current status and presence in the American continent. *Agronomia Mesoamericana*, 31(1), 259–276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Maulidia, V., Sriwati, R., Soesanto, L., Syamsuddin, Hamaguchi, T., & Hasegawa, K. (2021). Endophytic bacteria isolated from higher plant in Aceh, Indonesia, and their chemical compounds activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00379-5>
- Maurya, A., Sharma, D., Partap, M., Kumar, R., & Bhargava, B. (2023). Microbially-assisted phytoremediation toward air pollutants: Current trends and future directions. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 31). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103140>
- Mejía-Bautista, M. A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., & Reyes-Ramírez, A. (n.d.). *In vitro* ACTIVITY OF *Bacillus* spp. ON MYCELIAL GROWTH INHIBITION OF *Fusarium equiseti* AND *Fusarium solani* ISOLATED FROM HABANERO PEPPERS (*Capsicum chinense* Jacq.). www.macrogenusa.com
- Méndez-Úbeda, J. M., Flores Hernández, M. S., & Páramo-Aguilera, L. A. (2018a). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *BACILLUS subtilis* Y

EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96–110. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>

Méndez-Úbeda, J. M., Flores Hernández, M. S., & Páramo-Aguilera, L. A. (2018b). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACILLUS subtilis Y EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96–110. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>

Miguel-Ferrer, L., Romero-Arenas, O., Andrade-Hoyos, P., Sánchez-Morales, P., Rivera-Tapia, J. A., & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2101-5>

Mondino, P., & Vero, S. (2006). *CONTROL BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE PLANTAS* (G. Uriarte, Ed.; Vol. 1).

Morales A., R. A., Zorogastúa C., P., De Mendiburu, F., & Quiroz, R. (2018). Producción mecanizada de maíz, camote y yuca en la Costa Desértica Peruana: Estimación de la huella de carbono y propuestas de mitigación. *Ecología Aplicada*, 17(1), 13. <https://doi.org/10.21704/rea.v17i1.1169>

Moreno, R. A., García, M. V., Reyes, C. J. L., Vásquez, A. J., & Cano, R. P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de*

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>

- Nisa, R. T., Bhat, K. A., Basu, U., Rashid, R., Wang, X., Jan, S. K., Viswanath, H. S., Soufan, W., Mushtaq, M., Rahman, M. H. U., Bhat, F. A., & Sabagh, A. E. L. (2021). Identification and characterization of triple action bioagents (TAB) and their potency against fusarium wilt of lentil. *Horticulturae*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120587>
- Ortega, I. S. (2014). Maíz I (*Zea mays*). *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 7(2), 151–171.
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mechanisms of action of bacillus spp. (bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. In *Acta Biologica Colombiana* (Vol. 25, Issue 1, pp. 112–125). Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>
- Perez-Luna, Y. del C., & Alvarez-Solis, J. D. (2021). Efecto de la aplicación de biofertilizantes sobre el rendimiento de maíz en parcelas con y sin cobertura vegetal. *IDESIA*, 39(4), 29–38.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Perez-Reytor, D. C., & Sosa, E. A. E. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *VacciMonitor*, 19(2), 11–18.

- Portela-Dussán, D. D., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, 11(20).
- Ramos, G. F. (2014). *Cultivo Bacillus subtilis cepa 105 en biorreactor y su actividad antagonista contra Sclerotinia sclerotiorum*.
- Realpe, M. E., Arturo Hernández, C., & Agudelo, C. I. (2022). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Imágenes En Biomedicina*, 106–110. www.ins.gov.co
- Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. D. C., & Guzmán-Ortiz, J. M. (2018). Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1808-1>
- Rodríguez, B. E., María Rodríguez, M., & Sánchez, L. C. (2020). *Agroquímicos y riesgo para la salud y ambiente: problemática en la vereda El Valle, municipio de Junín, Cundinamarca*.
- Rodriguez- Castro, Torres- Herrera, Domínguez-Calleros, Romero-Garcia, & Silva-Flores. (2020). Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. *Abanico Agroforestal*, 2, 1–13. <https://doi.org/10.37114/abaagrof/2020.7>
- Rodríguez-Hernández, M. G., Gallegos-Robles, M. Á., Rodríguez-Sifuentes, L., Fortis-Hernández, M., Guadalupe Luna-Ortega, J., & González-Salas, U.

- (2020). Native *Bacillus* spp. Strains as sustainable alternative in the yield of corn forage. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 323–331. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.690>
- Rojas, B. M. M., Sánchez, C. D., Rosales, P. K., & Lugo, M. D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Rev. Protección Veg*, 32(2), 2224–4697.
- Rosas-García, N. M. (2009). Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. In *Recent Patents on Biotechnology* (Vol. 3). http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_
- Salazar, G. C., Lagos, M. L. E., Díaz, R. V., Mora, C. S., & Betancourth, G. C. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1). <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>
- Salcedo., C. F. C. (2017). *Evaluación de medios líquidos para la multiplicación de la bacteria Bacillus subtilis*. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>
- Sambo, F., Finotello, F., Lavezzo, E., Baruzzo, G., Masi, G., Peta, E., Falda, M., Toppo, S., Barzon, L., & Di Camillo, B. (2018). Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. *BMC Bioinformatics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2360-6>
- Santomartino, R., Aversch, N. J. H., Bhuiyan, M., Cockell, C. S., Colangelo, J., Gumulya, Y., Lehner, B., Lopez-Ayala, I., McMahon, S., Mohanty, A., Santa Maria, S. R., Urbaniak, C., Volger, R., Yang, J., & Zea, L. (2023). Toward sustainable space exploration: a roadmap for harnessing the power of

microorganisms. *Nature Communications*, 14(1), 1391.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37070-2>

Santos, A., Grijalba, E., Zuluaga, M. V., Gomez, M., & Villamizar, L. (2013). *Compatibilidad in vitro de un bioplaguicida a base de Lecanicillium lecanii (Hipocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena*. 132–142.

Schommer, V. A., Vanin, A. P., Nazari, M. T., Ferrari, V., Dettmer, A., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2023). Biochar-immobilized Bacillus spp. for heavy metals bioremediation: A review on immobilization techniques, bioremediation mechanisms and effects on soil. In *Science of the Total Environment* (Vol. 881). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163385>

Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. In *Biotechnology and Biotechnological Equipment* (Vol. 31, Issue 3, pp. 446–459). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>

Silveira-Gramont, M. I., Aldana-Madrid, M. L., Piri-Santana, J., Valenzuela-Quintanar, A. I., Jasa-Silveira, G., & Rodríguez-Olibarria, G. (2018a). Plaguicidas agrícolas: Un marco de referencia para evaluar riesgos a la salud en comunidades rurales en el estado de sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 7–21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.01>

Silveira-Gramont, M. I., Aldana-Madrid, M. L., Piri-Santana, J., Valenzuela-Quintanar, A. I., Jasa-Silveira, G., & Rodríguez-Olibarria, G. (2018b).

Plaguicidas agrícolas: Un marco de referencia para evaluar riesgos a la salud en comunidades rurales en el estado de Sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 7–21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.01>

Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M., & García, A. F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1247–1256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>

Suaste-Franco, M. del P., Iturriaga-de la Fuente, G., Solís-Moya, E., Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimente, J. G., & Mariscal-Amaro, L. A. (2020). Resistencia a *Fusarium* causante de pudriciones en trigo-actualidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 100–114.

Syed-Nabi, R. Begum, Shahzad, R., Tayade, R., Shahid, M., Hussain, A., Ali, M. W., & Yun, B. W. (2021). Evaluation potential of PGPR to protect tomato against *Fusarium* wilt and promote plant growth. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11194>

Tapia, C., & Amaro, J. (2011). The *Fusarium*. In *Microhongos filamentosos comunes I* (Vol. 1, Issue 1). www.sochinf.cl

Trejo-Escareño, H., Salazar-Sosa, E., Dimas López-Martínez, J., & Vázquez-Vázquez, C. (2013). Impacto del estiércol bovino en el suelo y producción de forraje de maíz. In *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (Vol. 4).

Uysal, A., & Kantar, F. (2020). Effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* culture on the growth and yield of off-season potato

(*Solanum tuberosum* L.). *Acta Agronomica*, 69(1), 26–31.
<https://doi.org/10.15446/acag.v69n1.73832>

Valderrama, F. A. M., Arango, I. R., & Afanador, K. L. (2015). TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS MEDIADA POR *Agrobacterium*: “INGENIERÍA GENÉTICA NATURAL APLICADA.” *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2569–2585.

Vélez, P. R. J., & Zambrano, Z. F. J. (2012). *Capacidad antagónica de Trichoderma spp. , a nivel in vitro frente a los hongos fitopatógenos Crinipellis pernicioso y Monilliothora roleri.*

Vieira, R. F., Ferracini, V. L., da Silveira, A. P. D., & Pazianotto, R. A. A. (2021). Improvement of growth of common bean in phosphorus-deficient soils by phosphate-solubilizing and phytohormone-producing bacteria. *Agronomia Colombiana*, 39(3), 372–380.
<https://doi.org/10.15446/AGRON.COLOMB.V39N3.95461>

Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., Perdomo-Quispe, C. E., Pincay-Verdezoto, A. K., Báez-Cevallos, F. J., Vásquez-Castillo, W. A., & Trevor, J. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149.

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la

bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Villarreal, D. M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2–5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80860>

Welch, E. J., Naikawadi, R. P., Li, Z., Lin, P., Ishii, S., Shimizu, T., Tirupathi, C., Du, X., Subbaiah, P. V., & Ye, R. D. (2009). Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet-activating factor on neutrophil and platelet activation. *Molecular Pharmacology*, 75(1), 227–234. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051003>

Yang, F., Zhang, R., Wu, X., Xu, T., Ahmad, S., Zhang, X., Zhao, J., & Liu, Y. (2020). An endophytic strain of the genus *Bacillus* isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L.) has antagonistic activity against maize pathogenic strains. *Microbial Pathogenesis*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104074>

Zulueta-Rodríguez, R., Gómez-Merino, F. C., Alemán-Chávez, I., del Carmen Núñez-Camargo, M., & Lara-Capistrán, L. (2020). Maize yield response to bio-inoculation and chemical fertilization reduction under field conditions.

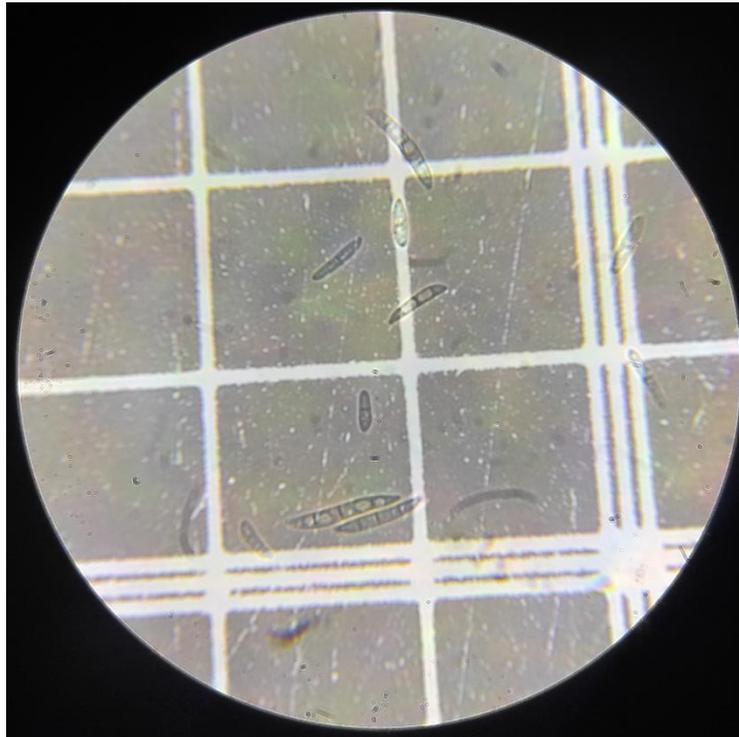
Terra Latinoamericana, 38(3), 597–612.
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.656>

1.1. Fuentes hemerográficas

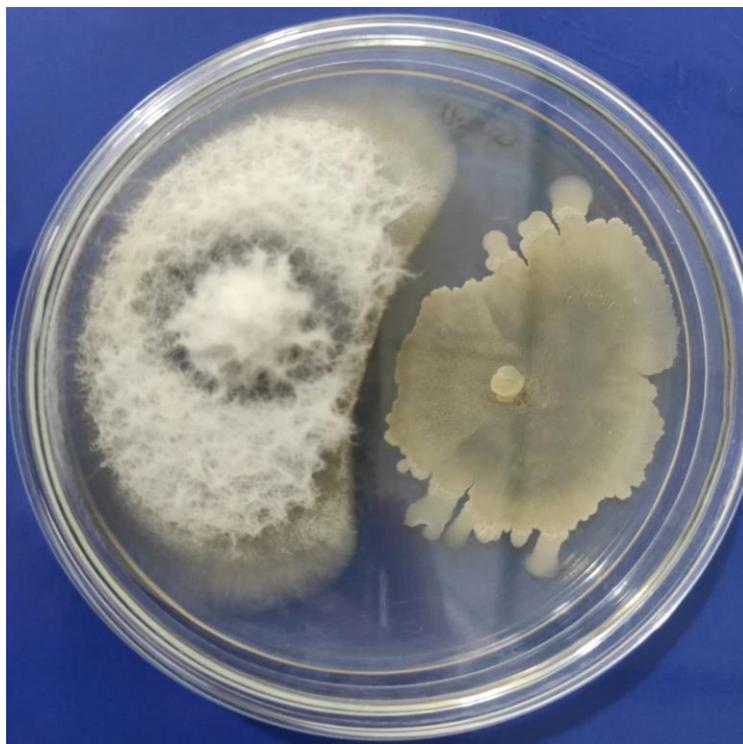
1.2. Fuentes documentales

1.3. Fuentes electrónica

ANEXOS



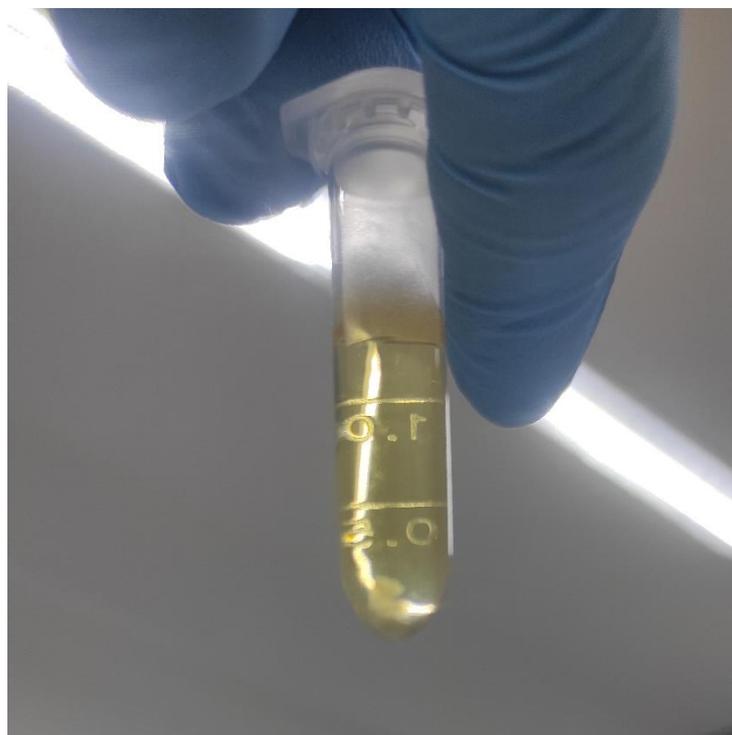
Anexo 1: Vista microscópica a 60X de las esporas de *Fusarium* sp.



Anexo 2: Cultivos duales mediante discos (5 mm) de *Bacillus* sp frente *Fusarium* sp.



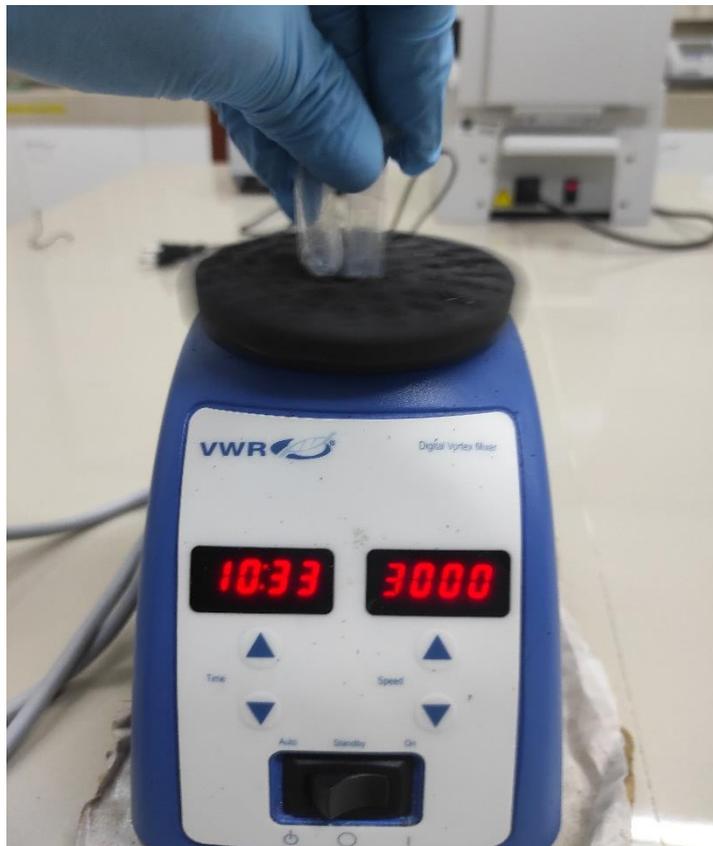
Anexo 3: Centrifugación del inoculo bacterianos para los test de solubilización.



Anexo 4: Concentración de los pelets para los test de solubilización



Anexo 5: Recuperación del micelio fúngico de *Fusarium* sp. para inoculación.



Anexo 6: Homogenización de los inóculos microbianos.



Anexo 7: Extracción de DNA genómico de la cepa de *Bacillus* sp.



Anexo 8: Lectura de la cuantificación de DNA genómico en el biospectrofotometro.



Anexo 9: Cargado de la amplificación de DNA de la PCR en el gel de agarosa al 1%.



Anexo 10: Incubación de los inóculos fermentativos con la cepa de *Bacillus* sp.



Anexo 11: Esterilización del sustrato empleando en la germinación de semillas.



Anexo 12: Lectura de la masa de las plántulas de maíz amarillo duro



Anexo 13: Plántulas de maíz amarillo duro con síntomas de infección por *Fusarium* sp.



Anexo 14: Conidios de *Fusarium* sp. aislado de tejido vegetal infectado.

FICHA N°1

FICHA DE EVALUACION DE CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE MAIZ (*Zea mays* L.)

Ficha de germinación									
Tiempo (días)	T1		T2		T3		T4		TOTAL
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	
5									
10									
15									
20									
25									
30									
TOTAL									

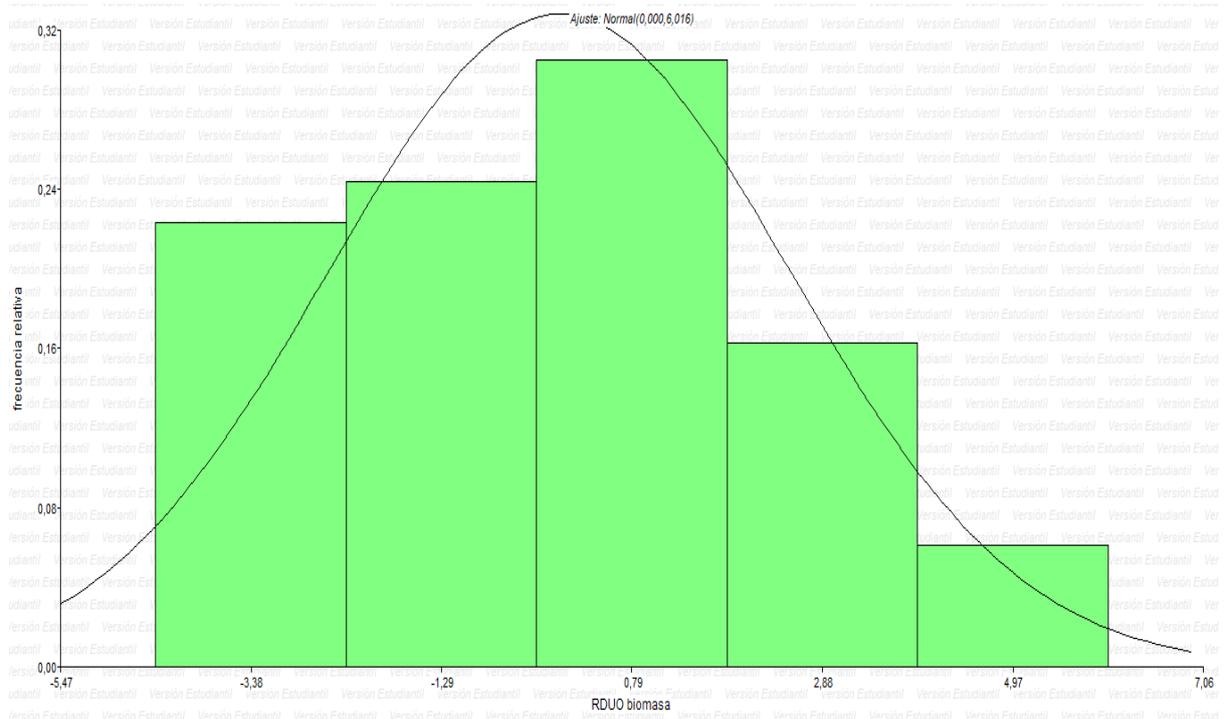
Observación (días)	T1	T2	T3	T4
5				
10				
15				
20				
25				
30				

Anexo 14: Conídios de *Fusarium* sp. aislado de tejido vegetal infectado.

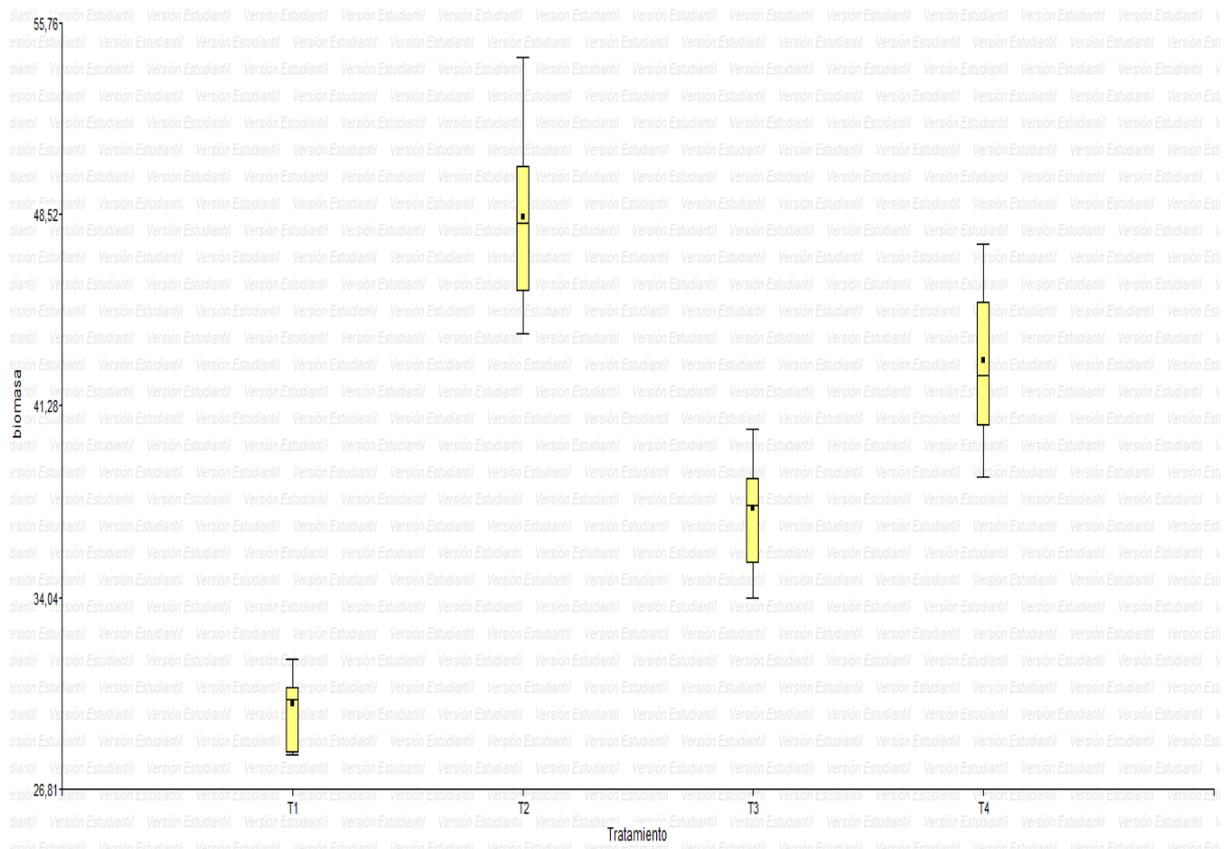
Caso	Tratamiento	Peso envase	Peso envase+muestra	Peso seco 48h	Peso inicial	Peso final	biomasa
5	T1	1,62	2,63	1,94	1,02	0,69	31,72
6	T1	1,66	3,82	2,31	2,16	1,51	30,09
7	T1	1,67	3,77	2,30	2,10	1,47	29,91
8	T1	1,76	4,01	2,44	2,25	1,57	30,25
9	T2	1,79	3,34	2,63	1,55	0,71	54,45
10	T2	1,60	3,41	2,49	1,81	0,91	49,42
11	T2	1,65	3,79	2,62	2,13	1,17	45,08
12	T2	1,63	3,72	2,68	2,10	1,04	50,36
13	T2	1,62	3,89	2,66	2,28	1,24	45,63
14	T2	1,61	3,53	2,52	1,92	1,02	47,22
15	T2	1,66	3,71	2,65	2,05	1,06	48,44
16	T2	1,70	3,86	2,69	2,16	1,17	45,79
17	T2	1,65	3,69	2,70	2,04	0,99	51,40
18	T2	1,646	3,74	2,60	2,09	1,14	45,50
19	T2	1,676	3,51	2,65	1,83	0,85	53,33
20	T2	1,603	3,77	2,56	2,17	1,22	44,01
21	T2	1,594	3,96	2,79	2,37	1,18	50,36
22	T2	1,629	3,78	2,649	2,15	1,13	47,35
23	T2	1,684	3,69	2,649	2,00	1,04	48,18
24	T3	1,683	3,78	2,485	2,10	1,29	38,28
25	T3	1,649	3,90	2,481	2,25	1,42	36,99
26	T3	1,704	3,71	2,482	2,01	1,23	38,80
27	T3	1,611	3,57	2,404	1,96	1,17	40,40
28	T3	1,643	3,83	2,431	2,18	1,40	36,08
29	T3	1,633	3,70	2,431	2,07	1,27	38,55
30	T3	1,669	3,88	2,494	2,21	1,39	37,33
31	T3	1,709	4,05	2,527	2,34	1,52	35,02
32	T3	1,684	3,69	2,391	2,00	1,29	35,33
33	T3	1,609	3,63	2,424	2,02	1,21	40,31
34	T3	1,681	3,62	2,411	1,94	1,21	37,69
35	T3	1,659	3,99	2,451	2,33	1,54	34,01
36	T4	1,678	3,58	2,484	1,90	1,09	42,49
37	T4	1,683	3,67	2,512	1,99	1,16	41,68
38	T4	1,629	3,83	2,517	2,20	1,31	40,36
39	T4	1,614	3,64	2,474	2,03	1,17	42,41
40	T4	1,638	4,17	2,799	2,53	1,37	45,93
41	T4	1,619	3,93	2,715	2,31	1,22	47,41
42	T4	1,612	3,77	2,574	2,16	1,20	44,58
43	T4	1,637	4,08	2,669	2,44	1,41	42,28
44	T4	1,684	3,51	2,404	1,82	1,10	39,54
45	T4	1,683	3,79	2,664	2,10	1,12	46,65
46	T4	1,684	3,93	2,594	2,25	1,34	40,50
47	T4	1,653	3,78	2,592	2,13	1,19	44,17
48	T4	1,667	3,81	2,496	2,15	1,32	38,61
49	T4	1,838	3,70	2,682	1,87	1,02	45,23

Real Registros: 49*7 n=1 Suma = 44,17 Media = 44,167 D.E. = 0,00 Min = 44,1

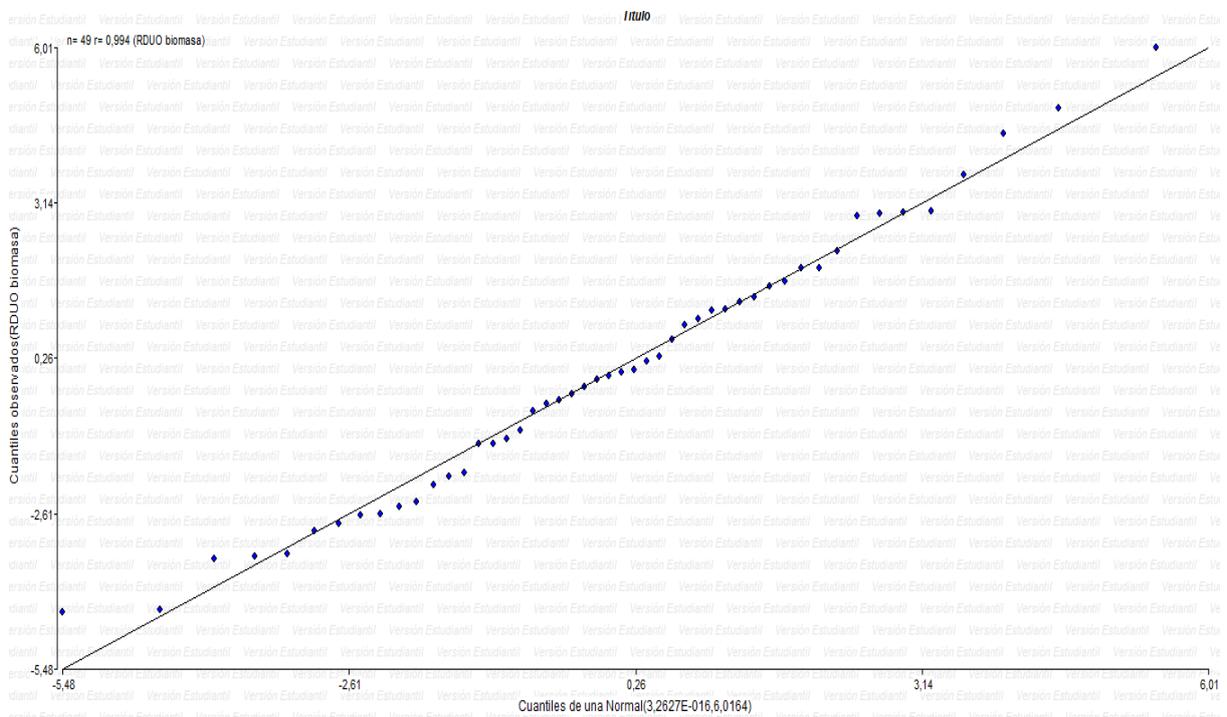
Anexo 15: Pruebas no formales de la normalidad



Anexo 15: Gráfico de histograma de los residuos de porcentaje de biomasa.



Anexo 16: Gráfico de cajá (Box-Plot) de los residuos de porcentaje de biomasa.



Anexo 17: Gráfico de Q-Q plot de los residuos de porcentaje de biomasa.