UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la capacidad antagónica de *Bacillus subtilis AC01* microencapsulado frente a *Cladosporium fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* y *Botrytis cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* hongos fitopatógenos del tomate riñón (*Solanum lycopersicum)*

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Alex Jhoel Caiza Coque

Tutor: Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

Ambato – Ecuador

Agosto – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 01 de julio de 2024

Firmado electrónicamente por:
HELENA MARITZA DE LA TORRE OLVERA

Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

1309651998

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Alex Jhoel Caiza Coque manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Caiza Coque Alex Jhoel

0503866329

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Caiza Coque Alex Jhoel

0503866329

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LILIANA ALEXANDRA CERDA MEJIA

.....

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
DANAE FERNANDEZ RIVERO

.....

Mg. Danae Fernández Rivero

C.I. 1757181209

Firmado electrónicamente por:
WILLIAM RICARDO CALERO CACERES

.....

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714348859

Ambato, 02 de agosto de 2024

DEDICATORIA

A las personas más importantes en mi vida.

A las personas que son mi ejemplo a seguir.

A las personas que siempre confiaron en mí.

A las personas que siempre me dieron palabras de aliento para seguir adelante.

A las personas que siempre se esforzaron por hacer que no me falte nada.

A las personas que siempre han estado para mí a pesar de mis errores.

A las personas que nunca se cansaron de esperar ver a su hijo triunfar.

A esas dos personas que ven con mucho orgullo que sea su hijo.

Esto es para ustedes.

Mami, Papi… lo logramos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi madre, Nanci Coque, que siempre ha estado al pendiente de mí y me ha brindado su amor incondicional con el que he logrado atravesar cualquier adversidad.

Agradezco a mi padre, Hernan Caiza, que siempre ha luchado y se ha esforzado para que no me falte nada en mi vida personal y en mi camino académico.

A mi tu tutora, Bla. Helena de la Torre, PhD. por acogerme cuando estaba en la deriva, gracias por la paciencia y por la comprensión que ha tenido conmigo.

Agradezco al doctor Michel Leiva Mora docente e investigador DIDE de la facultad de Ciencias Agropecuarias por compartirnos la cepa CC-FCAGP-Cf-Epi10 perteneciente al cepario de Cladosporium fulvum creado con el proyecto de investigación "Colección de aislados monospóricos de Cladosporium fulvum Cooke que afectan a Solanum lycopersicum L. y detección de genes de avirulencia presentes en la provincia de Tungurahua"aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0296-R.

A la Facultad de Ciencias e Ingeniera en Alimentos y Biotecnología y a todos sus docentes que han aportado a mi conocimiento.

A mi persona especial, Sele, por acompañarme en todo este viaje de mi formación profesional. Gracias por estar a mi lado todo este tiempo, por apoyarme y no dejarme decaer cuando he tenido momentos malos. I ♡ U

A los Ings. Gavilanes. Al Ing. Jona gracias por explicarme con punto y coma que hacer xd. A la Ing Vivi gracias por prestarme sus materiales fungibles en chiquis y supervisarme a ratos.

A mis amigos Ing. Grace Bejarano y Ing. Juan Chiriboga, gracias por brindarme ese cariño, apoyo y amistad en todos estos años de recorrido universitario.

A todas esas personas que formaron parte de esta travesía, gracias por cada experiencia vivida a su lado.

Con gratitud y cariño… Alex lml

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS viii
ÍNDICE DE TABLAS xi
ÍNDICE DE FIGURAS xii
ÍNDICE DE ANEXOS xiii
RESUMEN EJECUTIVO xiv
ABSTRACT xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes investigativos 1
1.1.1. Justificación 1
1.1.2. Tomate de riñón *(Solanum lycopersicum)* 2
1.1.3. Importancia del tomate riñón 2
1.1.4. Enfermedades fúngicas del tomate riñón 3
1.1.4.1. Generalidades del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* 3
1.1.4.2. Generalidades del hongo fitopatógeno *Cladosporium fulvum* 4
1.1.4.3. Control de enfermedades fúngicas 5
1.1.4.3.1. Métodos químicos 5
1.1.4.3.2. Métodos biológicos 5
1.1.5. *Bacillus subtilis* 6
1.1.5.1. Características generales 6
1.1.5.2. Mecanismos de acción antagónica 7
1.1.6. Microencapsulación 7
1.1.6.1. Técnicas de microencapsulación 8
1.1.6.2. Microencapsulación de microorganismos 8
1.1.6.3. Beneficios de la microencapsulación de microorganismos 9
1.1.7. Evaluación antifúngica *in vitro* 9
1.1.7.1. Evaluación de la capacidad antagónica 9
1.1.7.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) 9
1.1.7.1.2. Concentración fungicida mínima (CFM) 10
1.2. Objetivos 10

1.2.1. Objetivo General....10
1.2.2. Objetivos Específicos....10
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA....11
2.1. Materiales....11
2.2. Métodos....13
2.2.1. Obtención de microencapsulados de *B. subtilis* AC01 mediante secado por aspersión 13
2.2.1.1. Adquisición de cepas....13
2.2.1.2. Activación de cepas....14
2.2.1.3. Multiplicación y preparación del inóculo....14
2.2.1.4. Microencapsulación....14
2.2.2. Determinación de la eficiencia de microencapsulación de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* obtenidos....15
2.2.2.1. Eficiencia de microencapsulación....15
2.2.2.2. Determinación de la humedad del microencapsulado....15
2.2.2.3. Espectroscopía Infrarroja de la transformada de Fourier....15
2.2.3. Evaluación de la capacidad antagónica de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* frente a *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001 y C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* en pruebas *in vitro* 16
2.2.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los microencapsulados de *B. subtilis AC01*....16
2.2.3.2. Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) de los microencapsulados de *B. subtilis AC01*....16
2.2.3.3. Ensayo de antagonismo en placa....17
2.2.3.4. Diseño experimental....18
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN....20
3.1. Análisis y discusión de los resultados....20
3.1.1. Obtención de microencapsulados de *B. subtilis AC01* mediante secado por aspersión 20
3.1.1.1. Identificación molecular *B. subtilis AC01*....20
3.1.1.2. Producción de inóculo bacteriano de *B. subtilis AC01*....21
3.1.1.3. Microencapsulación de células de *B. subtilis AC01*....21
3.1.2. Determinación de la eficiencia de microencapsulación de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* obtenidos....22
3.1.2.1. Eficiencia de la microencapsulación (ME)....22
3.1.2.2. Determinación de la humedad del microencapsulado....23
3.1.2.3. Espectroscopía Infrarroja de la Transformada de Fourier....23

3.1.3. Evaluación de la capacidad antagónica de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* frente a *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* en pruebas *in vitro* 26
3.1.3.1. Determinación de actividad antifúngica 26
3.1.3.2. Ensayo de antagonismo en placa 28
3.1.3.2.1. Medición de los halos de inhibición 28
3.1.3.3. Diseño experimental 32
3.1.3.4. Verificación de hipótesis 38
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 39
Conclusiones 39
Recomendaciones 40
MATERIAL DE REFERENCIA 41
ANEXOS 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del tomate riñón....2
Tabla 2. Taxonomía de *B. cinerea*....3
Tabla 3. Taxonomía de *C. fulvum* 4
Tabla 4. Taxonomía de *B. subtilis*....6
Tabla 5. Material fungible utilizado en el desarrollo del proyecto 11
Tabla 6. Equipos empleados para el desarrollo del proyecto....12
Tabla 7. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto....12
Tabla 8. Escala de sensibilidad según Durrafourd....17
Tabla 9. Tratamientos para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*....17
Tabla 10. Tratamientos para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10)* 18
Tabla 11. Composición del microencapsulado de *B. subtilis AC01*....22
Tabla 12. Eficiencia de microencapsulación de *B. subtilis AC01*....23
Tabla 13. Halos de inhibición para los tratamientos empleados con *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01.* 28
Tabla 14. Halos de inhibición para los tratamientos empleados con *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01.* 30
Tabla 15. Medias marginales para cada hongo fitopatógeno estudiado 32
Tabla 16. Medias marginales para la concentracion de *B. subtilis AC01* microencapsulado 33
Tabla 17. Prueba de Efectos Inter-Sujetos....36
Tabla 18. Prueba de comparaciones múltiples....37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultado de la secuenciación de *B. subtilis AC01* 20
Figura 2. Espectros obtenidos en la microencapsulación de *B. subtilis AC01* 24
Figura 3. Espectros superpuestos.....25
Figura 4. Prueba de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*.....26
Figura 5. Siembra en placa del pocillo con una concentración de microencapsulado de *B. subtilis AC01* de 50 mg/mL.....27
Figura 6. Prueba de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* 27
Figura 7. Resultado de actividad antifúngica de *B. subtilis AC01* microencapsulado, con una concentración de 200 mg/mL frente a *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* 29
Figura 8. Resultado de actividad antifúngica de *B. subtilis AC01* microencapsulado a 200 mg/mL frente a *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* 31
Figura 9. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición según cada hongo fitopatógeno 33
Figura 10. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición según cada concentración de *B. subtilis AC01* microencapsulado 34
Figura 11. Medias marginales de los hongos fitopatógenos de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con las diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* con la media de los halos de inhibición para cada tratamiento.....35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Activación de cepas 53
Anexo 2. Preparación de inóculo de *B. subtilis AC01* 53
Anexo 3. Centrifugación de células de *B. subtilis AC01* 53
Anexo 4. Resuspención de células de *B. subtilis AC01* en solución salina 54
Anexo 5. Proceso de microencapsulación por secado por aspersión 54
Anexo 6. Lavado de células de hongos fitopatógenos 55
Anexo 7. Conteo de células en hemocitómetro 55
Anexo 8. Células de hongos fitopatógenos resuspendidas en solución salina 55
Anexo 9. Preparación de soluciones soluciones de microencapsulado a diferentes concentraciones...56
Anexo 10. Prepararación de control positivo con el producto comercial Amistar Top 56
Anexo 11. Herramienta BLAST Online- secuencias significativas de *B. subtilis* 56
Anexo 12. Rendimiento de las microcápsulas después del secado por aspersión 56
Anexo 13. Eficiencia de microencapsulación 57
Anexo 14. Porcentaje de humedad del microencapsulado 57
Anexo 15. Medición del diámetro de inhibición para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* y sus respectivos controles 58
Anexo 16. Tratamientos para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* 59
Anexo 17. Medición del diámetro de inhibición para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* y sus respectivos controles 59
Anexo 18. Tratamientos para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* 61

RESUMEN EJECUTIVO

El tomate riñón es una hortaliza de gran valor nutricional y comercial en Ecuador, pero su cultivo se ve afectado por hongos fitopatógenos como *B. cinerea* y *C. fulvum*, que causan enfermedades reduciendo la producción y calidad del producto, afectando negativamente la economía de los agricultores. Un modo de control es la aplicación de productos químicos sintéticos, elevando costos y contaminación ambiental. Para lo cual, el uso de microorganismos biocontroladores surge como una alternativa ecológica y sustentable. En este estudio se cultivaron células viables de *B. subtilis AC01* y se microencapsularon mediante secado por aspersión, usando maltodextrina y goma arábiga como agentes encapsulantes, obteniendo una eficiencia de 82.5 por ciento y 90.53 por ciento. La técnica de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) confirmó el correcto empaquetamiento de las células. Mediante pruebas *in vitro*, se determinó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 10 mg por cada mL y una Concentración Fungicida Mínima (CFM) de 50 mg por cada mL para el hongo *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*. Estos resultados muestran que *B. subtilis AC01* microencapsulado puede reducir significativamente la incidencia de enfermedades, ofreciendo un control biológico efectivo. En conclusión, *B. subtilis AC01* microencapsulado presenta un gran potencial como una alternativa sostenible para el control de fitopatógenos en el cultivo de tomate riñón, permitiendo reducir la dependencia de productos químicos sintéticos, disminuyendo los costos de producción y el impacto ambiental en Ecuador.

Palabras clave: Tomate riñón, hongos fitopatógenos, *Botrytis cinerea, Cladosporium fulvum,* control biológico, microencapsulación, *Bacillus subtilis.*

ABSTRACT

Kidney tomato is a vegetable of great nutritional and commercial value in Ecuador, but its cultivation is affected by phytopathogenic fungi such as *B. cinerea* and *C. fulvum*, which cause diseases, reducing the production and quality of the product, negatively affecting the economy of farmers. One way of control is the application of synthetic chemicals, raising costs and environmental pollution. For this, the use of biocontrol microorganisms emerges as an ecological and sustainable alternative. In this study, viable cells of *B. subtilis AC01* were cultured and microencapsulated by spray drying, using maltodextrin and gum arabic as encapsulating agents, obtaining an efficiency of 82.5 percent and 90.53 percent. The Fourier Transform Spectroscopy (FTIR) technique confirmed the correct packaging of the cells. Through *in vitro* tests, a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 10 mg per mL and a Minimum Fungicide Concentration (MFC) of 50 mg per mL were determined for the fungus *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*. These results show that microencapsulated *B. subtilis AC01* can significantly reduce the incidence of diseases, offering effective biological control. In conclusion, microencapsulated *B. subtilis AC01* has great potential as a sustainable alternative for the control of phytopathogens in kidney tomato crops, allowing to reduce the dependence on synthetic chemicals, decreasing production costs and the environmental impact in Ecuador.

Keywords: Kidney tomato, phytopathogenic fungi, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium fulvum*. biological control, microencapsulation, *Bacillus subtilis*.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

En el año 2023 el sector agrícola representó el 6,5 % del Producto Interno Bruto (PIB) en comparación con otras industrias nacionales, lo cual generó aproximadamente 2.4 millones de empleos **(Banco Central del Ecuador, 2024).** Sin embargo, el uso indiscriminado de agroquímicos por parte de esta industria representa un riesgo para la salud **(FAO, 2022).** En el año 2022 se aplicaron estos productos al 89,9 % de las 962 mil hectáreas de cultivos transitorios, como el brócoli, papa y tomate riñón. En este último se utilizaron 359 kg de agroquímicos por hectárea **(INEC, 2022a).** Cabe destacar que solo en el año 2022 se han reportado 216 casos de intoxicaciones por agroquímicos en agricultores **(Ministerio de Salud Pública, 2021).** Una alternativa para una agricultura sostenible es la aplicación de bioinsumos **(Villalobos et al., 2023).**

Los biocontroladores forman parte de los bioinsumos y contienen agentes microbianos para el control biológico de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus. Algunos géneros de hongos como *Botrytis* spp. y *Cladosporium* spp. presentan mayor resistencia a agroquímicos convencionales **(Martínez et al., 2016).** Una opción para contrarrestar este tipo de hongos es el uso de antagonistas, de los cuales destacan géneros como *Agrobacterium* spp*., Streptomyces, Serratia, Pseudomonas* y *Bacillus* spp. los cuales actúan como Agentes de Control Biológico o BCA (Biological Control Agent) **(Lee et al., 2023).** De este grupo de BCA se destaca al género *Bacillus* spp., ya que es el más utilizado contra patógenos fúngicos degradando los principales polisacáridos que conforman su pared celular **(Vidal et al., 2021).**

La supervivencia y eficacia de las bacterias beneficiosas para el control de enfermedades se ven afectadas por factores ambientales adversos como humedad, presión osmótica, radiación ultravioleta y temperatura. En este contexto, la encapsulación surge como una tecnología prometedora que permite empaquetar material biológico, protegiéndolo de estos factores y prolongando su viabilidad **(Hernández et al., 2022)**. Buscando alternativas viables para el control biológico, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la capacidad antagónica de un microencapsulado elaborado a partir de *B. subtilis AC01* frente a hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de tomate riñón *(S. lycopersicum).* Con la finalidad de disminuir el uso de agroquímicos y promover prácticas agrícolas sostenibles.

1.1.2. Tomate de riñón *(Solanum lycopersicum)*

El tomate riñón (*S. lycopersicum)* es una planta que pertenece a la familia de las solanáceas. Es nativa de los Andes, particularmente de Bolivia, Chile, Ecuador y Perú, en donde se puede encontrar variabilidad genética **(Camamal et al., 2018).** El tomate, aunque comúnmente se la considera una hortaliza anual, es en realidad una planta perenne con características arbustivas. Su crecimiento puede ser rastrero o semierecto, dependiendo de la variedad. Su fruto es una baya de color rojizo que se cultiva en ciclos anuales y presenta cierta sensibilidad al frío **(Délices et al., 2019).**

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del tomate riñón

	Taxonomía
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Especie	*Solanum lycopersicum*

Fuente: **(Hazael, 2017).**

1.1.3. Importancia del tomate riñón

El tomate riñón se posiciona como una de las hortalizas más importantes en Ecuador, tanto por alto consumo como por su significativo valor económico **(Dong et al., 2023).** Su demanda ha impulsado un aumento en la producción de la zona centro del país, lo que se traduce en mejores ingresos para las familias dedicadas a su cultivo. Dado el alto consumo, con un promedio de 5 kg por ecuatoriano al año **(Agro Bayer, 2021)**, el tomate riñón presenta un rubro de gran rentabilidad. Además, es una fuente importante de vitaminas B, C y E, así como minerales como el potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P) y zinc (Zn) **(Dong et al., 2023).**

En el año 2022 se reportó que a nivel nacional se cultivaron 2 mil hectáreas de tomate riñón, del cual el 80 % se produjo en la Región Sierra **(INEC, 2022a).** Esto contribuye constantemente a la rentabilidad de las provincias de Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua, ya que aportan un 70 % de esta hortaliza al mercado nacional **(INEC, 2022b).**

1.1.4. Enfermedades fúngicas del tomate riñón

El cultivo de tomate se ve afectado por varios tipos de patógenos, principalmente bacterias y hongos de los géneros *Alternaria*, *Botrytis, Cladosporium* y *Fusarium*. Esto perjudica tanto a la cantidad como a la calidad del producto **(Gayosso et al., 2021).** Para lo cual se han empleado una amplia gama de agroquímicos, mismos que han permitido prevenir pérdidas de rendimiento.

La **FAO (2022)** indica que el uso excesivo de estos químicos representa un peligro para la salud, tanto del agricultor como del consumidor. Además, provoca la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, la degradación del suelo y permite la aparición de resistencia a patógenos **(Rodríguez et al., 2020)**. En este sentido la preocupación pública se ha acrecentado en cuanto al uso de agroquímicos, por lo que el control biológico es una de las alternativas para reemplazar el uso de estos productos **(Karačić et al., 2024).**

1.1.4.1. Generalidades del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

B. cinerea, conocido comúnmente como podredumbre gris, es un hongo patógeno necrófito que ocasiona importantes pérdidas en una amplia gama de cultivos agrícolas. Este hongo ataca los tejidos de flores, frutos y hojas, incluso en etapas tempranas del desarrollo vegetal, lo cual lo convierte en una amenaza significativa para la producción agrícola **(Mercier et al., 2010)**. Además, se caracteriza por su gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, permitiéndole infectar a alrededor de 200 especies de plantas. Esta amplia gama de huéspedes incluye cultivos de importancia como moras tomates, fresas, pimientos, entre otras **(Luo et al., 2024).**

Este tipo de hongo se propaga principalmente a través de conidios, estructuras asexuales que son transportadas por el aire, agua o insectos. Estos conidios se adhieren a los tejidos vegetales frescos o a heridas en las plantas, donde germinan y colonizan el tejido sano, causando la pudrición característica de la enfermedad, que en casos pueden provocar la muerte del hospedero **(Montiel & Vásquez, 2021).**

Tabla 2.

Taxonomía de *B. cinerea*

Taxonomía	
Dominio	Eucariota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales

Taxonomía	
Familia	Sclerotiniaceae
Género	Botrytis
Especie	*Botrytis cinerea*

Fuente: **(Vázquez, 2020).**

1.1.4.2. Generalidades del hongo fitopatógeno *Cladosporium fulvum*

C. fulvum, es un hongo fitopatógeno responsable de la enfermedad del moho de la hoja del tomate. Esta enfermedad puede atacar en cualquier fase del cultivo, afectando principalmente plántulas, frutos, hojas y tallos. Su ataque se da preferencialmente en condiciones de alta humedad y temperatura **(Jiang et al., 2022).** Los síntomas de la infección por *C. fulvum* se manifiestan inicialmente en las hojas más viejas, progresando hacia la parte superior de la planta. Las hojas infectadas presentan manchas de coloración oscura o grisácea, lo que caracteriza a esta enfermedad **(Wang et al., 2018).** En casos severos puede provocar la necrosis de la planta, ya que produce conidios en el envés de las hojas y estos tienen la capacidad de sobrevivir como saprófito **(De Wit, 2016).**

Tabla 3.

Taxonomía de *C. fulvum*

Taxonomía	
Dominio	Eucariota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Capnodiales
Familia	Davidiellaceae
Género	Cladosporium
Especie	*Cladosporium fulvum*

Fuente: **(Borman et al., 2008)**

1.1.4.3. Control de enfermedades fúngicas

Las enfermedades de origen fúngico representan una amenaza significativa para la agricultura, ya que ocasionan una considerable reducción en el rendimiento y la calidad de los productos. El diagnóstico temprano es crucial para impedir la proliferación de los patógenos y evitar la pérdida total del cultivo **(Quintero et al., 2019).**

Tradicionalmente, el control de estas enfermedades se ha basado en el uso de fungicidas sintéticos. Si bien estos productos presentan cierto nivel de eficacia, su uso conlleva efectos negativos para la salud humana y el medio ambiente. Además, la aplicación continua de fungicidas ha generado el desarrollo de patógenos resistentes a los mismos, lo que limita su efectividad **(Rodríguez et al., 2021).** En este contexto, surge la necesidad de buscar alternativas de control más sostenibles y amigables con el medio ambiente. En los últimos años, se ha intensificado la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para el control biológico de las enfermedades fúngicas **(Martínez et al., 2017).**

1.1.4.3.1. Métodos químicos

Las enfermedades fúngicas representan un obstáculo importante para los productores agrícolas, ocasionando pérdidas significativas en los cultivos **(Martínez & Pérez, 2015)**. Para combatir estas enfermedades, los agricultores recurren con frecuencia al uso de productos químicos sintéticos. Si bien estos formulados ayudan a proteger los cultivos y evitar la pérdida total de la producción, su uso provoca graves consecuencias **(Cabrera et al., 2019).** La contaminación del suelo y el agua son dos de los principales problemas asociados al uso de fungicidas químicos. Estos productos pueden persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo, afectando la calidad del agua y dañando la salud de los organismos del suelo **(Alburqueque & Gusqui, 2018).**

1.1.4.3.2. Métodos biológicos

El control de las enfermedades del tomate riñón se consigue mediante el uso de formulados a base de ingredientes activos; los más empleados son azoxistrobin, carbendazim y clorotalonil **(Alburqueque & Gusqui, 2018)**. Sin embargo, las soluciones biológicas ofrecen una alternativa ventajosa para el control de patógenos en especies vegetales, minimizando el impacto ambiental y protegiendo la salud del agricultor **(Troussieux et al., 2023)**. Además, uso representa una reducción en los costos de producción, ya que contribuyen a un mayor rendimiento sin requerir el uso excesivo de productos agroquímicos **(Andrade et al., 2023).**

Las bacterias como *Pseudomonas, Bacillus, Azotobacter, Micrococcus,* entre otras han demostrado antagonismo en contra de hongos fitopatógenos de algunas especies de plantas **(Cochard et al., 2022)**. De este conjunto de bacterias las especies del género *Bacillus* son las más estudiadas e implementadas en el control biológico, ya que representan una fuerte actividad antimicrobiana contra algunos patógenos. De igual manera ofrecen un enfoque ecológico y sostenible para el control de enfermedades **(Karačić et al., 2024).**

1.1.5. *Bacillus subtilis*

1.1.5.1. Características generales

B. subtilis, una bacteria Gram positiva habitual de la rizosfera, se caracteriza por su capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas. Esta resistencia se debe a la formación de endosporas, que son estructuras latentes metabólicamente inactivas que protegen a la bacteria de factores desfavorables como altas temperaturas, radiación y sequía. Además, presenta un amplio rango de crecimiento, ya que pueden desarrollarse entre 10 y 48 °C **(Errington & Wu, 2017)**. Este microorganismo ha despertado un gran interés en el ámbito agrícola por su potencial como biocontrolador de enfermedades fúngicas. A partir de ella se han investigado algunos bioproductos agrícolas que ofrecen una alternativa sostenible a los fungicidas químicos tradicionales **(Villarreal et al., 2018).**

B. subtilis pertenece al grupo de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal o PGPR (Plant Groth Promoting Rhizobacteria), un conjunto de microorganismos que benefician a las plantas a través de mecanismos directos e indirectos **(Pellegrini et al., 2024)**. Entre los mecanismos indirectos se encuentra el biocontrol biológico, que consiste en el control de enfermedades mediante la acción de antagonistas naturales. Esta bacteria ejerce su efecto antagónico a través de la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana como son los lipopéptidos, enzimas líticas y sideróforos **(Caulier et al., 2019).**

Tabla 4.

Taxonomía de B. subtilis

Taxonomía	
Dominio	Procariota
Reino	Bacteria
Filo o división	Firmicutes
Clase	Bacilli

Taxonomía	
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	Bacillus
Especie	*Bacillus subtilis*

Fuente: **(González et al., 2022).**

1.1.5.2. Mecanismos de acción antagónica

B. subtilis, compite con los hongos presentes en la planta por nutrientes y espacio, lo que limita el crecimiento y desarrollo de estos. Así mismo, sus diferentes mecanismos de acción como la producción de compuestos antimicrobianos, la síntesis de enzimas líticas, entre otros permiten proteger a las plantas de infecciones fúngicas **(Karačić et al., 2024).** De igual manera los lipopéptidos son moléculas cíclicas de bajo peso molecular y carácter anfifílico producidas por bacterias del género *Bacillus* como metabolitos secundarios **(Bertuzzi et al., 2022).** Estas moléculas poseen actividad antifúngica, actuando sobre los hongos de diversas maneras:

- Inhiben la proliferación de esporas: impiden la germinación y desarrollo de las esporas fúngicas, limitando así la propagación del patógeno.
- Limitan el crecimiento de hifas: afectan la estructura y el crecimiento de las hifas.
- Alteran la formación de tubos germinales: reprimen la formación de tubos germinales, que son estructuras especializadas que permiten a las hifas penetrar en los tejidos del huésped **(Leconte et al., 2022).**

La implementación de *Bacillus* en la producción de hortalizas fomenta el control biológico de enfermedades. Sin embargo, para su éxito la formulación de estos bioproductos debe ser estable, resistente y biocompatible. Una de las tecnologías que permite alcanzar estos estándares es la microencapsulación **(Ma et al., 2015).**

1.1.6. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica que consiste en envolver materiales sólidos, líquidos o gaseosos en diminutas microcápsulas o micropartículas. Estas son de tamaño microscópico y ofrecen protección al material encapsulado frente a diversos factores ambientales adversos, como luz, oxígeno, cambios de humedad, alteraciones del pH y oxidación **(Parra, 2010).** Para crear estas microcápsulas protectoras, se emplea una amplia gama de polímeros, incluyendo gelatina, goma arábiga, alginato de calcio,

caseinato de sodio y maltodextrina, entre otros. La elección del polímero adecuado depende de las características específicas del material que se desea encapsular **(Saberi et al., 2021).**

Al encapsular material biológico la supervivencia de las células dependerá de factores como la concentración de los polímeros, concentración bacteriana, el tipo bacteria y las condiciones operacionales. La pared de las microcápsulas que lo recubre puede estar constituido por una o más sustancias **(Wu et al., 2020).** La encapsulación se la puede realizar por diferentes tecnologías, entre las que se destacan el secado por aspersión, la extrusión y la emulsión, como más eficaces para microencapsular bacterias PGPR **(Burgain et al., 2011)**

1.1.6.1. Técnicas de microencapsulación

- Secado por aspersión: es un método ampliamente utilizado para la conservación de bacterias vivas. Este proceso consiste en disolver las células bacterianas en matrices poliméricas como la goma arábiga, el almidón o la maltodextrina, formando una suspensión líquida. Misma que se atomiza posteriormente en un medio de secado caliente, donde el disolvente se evapora rápidamente dejando atrás partículas secas de bacterias encapsuladas. Es una técnica relativamente económica en comparación con otros métodos de secado. El proceso es relativamente sencillo y no requiere de equipos complejos **(Guerin et al., 2017).**

- Extrusión: es un método en el que células viables se encapsulan en una solución de cloruro de calcio mediante una boquilla de alta presión. Se caracteriza por ser accesible y sencilla, en la que no se afecta la viabilidad de las células bacterianas y conservan su vida útil por un largo período. Las microcápsulas formadas son densas y a la vez de un tamaño considerablemente grande **(Song et al., 2013).**

- Emulsión: es una técnica a gran escala en donde se requiere un agente endurecedor como el Cloruro de calcio, un emulsionante y un tensioactivo. El proceso de emulsión brinda una alta tasa de supervivencia de células. El tamaño de las perlas que produce este método se lo determina agitando y cambiando las proporciones de aceite y agua **(Pour et al., 2019).**

1.1.6.2. Microencapsulación de microorganismos

Una de las principales desventajas para la distribución de los bioproductos es su corta vida útil, además de sus olores penetrantes que generan durante la fabricación. Por lo cual la microencapsulación es uno de los nuevos métodos de formulación de biofungicidas, mismos que son amigables con el ambiente,

mejoren la estabilidad y viabilidad de los agentes de biocontrol **(Sun et al., 2023).** En este caso la microencapsulación de *B. subtilis* requiere de bajos costos de producción y es una alternativa favorable, debido a la facilidad de operación e implementación a gran escala **(Gullifa et al., 2023)**

La selección de un agente encapsulante influye directamente en el proceso de microencapsulación, por lo que el material ideal es la maltodextrina en combinación con la goma arábiga. Esto gracias a su bajo costo, compatibilidad biológica y ecológica **(Ma et al., 2015).** La combinación de estos agentes los convierte en materiales más empleados y eficaces para la microencapsulación de microorganismos **(Esquivel et al., 2015).**

1.1.6.3. Beneficios de la microencapsulación de microorganismos

La microencapsulación permite empaquetar material biológico; en el caso de encapsular microorganismos permite el aislamiento físico y brinda protección a diversos factores del medio ambiente **(Riseh et al., 2021).** Las microcápsulas ofrecen un microentorno interno óptimo que favorece la viabilidad de los microorganismos encapsulados. Esto se logra gracias a las propiedades de los polímeros utilizados para su elaboración, los cuales son biocompatibles y no tóxicos **(J. Hernández et al., 2018).**

1.1.7. Evaluación antifúngica *in vitro*

1.1.7.1. Evaluación de la capacidad antagónica

B. subtilis una bacteria grampositiva común, ha ganado atención por su potencial como agente de control biológico debido a su capacidad antagonista contra patógenos fúngicos. Esta capacidad se basa en diversos mecanismos de acción, entre los que se destaca la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana **(Troussieux et al., 2023).** Las pruebas *in vitro* ofrecen herramientas valiosas para evaluar la capacidad antagonista de *B. subtilis* y sus mecanismos de acción. Entre las técnicas más comunes se encuentran: la concentración mínima inhibitoria y la concentración fungicida mínima **(Yi et al., 2022).**

1.1.7.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI se refiere a la concentración más baja de un agente antimicrobiano que ayuda a la prevención o inhibición del crecimiento de un microorganismo; se expresa en µg/mL. Permite evaluar la resistencia o sensibilidad de un organismo a un antibiótico en estudio **(Marques et al., 2016)** en este caso, un

metabolito producido por *B. subtilis.* Se realiza cultivando el patógeno en un medio de cultivo con diferentes concentraciones del metabolito **(Kebede & Shibeshi, 2022).**

1.1.7.1.2. Concentración fungicida mínima (CFM)

La CFM se emplea en el área fúngica y busca encontrar la concentración más baja de un agente antifúngico para eliminar por completo el 99,9 % de población fúngica; se expresa en µg/mL **(Hiruma et al., 2024).** Es un parámetro para evaluar la eficacia del agente antifúngico en condiciones de laboratorio. Se realiza exponiendo el patógeno a diferentes concentraciones del metabolito durante un tiempo determinado y luego evaluando la viabilidad celular **(Franconi & Lupetti, 2023).**

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la capacidad antagónica de *Bacillus subtilis AC01* microencapsulado frente a *Cladosporium fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* y *Botrytis cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* hongos fitopatógenos del tomate riñón (*Solanum lycopersicum).*

1.2.2. Objetivos Específicos

- Obtener microencapsulados de *B. subtilis AC01* mediante secado por aspersión.
- Determinar la eficiencia de microencapsulación de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* obtenidos.
- Evaluar la capacidad antagónica de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* frente a *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* y *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* en pruebas *in vitro.*

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

En la presente investigación, se emplearon variedad de materiales, equipos y reactivos de los laboratorios de investigación de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, detallados en las Tablas 5, 6 y 7 respectivamente. Estas tablas ofrecen una descripción minuciosa de los componentes empleados, lo que proporciona una visión clara y detallada de los recursos utilizados en el estudio.

Tabla 5.

Material fungible utilizado en el desarrollo del proyecto

Material fungible	Cantidad
Asa de Winogradsky	1
Gradilla	1
Pinzas	1
Matraz Erlenmeyer 250 mL	1
Micropipeta de 10-100 µL	1
Micropipeta de 20-200- µL	1
Micropipetas de 100-1000 µL	1
Microtubos de 1,5 mL	10
Placas de 96 pocillos	6
Probeta de 50 mL	1
Probeta de 100 mL	1
Probeta 250 mL	1
Tubos eppendorf de 15 mL	5
Vaso de precipitación de 100 mL	1
Vaso de precipitación de 100mL	1

Tabla 6.

Equipos empleados para el desarrollo del proyecto

Equipos	Cantidad
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Cámara de flujo laminar	1
Incubadora	1
Espectroscopio (FT-IR /ATR)	1
Microondas	1
Mini Spray Dryer Büchi B-290	1
Refrigerador	1
Shaker	1

Tabla 7.

Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto

Reactivos	Cantidad
Agar Nutritivo	1,55 g
Agua destilada	1 L
Alcohol 70 %	150 mL
Alcohol 90 %	50 mL
Caldo dextrosa Sabouraud (SDB)	3 g
Goma arábiga	1,54 g
Maltodextrina	4,62 g
Medio Luria-Bertani (LB)	7,5 g
Medio Potato Dextrosa Agar (PDA)	39 g

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de microencapsulados de *B. subtilis* AC01 mediante secado por aspersión

2.2.1.1. Adquisición de cepas

- *B. subtilis AC01*

La cepa de *B. subtilis AC01* que se empleó fue adquirida de la empresa Microbiolab, la cual no contaba con una identificación molecular establecida. Por lo que se secuenció utilizando el método Sanger, mismo que parte con la replicación de la cepa en placas de Agar PCA, las cuales se incubaron a 37 °C por 12 h. Finalmente se extrajo su ADN con el Kit de Zymo Research Bioma en colaboración con la empresa BioSequence.

Posteriormente, para la secuenciación en primer lugar se amplificó mediante PCR el gen 16S ARNr para confirmar la presencia de la bacteria, después se secuenció por medio de la técnica Sanger con los cebadores 27F y 1492R. Cabe recalcar, que el proceso de amplificación y secuenciación también fueron realizados con la empresa BioSequence.

Finalmente, las secuencias generadas se alinearon y corrigieron por el software BioEdit y Chromas Lite. Y se observó el parentesco de la cepa de *B. subtilis AC01*, al alinear esta secuencia en la base de datos del National Center for Biotecnology Information (NCBI) empleando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) **(Valenzuela, 2018).**

- *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*

La cepa de *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* fue donada por el Dr. Michel Leiva Mora, PhD. docente investigador de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato del proyecto de investigación "Colección de aislados monospóricos de *Cladosporium fulvum Cokke* que afectan a *Solanum lycopersicum L.* y detección de genes de avirulencia presentes en la provincia de Tungurahua".

- *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*

La cepa de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* fue donada por la Ing. Jennifer Guevara del estudio "Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* microencapsulada frente a *Botrytis cinerea".*

2.2.1.2. Activación de cepas

B. subtilis AC01

La cepa bacteriana de *B. subtilis AC01* fue inoculada en placas de Agar Nutritivo previamente preparadas, mediante la técnica de estría por agotamiento. El cultivo se llevó a cabo en condiciones controladas de temperatura (37 °C) durante un período de 12 horas como recomienda **Villalobos et al., (2021).**

C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10

El hongo *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* se inoculó en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), un medio de cultivo específico para el crecimiento de hongos, mediante la técnica de siembra por puntos. El proceso de incubación se llevó a cabo en condiciones controladas, manteniendo una temperatura constante de 25 °C durante un período de 7 días **(Pérez & Sánchez, 2019).**

B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001

La cepa fúngica *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-HG001* se activó mediante la técnica de estriado por agotamiento, en placas con medio PDA. Para asegurar el desarrollo óptimo del hongo el cultivo se realizó en un ambiente controlado, donde la temperatura se mantuvo estable a 25 °C durante un lapso de 7 días **(Acosta et al., 2021).**

2.2.1.3. Multiplicación y preparación del inóculo

La multiplicación bacteriana se realizó a partir de una sola colonia en 150 mL de medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C por 18 horas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL sellado con Parafilm TM y un tapón de papel de aluminio con agitación suave de 200 rpm. Cumplido el tiempo establecido se distribuyó el medio en tubos falcón de 50 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. Se obtuvo un concentrado de células y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 mL de solución isotónica la cual preservó la viabilidad celular **(Dong et al., 2023).**

2.2.1.4. Microencapsulación

Se preparó una solución acuosa de maltodextrina y goma arábiga 3:1 respectivamente como materiales de pared de 20% p/v y la suspensión de *B. subtilis AC01* al 1% p/v obtenida anteriormente en 100 mL de solución isotónica. A continuación, se llevó la solución al Mini Spray Dryer y se ajustó las

condiciones de operación: temperatura de entrada y salida de aire de 76 y 145 °C, respectivamente; un porcentaje de aspiración entre 40 % y 90 %, un flujo de aire de 450 - 565 L/h y un flujo de alimentación de 6 mL/min **(Ma et al., 2015).** Para proteger la viabilidad del microencapsulado se optó por almacenarlo en bolsas ziploc de aluminio.

2.2.2. Determinación de la eficiencia de microencapsulación de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* obtenidos

2.2.2.1. Eficiencia de microencapsulación

Para determinar la eficiencia de microencapsulación (ME) se empleó la metodología descrita por **(Cuello et al., 2015)** en la que se realizó una dilución de las microcápsulas en solución salina y se centrifugó a 5000 rpm para separar las células de *B. subtilis AC01* de los polímeros microencapsulantes. Se determinó la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculó con la fórmula descrita a continuación:

Ec.1.

$$ME = \frac{(A - B)}{A} * 100$$

Donde:
A= concentración bacteriana total en la suspensión.
B= concentración de la bacteria sin microencapsular encontrada en el sobrenadante.

2.2.2.2. Determinación de la humedad del microencapsulado

Se tomó 1 g del microencapsulado de *B. subtilis AC01* y se colocó en la balanza de humedad, misma que arrojó los datos de: peso inicial, peso final y porcentaje de humedad (**Pastuña et al., 2016).**

2.2.2.3. Espectroscopía Infrarroja de la transformada de Fourier

La Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier se llevó a cabo con ayuda del FTIR-ATR PerkinElmer siguiendo una adaptación de la metodología descrita por **Moradi et al., (2022).** Se evaluó el polvo microencapsulado colocando una pequeña muestra en el módulo de ATR con una escala de longitud de onda de 4000 y 400 cm^{-1}. Finalmente se recolectaron los datos utilizando el software de análisis de datos espectrales.

Para la interpretación de resultados obtenidos se compararon las bandas de los polvos microencapsulados con las bandas de los agentes encapsulantes, es decir, de la maltodextrina y goma arábiga para lograr determinar si existe una microencapsulación eficiente.

2.2.3. Evaluación de la capacidad antagónica de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* frente a *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001 y C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* en pruebas *in vitro*

2.2.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los microencapsulados de *B. subtilis AC01*

Para determinar la CMI se prepararon soluciones del microencapsulado de *B. subtilis AC01* con concentraciones de 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/mL, 100 mg/ml y 200 mg/ml. Se midieron mediante el método de microdilución en caldo preparado en placas de 96 pocillos. Cada pocillo se complementó con 20 µL de cada suspensión fúngica (*B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*) por separado, la cual se ajustó a una concentración de 10^8 conidios/mL con la ayuda de un hemocitómetro, 80 µL de caldo dextrosa Sabouraud (SDB) y 100 µL de suspensión de microencapsulado **(Kolarević et al., 2016).** El estudio se realizó por triplicado.

Para este ensayo se empleó como control negativo pocillos que contenían SDB y la solución fúngica, mientras que, como control positivo, pocillos que reemplazaron la solución del microencapsulado con Amistar Top (fungicida comercial). Finalmente, la microplaca se incubó a 25 °C durante 3 días y la concentración más baja de suspensión de microencapsulado bacteriana que impidió el crecimiento de hongos se definió como CMI, este proceso se repitió tanto para el hongo de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-EPpi0* **(Rafiee et al., 2022).**

2.2.3.2. Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) de los microencapsulados de *B. subtilis AC01*

La determinación de la CFM se realizó una vez identificada la CMI de cada hongo. Se tomaron 10 µL del pocillo que resulte ser la CMI de la placa de micropocillos y de los dos pocillos siguientes que mostraron visualmente una inhibición del crecimiento completo. Se cultivaron en medio PDA y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 horas. Posteriormente a la incubación se revisaron las placas buscando crecimiento visible de los hongos. La concentración fungicida mínima se registró como aquella en la cual no existió crecimiento fúngico visible en las placas de agar **(Londoño et al., 2013).**

2.2.3.3. Ensayo de antagonismo en placa

Se desarrollaron pruebas de antagonismo para evaluar el microencapsulado frente a los hongos fitopatógenos, usando la metodología de cultivo dual. En esta prueba el hongo respectivo (*B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*) se esparció mediante estriado por agotamiento en toda la placa y el microencapsulado de *B. subtilis AC01* se colocaron en un disco de 0.5 cm de diámetro de papel filtro, con las concentraciones especificadas en el punto 6.3.1. Las placas se incubaron a 25 ± 1 °C y los diámetros del crecimiento del patógeno y del biocontrolador se midieron a las 72 horas. **(B. Martínez et al., 2014).**

Se empleó la escala de Duraffourd para medir el antagonismo del microorganismo encapsulado, descrita en la Tabla 8.

Tabla 8.

Escala de sensibilidad según Durrafourd

Inhibición	Símbolo	Diámetro
Sumamente sensible	+++	> 20 mm
Muy sensible	++	>14 mm – 20 mm
Sensible	+	≥8 mm ≤14 mm
Nula	-	<8 mm

Fuente: **(Checalla & Sánchez, 2021).**

Se midió con la ayuda de un pie de rey el diámetro de inhibición del hongo en presencia del microencapsulado, del hongo sin la bacteria (control negativo) y del hongo con el producto comercial Amistar Top (control positivo), que permite controlar hongos fitopatógenos en cuestión.

Tabla 9.

Tratamientos para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*

Concentración de microencapsulado de *B. subtilis AC01*	Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
C1: 10 mg/mL	BC1	BC1R1	BC1R2	BC1R3
C2: 20 mg/mL	BC2	BC2R1	BC2R2	BC2R3

C3: 50 mg/mL	BC3	BC3R1	BC3R2	BC3R3
C4: 100 mg/mL	BC4	BC4R1	BC4R2	BC4R3
C5: 200 mg/mL	BC5	BC5R1	BC4R2	BC5R3

Tabla 10.

Tratamientos para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10)*

Concentración de microencapsulado de *B. subtilis AC01*	**Tratamiento**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Réplica 3**
C1: 10 mg/mL	CF1	CF1R1	CF1R2	CF1R3
C2: 20 mg/mL	CF2	CF2R1	CF2R2	CF2R3
C3: 50 mg/mL	CF3	CF3R1	CF3R2	CF3R3
C4: 100 mg/mL	CF4	CF4R1	CF4R2	CF4R3
C5: 200 mg/mL	CF5	CF5R1	CF5R2	CF5R3

2.2.3.4. Diseño experimental

En esta investigación se busca evaluar si existen diferencias significativas en los halos de inhibición de los tratamientos en función del tipo de hongo fitopatógeno y la concentración del microencapsulado, por lo que se realizó un diseño factorial AxB con tres réplicas y dos controles (positivo y negativo). Los factores de estudio son: Tipo de hongo fitopatógeno (*B. cinerea CC-FCAGP-Bc-001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*); concentración de microencapsulado (C1:10, C2:20, C3:50, C4:100, C5:200 mg/ml). La variable respuesta son los halos de inhibición de los tratamientos en mm. El análisis se realizó en el software SPSS mediante la prueba gratuita de 30 días, aplicando un ANOVA y verificado la validez de los tratamientos mediante una Prueba HSD de Tukey.

- **Variables:**

- Variable Dependiente: Diámetro de halo de inhibición (mm).
- Variables Independientes: Concentración del microencapsulado bacteriano y tipo de hongo fitopatógeno.

- **Hipótesis**

- **H_0:** No existen diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición entre los dos tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de *B. subtilis AC01.*

- **H_a:** existen diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición entre los dos tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de *B. subtilis AC01.*

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Obtención de microencapsulados de *B. subtilis AC01* mediante secado por aspersión

3.1.1.1. Identificación molecular B. subtilis AC01

Para la identificación de la cepa de *B. subtilis AC01*, se secuenció el gen 16S ARNr mediante la técnica de secuenciación Sanger. Esta técnica utiliza nucleótidos terminadores marcados con fluorescencia que, al ser incorporados por la ADN polimerasa, generan fragmentos de diferentes longitudes, permitiendo identificar la base en la que termina cada fragmento **(Crossley et al., 2020)**. El gen 16S ARNr se utiliza como marcador genético porque está presente en la mayoría de las bacterias, su función es conservada y es suficientemente largo para análisis bioinformáticos **(Janda & Abbott, 2007)**. Los cebadores utilizados fueron 27f y 1492r, que se unen a los nucleótidos 8-27 y 1492-1507 del gen 16S rRNA.

Tras un alineamiento en NCBI BLAST, se comparó la secuencia obtenida (Figura 1) con la base de datos, identificando la bacteria como *Bacillus subtilis* subespecie *subtilis* cepa SRCM1000761, SRCM100757 o SRCM101444, todas con un 97.65% de similitud (Anexo 11) lo que indica el porcentaje de residuos idénticos en las mismas posiciones de la secuencia original **(Torkian et al., 2020)**. Sin embargo, la cobertura fue del 32%, lo que representa la fracción de la secuencia original incluida en el alineamiento de segmentos **(Hu & Kurgan, 2019).**

>H240108-045_C21_BST-001_27F.ab1
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCCGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCGGATAAAGATTTTGACGGTACCGGAAGCAAGGCGAACCTGCGTGAGGGAT
TAGGGTTCCTTGAGGTTGGGTTTTAGTAAGTAGTGGATTTTGAGACCGGATCAGGATTGGAATGGTCTCGGCTTTCCGTGCGGGTATAGTGTTGTTACGTTACTAACAGA
AGTGCCGTGGCTTTACAGAGAGAAGCGACGGCTTTCTGGTGGAAGTGGTGAGGTTCCGTCGTGTCTCGGAGGCTGGGGGACGCGTTTTGGATCGCCTTCGCAAGTCG
TGACGCGGCCGAGGCGCGAAAGGCTTCCAGTGGCTGGTGAGTGGGCGGGAGCTCAGTCGTATGCTCGGGCGCGGCGTCGCTGCGTTGCAGTGTGACGGAGATAGCTT
CTGGTCTGAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCCTAAACGATGTCACCTTCCGCGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCGGATAAAGATTTTGACGGTACCGGAAGCAAGGCGAACCTGCGTGAGGGATTAGGGTTCCTTGAGGTTGG
GTTTTAGTAAGTAGTGGATTTTGAGACCGGATCAGGATTGGAATGGTCTCGGCTTTCCGTGCGGGTATAGTGTTGTTACGTTACTAACAGAAGTGCCGTGGCTTTACAGA
GAGAAGCGACGGCTTTCTGGTGGAAGTGGTGAGGTTCCGTCGTGTCTCGGAGGCTGGGGGACGCGTTTTGGATCGCCTTCGCAAGTCGTGACGCGGCCGAGGCGCGA
AAGGCTTCCAGTGGCTGGTGAGTGGGCGGGAGCTCAGTCGTATGCTCGGGCGCGGCGTCGCTGCGTTGCAGTGTGACGGAGATAGCTTCTGGTCTGAACTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCCTAAACGATGTCACCTTCCGCGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACG
AGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCG
GGAAACCGAGGCTAATACCGGATAAAGATTTTGACGGTACCGGAAGCAAGGCGAACCTGCGTGAGGGATTAGGGTTCCTTGAGGTTGGGTTTTAGTAAGTAGTGGATT
TTGAGACCGGATCAGGATTGGAATGGTCTCGGCTTTCCGTGCGGGTATAGTGTTGTTACGTTACTAACAGAAGTGCCGTGGCTTTACAGAGAGAAGCGACGGCTTTCTG
GTGGAAGTGGTGAGGTTCCGTCGTGTCTCGGAGGCTGGGGGACGCGTTTTGGATCGCCTTCGCAAGTCGTGACGCGGCCGAGGCGCGAAAGGCTTCCAGTGGCTGGT
GAGTGGGCGGGAGCTCAGTCGTATGCTCGGGCGCGGCGTCGCTGCGTTGCAGTGTGACGGAGATAGCTTCTGGTCTGAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCCTAAACGATGTCACCTTCCGCGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCG
GATAAAGATTTTGACGGTACCGGAAGCAAGGCGAACCTGCGTGAGGGATTAGGGTTCCTTGAGGTTGGGTTTTAGTAAGTAGTGGATTTTGAGACCGGATCAGGATTG
GAATGGTCTCGGCTTTCCGTGCGGGTATAGTGTTGTTACGTTACTAACAGAAGTGCCGTGGCTTTACAGAGAGAAGCGACGGCTTTCTGGTGGAAGTGGTGAGGTTCC
GTCGTGTCTCGGAGGCTGGGGGACGCGTTTTGGATCGCCTTCGCAAGTCGTGACGCGGCCGAGGCGCGAAAGGCTTCCAGTGGCTGGTGAGTGGGCGGGAGCTCAGT
CGTATGCTCGGGCGCGGCGTCGCTGCGTTGCAGTGTGACGGAGATAGCTTCTGGTCTGAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCACGCCCTAAACGATGTCACCTTCCGCGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGAGCTTGC
TCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCGGATAAAGATTTTGACGGTA
CCGGAAGCAAGGCGAACCTGCGTGAGGGATTAGGGTTCCTTGAGGTTGGGTTTTAGTAAGTAGTGGATTTTGAGACCGGATCAGGATTGGAATGGTCTCGGCTTTCCG
TGCGGGTATAGTGTTGTTACGTTACTAACAGAAGTGCCGTGGCTTTACAGAGAGAAGCGACGGCTTTCTGGTGGAAGTGGTGAGGTTCCGTCGTGTCTCGGAGGCTGG
GGGACGCGTTTTGGATCGCCTTCGCAAGTCGTGACGCGGCCGAGGCGCGAAAGGCTTCCAGTGGCTGGTGAGTGGGCGGGAGCTCAGTCGTATGCTCGGGCGCGGCG
TCGCTGCGTTGCAGTGTGACGGAGATAGCTTCTGGTCTGAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCCTAA
ACGATGTCACCTTCCGCGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCGGATAAAGATTTTGACGGTACCGGAAGCAAGGCGAACCT
GCGTGAGGGATTAGGGTTCCTTGAGGTTGGGTTTTAGTAAGTAGTGGATTTTGAGACCG

Figura 1. Resultado de la secuenciación de *B. subtilis AC01*

3.1.1.2. Producción de inóculo bacteriano de B. subtilis AC01

La producción de células bacterianas de la cepa *B. subtilis AC01* inició a partir de una única colonia. Esta colonia se inoculó en un matraz Erlenmeyer que contenía 150 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB). El cultivo se incubó en condiciones óptimas de temperatura y agitación durante un tiempo determinado hasta alcanzar la densidad óptica deseada (DO600 = 1.0) para asegurar que exista suficiente cantidad de bacterias. Posteriormente, las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en solución salina ajustando la concentración a 10^8 UFC/mL. Este proceso permitió obtener 1,54 g de células bacterianas viables, las cuales fueron resuspendidas en solución salina para su posterior uso.

3.1.1.3. Microencapsulación de células de *B. subtilis AC01*

El proceso de secado por aspersión se llevó a cabo a temperatura de salida de 70 °C. El rendimiento del proceso de microencapsulación obtenido fue del 25,31 % (-). Si bien este porcentaje se considera bajo, es importante destacar que se encuentra dentro del rango típico para experimentos a escala de laboratorio, el cual oscila entre el 20 % y el 70 %, según **López et al., (2006).** Sin embargo, este bajo rendimiento podría atribuirse a diversos factores. En primer lugar, una parte significativa de la muestra podría haberse adherido a las paredes de la cámara de secado, lo que ocasionaría pérdidas del material. Por otro lado, es posible que el polvo microencapsulado haya sido expulsado a través de los conductos de salida, generando perdidas considerables, como lo sugieren **(Ramos et al., (2022).**

Adicionalmente, pudo existir un bloqueo de la tobera por parte del material microencapsulado ocasionando un aumento en la temperatura de salida. **Esquivel et al., (2015)** señalan que la temperatura de salida en este tipo de procesos usualmente se encuentra entre 50 y 80 °C. Un incremento en la temperatura podría haber provocado la degradación del material y, en consecuencia, la disminución del rendimiento.

Para la generación de las paredes encapsulantes se utilizaron goma arábiga (GA) y maltodextrina (MD) en conjunto. Estos polímeros fueron seleccionados debido a sus características favorables de ser altamente solubles, aportan baja viscosidad y una alta estabilidad **(Karaaslan et al., 2021)**. En este estudio, se empleó una relación 3:1 (MD:GA), la cual ha demostrado ser efectiva para encapsular diversos compuestos con propiedades similares a las de las células bacterianas utilizadas. Asimismo, se utilizó una concentración de células bacterianas al 1 % p/v, las cantidades empleadas se visualiza en la Tabla 11.

Tabla 11.

Composición del microencapsulado de *B. subtilis AC01*

Componente	Cantidad
Goma arábiga	4,62 g
Maltodextrina	1,54 g
Células de *B. subtilis AC01*	1,54 g

En este caso la combinación de diferentes polímeros encapsulantes, como GA y MD, ofrece ventajas sobre el uso de un solo agente. Ya que pueden complementarse entre sí, mejorando las propiedades generales del recubrimiento, como la estabilidad, permeabilidad y liberación del compuesto encapsulado **(Ríos & Gil, 2021)**. En ciertos casos la combinación de polímeros resulta ser económica a comparación de emplear un solo polímero costoso, potenciando así el desarrollo de un bioproducto a partir de la encapsulación de *B. subtilis AC01* **(Sarabandi et al., 2019).**

3.1.2. Determinación de la eficiencia de microencapsulación de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* obtenidos

3.1.2.1. Eficiencia de la microencapsulación (ME)

Para garantizar una alta eficiencia del microencapsulado **(Ríos & Gil, 2021)** aseguran que es de vital importancia la elección de los materiales que van a formar la pared de las capsulas, ya que estos permitirán conservar las propiedades y la viabilidad del principio activo. En el presente estudio se obtuvo una eficiencia del 82,5 % (Anexo 13) que resulta ser un valor considerable. Sin embargo, para obtener una alta eficiencia los parámetros de operación deben ser optimizados como es la velocidad de alimentación y la temperatura de entrada y salida de aire **(Liu et al., 2004).**

Estudios realizados por **Ma et al., (2015)** demostraron que la tasa de supervivencia de *B. subtilis B99-2* fueron mayores cuando la temperatura de entrada oscilaba en un rango de 125 a 145 °C. La especie de *B. subtilis* se caracteriza por ser resistente a altas temperaturas en forma de endosporas **(González et al., 2022)**, sin embargo, las temperaturas altas en el proceso de microencapsulación pueden generar pérdidas del ingrediente activo y por ende un bajo porcentaje de células empaquetadas, lo que genera una disminución en la eficiencia.

3.1.2.2. Determinación de la humedad del microencapsulado

El proceso de microencapsulación de microorganismos debe tener condiciones controladas, con el fin de proporcionar una técnica adecuada y no perjudicar la viabilidad celular **(Sun et al., 2023)**. Con este objetivo se realizó el análisis de contenido de humedad, obteniendo los resultados descritos en la Tabla 12 y se observa en el Anexo 15. Es necesario tomar en cuenta que existen una variedad de polímeros capaces de realizar una microencapsulación adecuada para microorganismos. Sin embargo, polímeros como maltodextrina y goma arábiga son los más utilizados debido a sus características de encapsulación y compatibilidad con células **(Deng et al., 2023)**. Asimismo, estos polímeros facilitan la asimilación y solubilidad en matrices acuosas, en donde se resuspenden los microorganismos.

Tabla 12.

Eficiencia de microencapsulación de *B. subtilis AC01*

Microorganismo	Peso inicial del microencapsulado (g)	Peso final del microencapsulado (g)	Eficiencia de microencapsulación
B. subtilis	1.035±0.87	0.937±0.15	90.53±0.56%

En este caso la eficiencia del microencapsulado fue de 90.53±0.56%, mismo que es considerado como un resultado óptimo para el contenido de las microcápsulas. Este se corrobora con los obtenidos por **(Ramirez et al., 2024)** en su estudio. Una correcta microencapsulación permite conservar viables por más tiempo las células inmovilizadas, garantizando, en este caso, que prevalezca la capacidad antifúngica propia de *B. subtilis.* Si bien existe una alta eficiencia de microencapsulación, es necesario contrastar este resultado con pruebas adicionales como la Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier, en donde se logra contrastar mediante un espectro el contenido que presenta el microencapsulado.

3.1.2.3. Espectroscopía Infrarroja de la Transformada de Fourier

La forma de aplicación de microorganismos utilizados en el control biológico es un parámetro crucial para tener en cuenta, principalmente por la susceptibilidad que poseen estos a factores ambientales. La microencapsulación como método de conservación permite superar estos factores, dando lugar a un correcto control fúngico por parte de las bacterias **(Fathi et al., 2021)**. Una forma rápida de comprobar la eficiencia de microencapsulación de microorganismos es por la Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). Esta es una técnica capaz de identificar grupos

funcionales específicos, acorde el espectro que generan por el haz de luz infrarroja que atraviesa la muestra **(Mooranian et al., 2014).**

En este trabajo, se utilizó el FTIR ya que es capaz de determinar la presencia de moléculas características de los microorganismos microencapsulados. Para la ejecución de esta sección se empleó un FTIR en conjunto con el módulo de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Los espectros mostrados en la Figura 2 indican la composición del microencapsulado y de la composición polimérica utilizada para el recubrimiento.

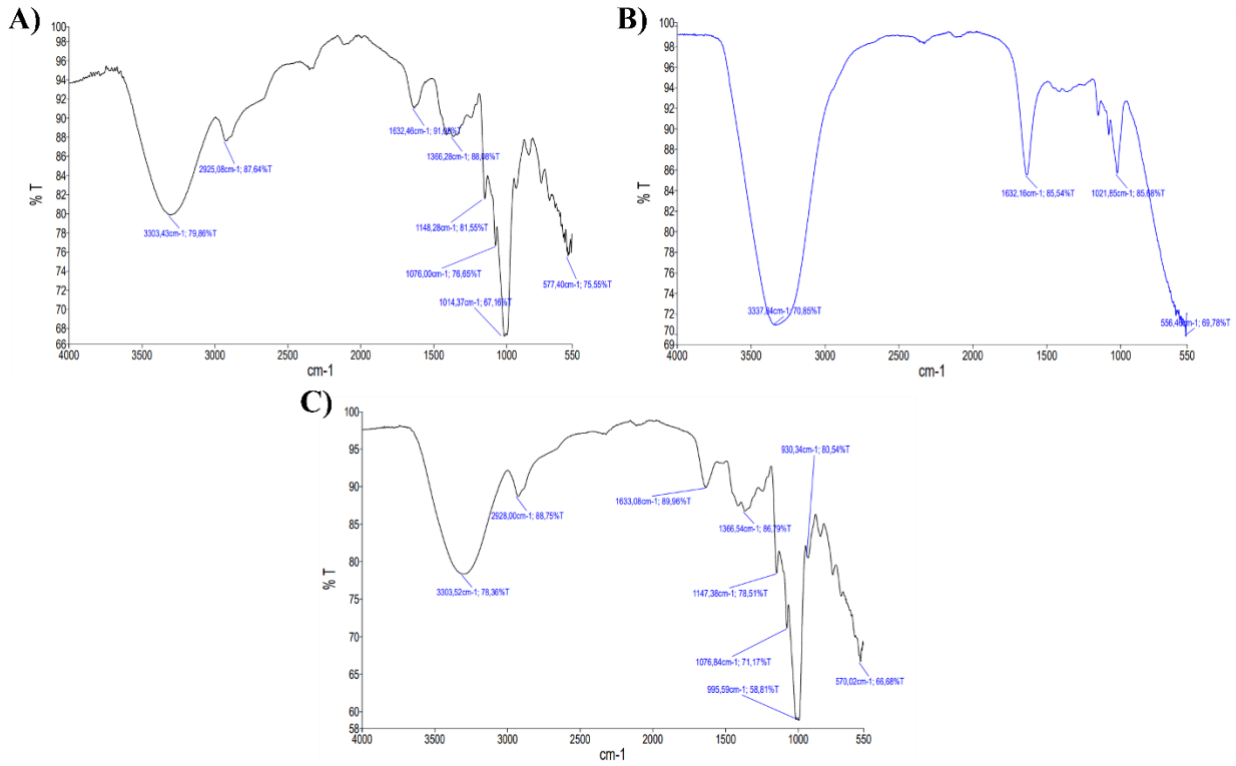


Figura 2. Espectros obtenidos en la microencapsulación de *B. subtilis AC01*

Nota: A) Microencapsulado de *B. subtilis AC01* B) *B. subtilis AC01* resuspendido C) Espectro obtenido de la mezcla polimérica

En la Figura 2C se observan los picos característicos de la mezcla polimérica utilizada de maltodextrina y goma arábiga. Estos corresponden con el producto obtenido mediante secado por aspersión (Figura 2A), lo cual determina una adecuada microencapsulación de los microorganismos. Esto se evidencia de forma más clara con los picos que se encuentran en 1076 cm-1, 2925 cm-1 y 1147 cm-1, ya que estos no se encuentran presentes en la muestra que contiene únicamente la bacteria.

Por otra parte, en la Figura 2B se observa una depresión profunda cercana a 3337 cm-1, correspondiente a ácidos grasos de cepas de *B. subtilis* **(Bağcıoğlu et al., 2019)**. De la misma forma, el pico presente en

1632 cm-1 corresponde a enlaces C=O seguidos de un pico presente en 1021 cm-1, el cual indica la presencia de grupos éster fosfórico, los cuales en conjunto están presentes en la membrana celular de *B. subtilis*. Es posible observar un punto final característico presente en 556 cm-1 el cual denota la presencia de fosfolípidos y ARN presente en la muestra **(Brandes & Brandl, 2011).**

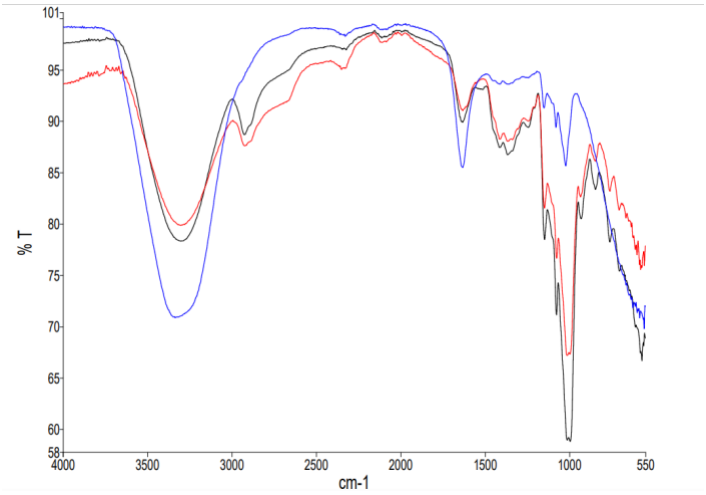


Figura 3. Espectros superpuestos

Nota: Azul: espectro obtenido para la suspensión de *B. subitlis AC01.* Rojo: Microencapsulado de *B. subtilis AC01*. Negro: Mezcla polimérica

En la Figura 3 se observa claramente la diferencia entre los espectros obtenidos para cada muestra. Al existir un valle más profundo en la suspensión de *B. subtilis* (espectro azul) a diferencia de los espectros que contienen solo polímeros y la bacteria microencapsulada (espectros negro y rojo respectivamente) indica que la mayoría de la biomasa fue correctamente microencapsulada. Esto se corrobora con la similitud existente entre el espectro que contiene únicamente polímeros con el espectro del microencapsulado, ya que se demuestra la existencia de la barrera generada por los polímeros frente a *B. subtilis AC01* **(Zdenek et al., 2004).**

3.1.3. Evaluación de la capacidad antagónica de los microencapsulados de *B. subtilis AC01* frente a *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* en pruebas *in vitro*

3.1.3.1. Determinación de actividad antifúngica

El microencapsulado de *B. subtilis AC01* exhibió actividad antifúngica contra la cepa de *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* mediante la técnica de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos como se muestra en la Figura 4. Los resultados evidenciaron inhibición del crecimiento fúngico desde la concentración mínima de microencapsulado (1) que fue de 10 mg/mL (1%). En consecuencia, los valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y CFM (Concentración Fungicida Mínima) del microencapsulado frente a *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* se encontraron dentro del rango de 10 a 50 mg/mL.

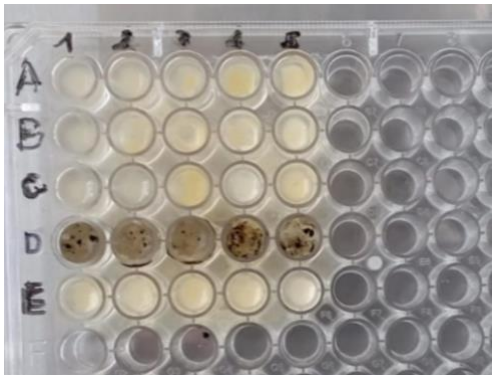


Figura 4. Prueba de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10*

Nota: En la placa se reporta los resultados de inhibición de la cepa de *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* sometida a diferentes concentraciones (1,2,3,4 y 5) con tres réplicas (A, B y C) y con sus respectivos controles negativo (D) y positivo (E).

La CMI se estableció en 10 mg/mL, ya que a esta concentración se observó un claro efecto antifúngico contra el hongo, debido a que no presento crecimiento a simple vista (1A, 1B y 1C). Posteriormente, se sembraron las dos concentraciones siguientes, 20 mg/mL (2%) y 50 mg/mL (5%), en placas con medio PDA. Se determinó que la CFM es la concentración de 50 mg/mL, en vista de que no se detectó población fúngica a esta concentración como se muestra en la Figura 5. Esto indica la inhibición completa del patógeno a diferencia de las otras dos concentraciones (10 y 20 mg/mL) que mostraron crecimiento de varias colonias.

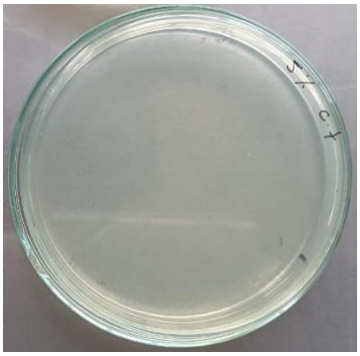


Figura 5. Siembra en placa del pocillo con una concentración de microencapsulado de *B. subtilis* AC01 de 50 mg/mL

Diversos estudios, como el de **Valenzuela et al., (2020)** han demostrado que las bacterias del género *Bacillus* son capaces de producir lipopéptidos antifúngicos, como surfactinas e iturinas. Incluso, algunas cepas, como *B. subtilis QST713*, tienen la capacidad de sintetizar ambos tipos de lipopéptidos simultáneamente **(Rafiee et al., 2022)**. La obtención de valores bajos de CMI y CFM, como se observa en este estudio, indica una alta producción de lipopéptidos por parte de la bacteria **(Ley et al., 2022).**

Por otro lado, el hongo *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* exhibió un mayor porcentaje de colonización en las cinco concentraciones evaluadas como se aprecia en la Figura 6. Esto indica que el control biológico mediante el microencapsulado de *B. subtilis AC01* resultó ineficaz contra este patógeno. Esta falta de control podría atribuirse a diversos factores, incluyendo la especificidad del patógeno.

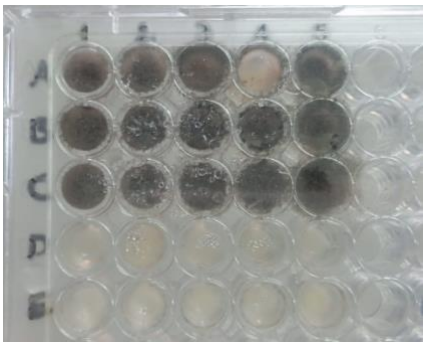


Figura 6. Prueba de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*

Cada especie de hongo posee características únicas, como mecanismos de defensa y resistencia a agentes biológicos como *B. subtilis*. En este caso, el hongo de *B. cinerea* empleado en el estudio proviene de la provincia de Tungurahua, Ecuador, donde el moho gris es una enfermedad prevalente en cultivos de hortalizas **(Calvache & Filgueira, 2017).** La necesidad de controlar este patógeno podría

haber impulsado el desarrollo de mecanismos de resistencia más robustos en los hongos locales, incluyendo la cepa *CC-FCAGP-Bc-MG001*. Esta hipótesis se sustenta en la variabilidad genética observada en *B. cinerea* **(Weber & Petridis, 2023).** Las poblaciones de este hongo han evolucionado para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a diversos métodos de control, incluyendo el uso de agentes biológicos.

En consecuencia, la cepa *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* podría presentar una menor susceptibilidad a *B. subtilis AC01*, lo que explicaría la falta de eficacia del microencapsulado en este caso particular. Esta observación resalta la importancia de considerar la especificidad del patógeno y la variabilidad genética al evaluar la efectividad de estrategias de control biológico.

3.1.3.2. *Ensayo de antagonismo en placa*

Los resultados de antagonismo para cada hongo fitopatógeno se determinaron mediante la medición de los halos translucidos que presento cada tratamiento, con su respectivo control (positivo y negativo). Se determino el grado de inhibición siguiendo la escala de sensibilidad según Duraffourd descrita en la Tabla 5.

3.1.3.2.1. Medición de los halos de inhibición

La Tabla 13 muestra la medida de los halos de inhibición y su promedio obtenidos para el hongo de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*. Hay que mencionar que fueron cinco tratamientos con tres replicas cada uno y con sus respectivos controles positivos y negativos (Anexo 16).

Tabla 13.

Halos de inhibición para los tratamientos empleados con *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01*

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Promedio de halo (mm)
BC1R1	7	7,33
BC1R2	8	
BC1R3	7	
BC2R1	8	7,67
BC2R2	8	
BC2R3	7	
BC3R1	8	

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Promedio de halo (mm)
BC3R2	8	8
BC3R3	8	
BC4R1	8	
BC4R2	9	8,67
BC4R3	9	
BC5R1	10	
BC5R2	9	9,67
BC5R3	10	

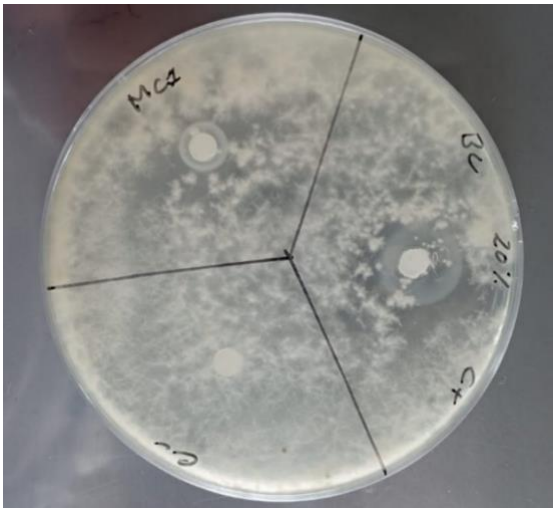


Figura 7. Resultado de actividad antifúngica de *B. subtilis AC01* microencapsulado, con una concentración de 200 mg/mL frente *a B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*

Se evaluó la actividad antagonista del microencapsulado de *B. subtilis AC01* contra *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* en diferentes tratamientos y concentraciones (10 mg/mL, 20 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL). Los resultados no mostraron una correlación significativa entre la concentración de microencapsulado y su efecto antifúngico. El tratamiento BC5 a pesar de poseer la mayor concentración de microencapsulado, solo presentó un promedio de inhibición de 9,67 mm a las 72 horas, lo que lo clasifica como sensible (+) al microencapsulado como se muestra en la Figura 7. Los tratamientos con menor concentración de microencapsulado no exhibieron resultados antagónicos significativos, traduciéndose en una nula inhibición (-).

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antagonista del microencapsulado de *B. subtilis* contra *B. cinerea* no depende únicamente de la concentración del microencapsulado. Es probable que otros factores intervengan en la actividad antagonista, además de la cantidad de microencapsulado presente. Uno de estos factores podría ser la resistencia de la pared celular del hongo. *B. cinerea* posee una pared celular gruesa y resistente, lo que puede dificultar la penetración de las enzimas o lipopéptidos antimicrobianos producidos por *B. subtilis* **(Tenberge, 2007).** Además, que existe la posibilidad que la cepa en específico haya desarrollado genes de resistencia ante cepas de control biológico **(Weber & Petridis, 2023).**

Cabe destacar que al momento de evaluar los tratamientos (72 horas), el hongo *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* se encontraba en su fase de crecimiento exponencial, caracterizada por un aumento significativo de la esporulación. Esta fase se evidencia por la presencia de conidios en gran parte de la superficie del cultivo **(Miclea et al., 2012)** como se observa en el Anexo 17 que son los tratamientos con menos concentración de microencapsulado.

La Tabla 14 presenta a los de inhibición para los tratamientos empleados y su promedio con *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01.* Hay que mencionar que fueron cinco tratamientos con tres replicas cada uno y con sus respectivos controles positivos y negativos (Anexo 18).

Tabla 14.

Halos de inhibición para los tratamientos empleados con *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01.*

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Promedio de halo (mm)
CF1R1	23	22.67
CF1R2	22	
CF1R3	23	
CF2R1	28	28.33
CF2R2	28	
CF2R3	29	
CF3R1	30	30.67
CF3R2	32	
CF3R3	30	
CF4R1	35	34.67
CF4R2	34	

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Promedio de halo (mm)
CF4R3	35	
CF5R1	34	
CF5R2	36	36
CF5R3	38	

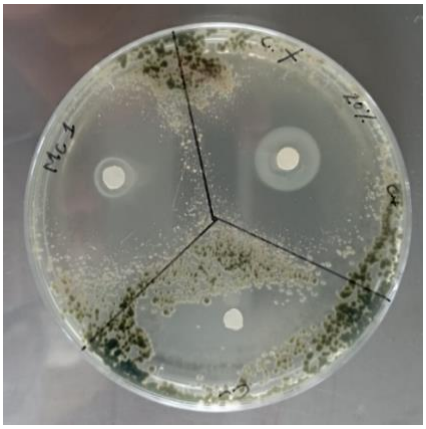


Figura 8. Resultado de actividad antifúngica de *B. subtilis AC01* microencapsulado a 200 mg/mL frente a *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10*

El microencapsulado de *B. subtilis AC01* presentó una actividad antagónica altamente efectiva contra el hongo *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* en todas las concentraciones evaluadas, desde la mínima hasta la máxima. El tratamiento CF1 con una concentración de 10 mg/mL (1%) presentó un promedio de inhibición de 22,67 mm, clasificándolo como sumamente sensible (+++) al microencapsulado. Los demás tratamientos (CF2, CF3, CF4 y CF5) también mostraron resultados considerables de halos de inhibición, con promedios de 28,33 mm, 30,67 mm, 34,67 mm y 36 mm, respectivamente, ubicándolos en la categoría de sumamente sensibles (+++).

Según **(Wang et al., 2018)** las cepas del género *Bacillus* presentan una notable capacidad para inhibir significativamente el crecimiento de microorganismos patógenos que causan enfermedades como el hongo *C. fulvum Cooke*, que afecta las zonas aéreas de las plantas. Diversos estudios han demostrado que los metabolitos biológicos producidos por *Bacillus* como iturina y surfactina **(Shali et al., 2017)** juegan un papel crucial en el control de patógenos fúngicos. Estos metabolitos ejercen su efecto principalmente a través de la destrucción de la membrana celular del hongo.

Adicionalmente, *B. subtilis* produce enzimas líticas capaces de degradar la pared celular de los microorganismos patógenos. La pared celular fúngica, compuesta por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes **(Bowman & Free, 2006)**, varía en su composición según la especie fúngica. En el caso de *C. fulvum*, la producción de enzimas como quitanasas y β-glucanasas por parte de *Bacillus* genera un efecto inhibidor significativo en todas las concentraciones estudiadas como se muestra en el Anexo 19. Estas enzimas degradan los polisacáridos que conforman la pared celular del hongo a través de la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos **(Shafi et al., 2017).**

Como se observa en la Figura 8, existe una relación directa entre la concentración del microencapsulado y el diámetro de inhibición. A mayor concentración de microencapsulado, se observa un mayor diámetro del halo de inhibición alrededor del punto de aplicación. Este fenómeno se debe a que, a mayor concentración de microencapsulado, hay mayor cantidad de células de *B. subtilis AC01* disponibles para ejercer su acción antagónica contra el hongo. Como resultado, se produce una mayor liberación de metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas, lo que genera un efecto inhibidor más extenso sobre el crecimiento del hongo.

3.1.3.3. Diseño experimental

Las medias marginales estimadas para cada hongo se las muestra en la Tabla 15 y en la Figura 9.

Tabla 15.

Medias marginales para cada hongo fitopatógeno estudiado

Variable dependiente: diámetro de halo de inhibición (mm)				
			Intervalo de confianza al 95%	
Hongo fitopatógeno	**Media**	**Desv. Error**	**Límite inferior**	**Límite superior**
B. cinerea	8.267	0.226	7.795	8.738
C. fulvum	30.467	0.226	29.995	30.938

En la Tabla 15 se puede apreciar que para el hongo de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* la media de los halos de inhibición es de 8.267 y para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* la media es significativamente mayor con un valor de 30.467. La desviación estándar del error para los dos es de 0.226 y con un intervalo de confianza al 95%, lo que nos indica que la media de los halos de inhibición para los hongos está bien delimitada.

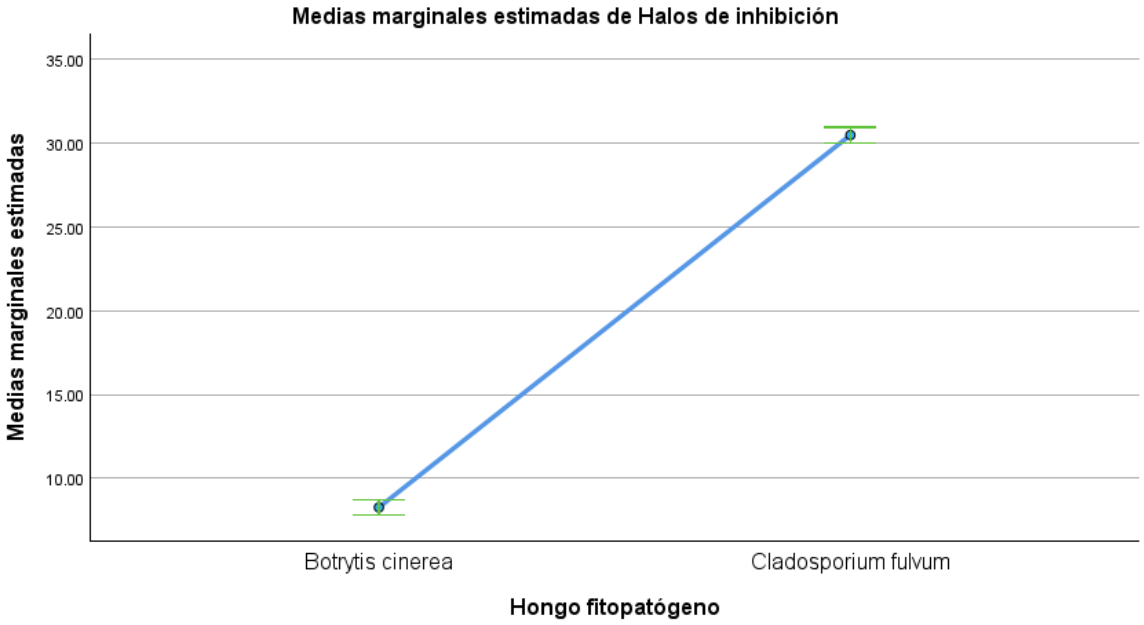


Figura 9. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición según cada hongo fitopatógeno

En la Figura 9 los datos muestran una clara diferencia en la respuesta de los hongos de *Botrytis* y *Cladosporium* ante los tratamientos con el microencapsulado de *B. subtilis AC01.* El hongo fitopatógeno de *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* exhibe una activad inhibitoria mucho más alta en comparación con *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001.* Las diferencias entre las medias (30.467 para *Cladosporium* frente a 8.267 para *Botrytis)* sugiere que *Cladosporium* es más susceptible o que los tratamientos tienen un efecto más fuerte sobre este hongo.

Las medias marginales para cada concentración de microencapsulado evaluado en este estudio se muestra en la Tabla 16 y en la Figura 10.

Tabla 16.

Medias marginales para la concentracion de *B. subtilis AC01* microencapsulado

Variable dependiente: diámetro de halo de inhibición (mm)				
			Intervalo de confianza al 95%	
Concentración de microencapsulado	**Media**	**Desv. Error**	**Límite inferior**	**Límite superior**
C1:10 mg/mL	15.000	0.357	14.254	15.746
C2:20 mg/mL	18.000	0.357	17.254	18.746
C3:50 mg/mL	19.333	0.357	18.588	20.079
C4:100 mg/mL	21.667	0.357	20.921	22.412
C5:200 mg/mL	22.833	0.357	22.088	23.579

Como se puede observar en la Tabla 16 las medias marginales muestran un crecimiento gradual en los halos de inhibición, a medida que aumenta la concentración de microencapsulado de *B. subtilis AC01.* Esto sugiere que mayores concentraciones de microencapsulado están asociadas con una mayor actividad inhibitoria sobre los hongos, según la medida de los halos de inhibición. Se emplea unos intervalos de confianza al 95% para cada nivel de concentración lo que indica una precisión razonable en las estimaciones de las medias.

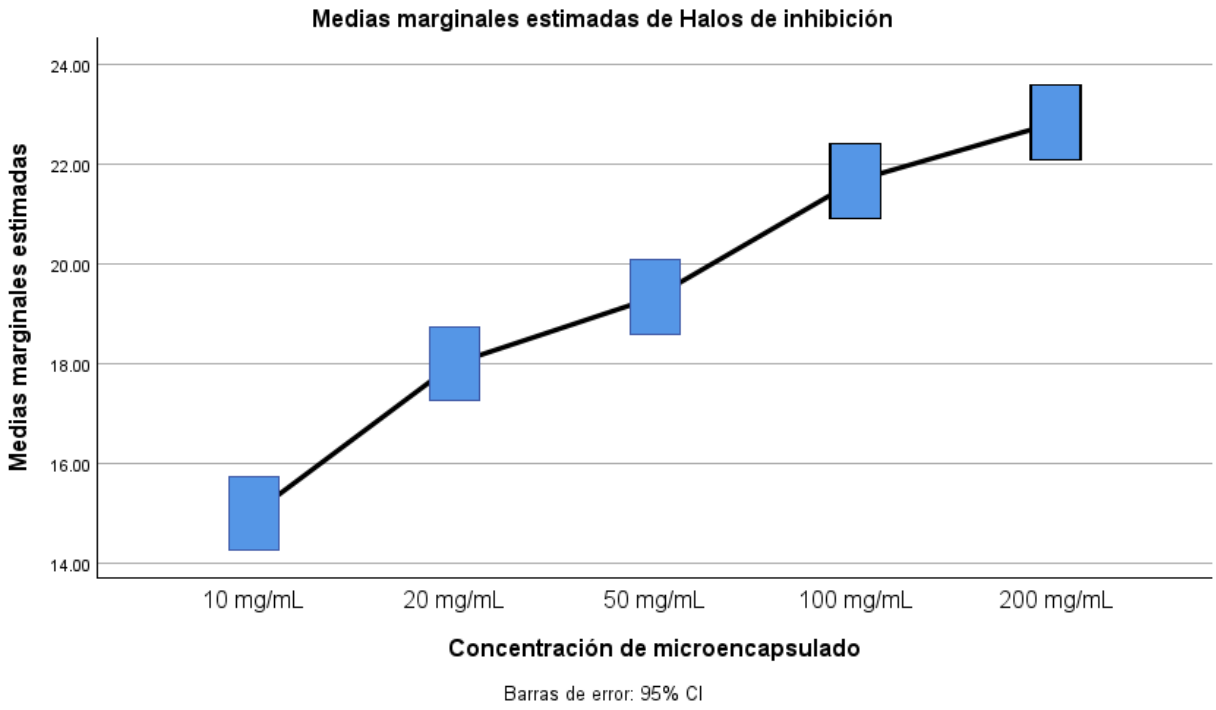


Figura 10. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición según cada concentración de *B. subtilis AC01* microencapsulado

Estas medias marginales de la concentración de microencapsulado complementan los datos anteriores sobre los hongos de *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* y *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001,* proporcionando información adicional de como la concentración de microencapsulado influye en la actividad inhibitoria observada en la Figura 10.

Las medias marginales del factor A (hongo fitopatógeno) y del factor B (concentración de microencapsulado) comparadas entre si se las evidencia en la Figura 11.

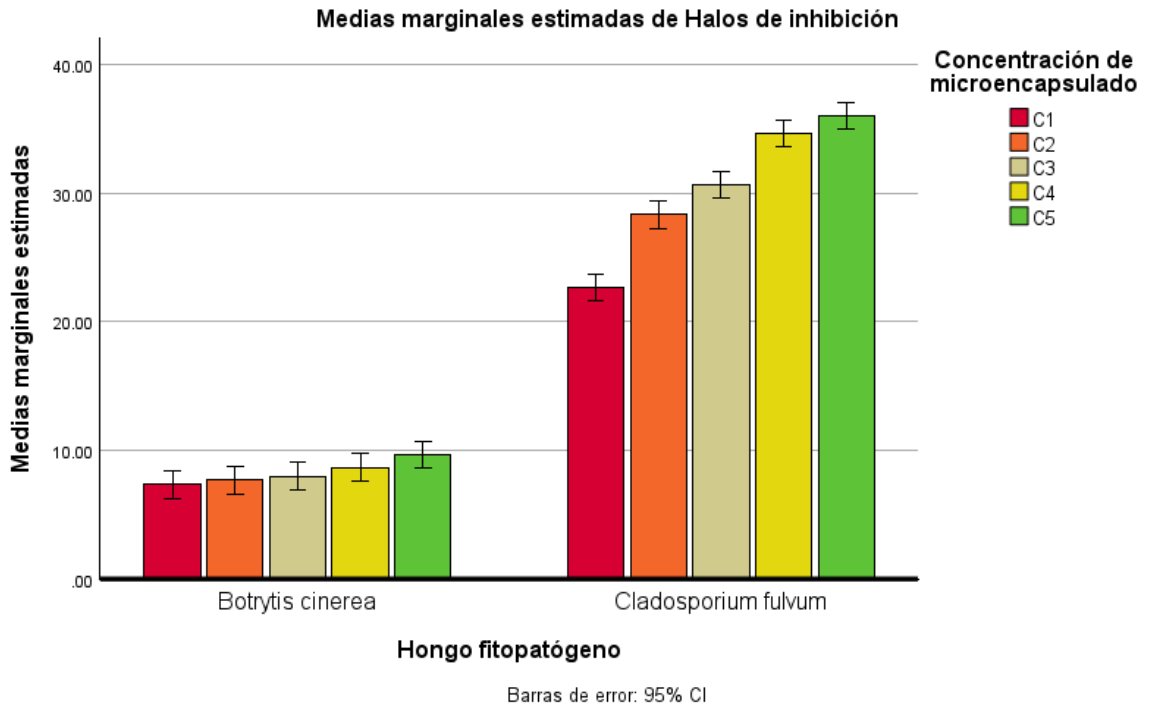


Figura 11. Medias marginales de los hongos fitopatógenos de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* y *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con las diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* con la media de los halos de inhibición para cada tratamiento

Se obtuvo las medias marginales de la intersección AxB combinando cada nivel de los hongos fitopatógenos con cada concentración de microencapsulado. La media marginal de cada concentración de microencapsulado (C1 a C5) indica que hay un aumento en los halos de inhibición con el aumento de la concentración del microencapsulado. Por otro lado, la media marginal de cada hongo (*Botrytis y Cladosporium)* muestran que *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* tiene halos de inhibición mucho más grandes que *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001.*

Se infiere que para *Botrytis* los halos de inhibición para cada concentración de microencapsulado serán menores en comparación con *Cladosporium.* Del mismo modo, para *Cladosporium),* los halos de inhibición aumentarán con la concentración de microencapsulado y serán significativamente mayores que para *Botrytis.*

Por otro lado, la Tabla 17 indica el análisis de varianza, el modelo, la intersección de datos y cada variable, es decir todos los efectos del estudio.

Tabla 17.

Prueba de Efectos Inter-Sujetos

Variable dependiente: diámetro de halo de inhibición (mm)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	4047.633[a]	9	449.737	586.614	<0.001
Intersección	11252.033	1	11252.033	14676.565	<0.001
Hongo	3696.300	1	3696.300	4821.261	<0.001
Concentración	229.467	4	57.367	74.826	<0.001
Hongo * Concentración	121.867	4	30.467	39.739	<0.001
Error	15.333	20	0.767		
Total	15315.000	30			
Total corregido	4062.967	29			

a. R al cuadrado = .996 (R al cuadrado ajustada = .995)

En la Tabla 17 se describe las pruebas de Efectos Inter-Sujetos, en donde el modelo general es altamente significativo ($p < 0.001$) al ser menor a 0.05 (intervalo de confianza), al igual que el tipo de hongo tiene un efecto muy significativo en los halos de inhibición, con *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* mostrando mayores halos de inhibición de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001.* Las diferentes concentraciones de microencapsulado tienen efecto significativo en los halos de inhibición, con concentraciones mayores. A su vez la interacción entre el tipo de hongo y la concentración es significativa, sugiriendo que el efecto de la concentración varía dependiendo del tipo de hongo.

Finalmente, en la Tabla 18 se describe los resultados de una prueba post hoc de comparaciones múltiples entre las medias de los grupos y determinar si existen diferencias significativas entre ellas. En este caso los grupos corresponden a las diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis* (C1 a C5).

Tabla 18.

Prueba de comparaciones múltiples

Concentración de microencapsulado		N	Subconjunto 1	Subconjunto 2	Subconjunto 3
HSD Tukey[a,b]	C1	6	15.0000		
	C2	6		18.0000	
	C3	6		19.3333	
	C4	6			21.6667
	C5	6			22.8333
	Sig.		1.000	0.101	0.183

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .767.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = 0.05.

La prueba de HSD de Tukey nos muestra tres subconjuntos, en el primero se encuentra C1 con una significancia 1.000 lo que indica que no hay diferencias significativas. El segundo está conformado por C2 y C3, con una significancia de 0.101 que sugiere que no existe diferencias significativas entre estas concentraciones. Por último, el tercer subconjunto contiene a C4 y C5 con una significancia de 0.183 por tanto no presenta diferencias significativas.

En base a los resultados de las pruebas de ANOVA y HSD de Tukey muestran diferencias significativas tanto en los efectos principales (Tipo de hongo y concentración de microencapsulado) como en la interacción entre estos factores. En este caso la H_a es sustentada gracias a que las diferencias en los diámetros de los halos de inhibición entre los dos hongos y las concentraciones evaluadas son significativas. Además de que la interacción entre el tipo de hongo y la concentración es significativa, indicando que el efecto de la concentración varía dependiendo del tipo de hongo.

3.1.3.4. *Verificación de hipótesis*

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa, se concluye que existen diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición entre los dos tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de *B. subtilis AC01*.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La microencapsulación de la cepa *B. subtilis AC01* se llevó a cabo mediante secado por aspersión, utilizando una mezcla de maltodextrina y goma arábiga en una proporción de 3:1 como polímeros encapsulantes. El proceso se realizó en condiciones óptimas, con una temperatura de entrada de 145 °C y una temperatura de salida de 70 °C, empleando una proporción de 20:80 entre el ingrediente activo y el polímero. Esto resultó en un rendimiento del 25,31 % debido a las pérdidas ocasionadas por la temperatura de secado.

- El proceso de encapsulación por secado por aspersión alcanzó una eficiencia del 82.5% y presentó un porcentaje de humedad del 9.47%, lo que se traduce en una eficiencia total del 90.53%. Adicionalmente, el microencapsulado fue analizado mediante Espectroscopia de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR), revelando picos correspondientes a los grupos funcionales que conforman la bacteria microencapsulada.

- Se determinó, a través de pruebas *in vitro*, la capacidad antagonista de *B. subtilis AC01* microencapsulado frente a la cepa *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que todas las concentraciones probadas fueron sumamente efectivas y lograron inhibir el crecimiento del patógeno. Se determino que su CMI es 10 mg/mL y su CFM 50 mg/mL. Sin embargo, en el caso de la cepa *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001*, la inhibición fue baja, y en los tratamientos con menor concentración de microencapsulado, la inhibición fue nula.

- Finalmente, se determinó que *B. subtilis AC01* presenta un resultado favorable frente a un proceso de microencapsulación utilizando polímeros como goma arábiga y maltodextrina, con rendimientos del 90.53%. Además, presenta un resultado favorable como forma de control biológico frente a *C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10* con resultados favorables, a diferencia de su uso para el control de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* en donde la inhibición de su crecimiento fue relativamente baja. Esto conlleva un posible uso de *B. subtilis AC01* con el fin de reducir el uso de fungicidas químicos utilizados para el control de *C. fulvum* en la producción de *S. lycopersicum*.

Recomendaciones

- Realizar análisis de vida útil del microencapsulado y determinar la viabilidad de las células microencapsuladas con respecto al tiempo y las condiciones de conservación como la humedad y temperatura.

- Mantener los polvos microencapsulados en un ambiente seco y almacenados en recipientes que los protejan de la entrada de humedad, ya esto puede reducir la eficiencia para futuros análisis del microencapsulado.

- Analizar la cepa de *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* mediante tecnicas moleculares para evidenciar si presenta genes de resistencia ya que su inhibición es baja.

MATERIAL DE REFERENCIA

Acosta, L., Azania, D., & Azania, R. (2021). Cultivo dual *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma spp*. frente a *Botrytis sp*. patógeno de *Passiflora ligularis Juss*. *Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology, 1*(4)*, 43–55.* https://doi.org/10.25127/RIAGROP.20214.720

Agro Bayer. (2021). *Cultivo de Tomate* | Agro Bayer Ecuador. Recuperado el 21 de febrero de 2024, de https://www.agro.bayer.ec/es-ec/cultivos/tomate.html

Alburqueque, D., & Gusqui, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa, 25*(2). https://doi.org/10.22497/ARNALDOA.252.25209

Andrade, L., Kalaivani, N., & Abdul, S. (2023). The Microbial Connection to Sustainable Agriculture. *Plants 2023, 12*(12)*, 2307.* https://doi.org/10.3390/PLANTS12122307

Astorga, K., Meneses, K., Zuñiga, C., Brenes, J., & Rivera, W. (2014). Evaluación del Antagonismo de *Trichoderma Sp* y *Bacillus Su-35434*. *Tecnología En Marcha*, *27*(2), 83–93. https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929

Bağcıoğlu, M., Fricker, M., Johler, S., & Schulz, M. (2019). Detection and identification of *Bacillus cereus, Bacillus cytotoxicus, Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoides and Bacillus weihenstephanensis* via machine learning based FTIR spectroscopy. *Frontiers in Microbiology*, *10*(902) 1-10. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00902/BIBTEX

Banco Central del Ecuador. (2024). *Informe de resultados cuentas nacionales trimestrales.* Banco Central del Ecuador. Recuperado el 10 de marzo de 2024, de https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/CuentasNacionales/cnt65/InformeIIT_2023.pdf

Bertuzzi, T., Leni, G., Bulla, G., & Giorni, P. (2022). Reduction of mycotoxigenic fungi growth and their mycotoxin production by *Bacillus subtilis QST 713*. *Toxins* 2022, *14*(11), 797-806. https://doi.org/10.3390/TOXINS14110797

Borman, A., Linton, C., Miles, S., & Johnson, E. (2008). Molecular identication of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(1), 7–12. https://doi.org/10.1093/JAC/DKM425

Bowman, S., & Free, S. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays, 28*(8), 799–808. https://doi.org/10.1002/BIES.20441

Brandes, A., & Brandl, H. (2011). Detection and differentiation of bacterial spores in a mineral matrix by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrical data treatment. *BMC Biophysics, 4*(1), 4-14. https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-14

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467–483. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.12.031

Cabrera, R., Palafox, S., & Valenzuela, A. (2019). Estrategias para el control del hongo fitopatógeno *Fusarium* en el Sector Agrícola: del Control Químico al Control Biológico. *Frontera Biotecnológica*, *7*(12), 20–26. http://www.revistafronterabiotecnologica.

Calvache, Á., & Filgueira, J. (2017). *Agricultura sostenible del Ecuador*. CIDE. Recuperado el 18 de junio de 2024, de www.cidecuador.com

Camamal, H., Canul, E., Gómez, J., Alamilla, C., Sandoval, J., & Criollo, C. (2018). El Jitomate Rosapa'ak o Riñón, un ecotipo nativo de la península de Yucatán. *ResearchGate*, *22*(64), 63-68. https://www.researchgate.net/publication/321085930_El_Jitomate_Rosapa'ak_o_Rinon_un_ecotipo_nativo_de_la_peninsula_de_Yucatan

Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, *10*(302), 1-19. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00302/BIBTEX

Checalla, J., & Sánchez, M. (2021). Chemical Characterization and *in vitro* Antibacterial Activity of a Peruvian Propolis Ethanolic Extract Against *Streptococcus mutans. Int. J. Odontostomat*, *15*(1), 145–151.https://ijodontostomatology.com/en/articulo/chemical-characterization-and-in-vitro-antibacterial-activity-of-a-peruvian-propolis-ethanolic-extract-against-streptococcus-mutans/

Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from Tomato Roots: Isolation, *In Vitro* Characterization and *In Vivo* Evaluation of Treated Tomatoes (*Solanum lycopersicum L.*). *Microorganisms*, *10*(4), 765. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10040765/S1

Crossley, B., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M., Clement, T., & Toohey, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* *32*(6), 767–775. https://doi.org/10.1177/1040638720905833/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1040638720905833-FIG1.JPEG

Cuello, R., Mendoza, J., & Alcázar, L. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información Tecnológica*, *26*(5), 11–16. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003

De Los Santos, S., Díaz, A., Ávila, M., Martínez, A., Parra, F. I., Lo Giudice, A., Rizzo, C. & Guicciardini, C. (2021). Colmena: A Culture Collection of Native Microorganisms for Harnessing the Agro-Biotechnological Potential in Soils and Contributing to Food Security. *Diversity 2021, 13*(8), 337. https://doi.org/10.3390/D13080337

De Wit, P. (2016). *Cladosporium fulvum* Effectors: Weapons in the Arms Race with Tomato. *Annual Review of Phytopathology, 54*(32), 1–23. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-011516-040249/CITE/REFWORKS

Délices, G., Leyva, O., Mota, C., Núñez, R., Gámez, R., Meza, P., & Serna, R. (2019). Biogeografía del tomate *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme (*Solanaceae*) en su centro de origen (sur de América) y de domesticación (México). *Revista de Biología Tropical*, *67*(4), 1023–1036. https://doi.org/10.15517/RBT.V67I4.33754

Deng, W., Li, X., Ren, G., Bu, Q., Ruan, Y., Feng, Y., & Li, B. (2023). Stability of Purple Corn Anthocyanin Encapsulated by Maltodextrin, and Its Combinations with Gum Arabic and Whey Protein Isolate. *Foods 2023, 12*(12), 2393. https://doi.org/10.3390/FOODS12122393

Dong, W., Liu, H., Ning, Z., Bian, Z., Zeng, L., & Xie, D. (2023). Inoculation with *Bacillus cereus DW019* Modulates Growth, Yield and Rhizospheric Microbial Community of Cherry Tomato. *Agronomy 2023, 13*(6), 1458. https://doi.org/10.3390/AGRONOMY13061458

Errington, J., & Wu, L. (2017). Cell cycle machinery in *Bacillus subtilis*. *Sub-Cellular Biochemistry*, 84, 67–101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53047-5_3/TABLES/2

Esquivel, B., Ochoa, M., & Rutiaga, O. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha, 16*(2)*, 180–192.* http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81343176006

FAO. (2022). *Buenas prácticas de gestión del riesgo fitosanitario | Núcleo de Capacitación en Políticas Públicas* | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 04 de marzo de 2024, de https://www.fao.org/in-action/capacitacion-politicas-publicas/cursos/ver/en/c/1624483/

Fathi, F., Riseh, R., Khodaygan, P., Hosseini, S., & Skorik, Y. (2021). Microencapsulation of a *Pseudomonas Strain (VUPF506)* in Alginate–Whey Protein–Carbon Nanotubes and Next-Generation Sequencing Identification of This Strain. *Polymers 2021*, *13*(23), 4269. https://doi.org/10.3390/POLYM13234269

Franconi, I., & Lupetti, A. (2023). *In Vitro* Susceptibility Tests in the Context of Antifungal Resistance: Beyond Minimum Inhibitory Concentration in *Candida spp. Journal of Fungi 2023*, *9*(12), 1188. https://doi.org/10.3390/JOF9121188

Gayosso, O., López, A., Marroquín, J., Lopéz, K., Hidalgo, D., & Chávez, G. (2021). Vista de Evaluación de la respuesta de diferentes genotipos de tomate a *Fusarium oxysporum* raza 3 | *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 12*(3) 409-420. https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2284

González, Y., Ortega, J., Anducho, M., & Mercado, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma:* Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *25*(1) 1-14. https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2022.520

Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., Desobry, S., Scher, J., & Gaiani, C. (2017). *Lactobacillus rhamnosus GG* encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineering*, 193, 10–19. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2016.08.008

Gullifa, G., Risoluti, R., Mazzoni, C., Barone, L., Papa, E., Battistini, A., Martin Fraguas, R., & Materazzi, S. (2023). Microencapsulation by a Spray Drying Approach to Produce Innovative

Probiotics-Based Products Extending the Shelf-Life in Non-Refrigerated Conditions. *Molecules* 2023, *28*(2), 860. https://doi.org/10.3390/MOLECULES28020860

Hazael, A. (2017). *Descripción botánica de los cultivos tomate, pimentón, cebolla, yuca y papas.* Slideshare.Recuperado el 01 de junio de 2024, de https://es.slideshare.net/slideshow/descripcin-botnica-de-los-cultivos-tomate-pimentn-cebolla-yuca-y-papas/76842355

Hernández, J., Hinojosa, P., Salazar, Á., García, J., Rodríguez, G., & Quiroz, J. (2018). Conservación por microencapsulación de bacterias de uso agrícola: *Azospirillum brasilense*. *Revista Boliviana de Química, 35*(4). https://www.redalyc.org/journal/4263/426357897002/html/

Hernández, R., García, L., Rico, M., Peña, V., & Luna, B. (2022). Encapsulación en perlas de alginato de bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de áreas naturales protegidas. *JÓVENES EN LA CIENCIA,* 16, 1–9. https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3606

Hiruma, J., Nojyo, H., Harada, K., & Kano, R. (2024). Development of treatment strategies by comparing the minimum inhibitory concentrations and minimum fungicidal concentrations of azole drugs in dermatophytes. *The Journal of Dermatology*. https://doi.org/10.1111/1346-8138.17241

Hu, G., & Kurgan, L. (2019). Sequence Similarity Searching. *Current Protocols in Protein Science*, *95*(1), e71. https://doi.org/10.1002/CPPS.71

INEC. (2022a). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.* INEC. Recuperado el 05 de marzo de 2024, de https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZTEyY2NiZDItYjIzYi00ZGQ1LTlkNGEtNDE1OGViM2Q1N2VlIiwidCI6ImYxNThhMmU4LWNhZWMtNDQwNi1iMGFiLWY1ZTI1OWJkYTExMiJ9&pageName=ReportSection

INEC. (2022b). *Información Agroambiental y Tecnificación Agropecuaria*. INEC. Recuperado el 04 de marzo de 2024, de https://www.ecuadorencifras.gob.ec/informacion-agroambiental/

Janda, M., & Abbott, S. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 2761–2764. https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07

Jiang, X., Li, Y., Li, R., Gao, Y., Liu, Z., Yang, H., Li, J., Jiang, J., Zhao, T., & Xu, X. (2022). Transcriptome Analysis of the Cf-13-Mediated Hypersensitive Response of Tomato to *Cladosporium fulvum* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4844. https://doi.org/10.3390/IJMS23094844/S1

Karaaslan, M., Şengün, F., Cansu, Ü., Başyiğit, B., Sağlam, H., & Karaaslan, A. (2021). Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. *Food Chemistry*, 337, 127748. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127748

Karačić, V., Miljaković, D., Marinković, J., Ignjatov, M., Milošević, D., Tamindžić, G., & Ivanović, M. (2024). *Bacillus Species*: Excellent Biocontrol Agents against Tomato Diseases. *Microorganisms, 12*(3)*, 457.* https://doi.org/10.3390/microorganisms12030457

Kebede, B., & Shibeshi, W. (2022). *In vitro* antibacterial and antifungal activities of extracts and fractions of leaves of *Ricinus communis Linn* against selected pathogens. *Veterinary Medicine and Science, 8*(4), 1802. https://doi.org/10.1002/VMS3.772

Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalde, M., Kostić, J., Sunjog, K., Nikolić, B., Knežević, J., & Vuković-Gacić, B. (2016). Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Botanica Serbica*, *40*(1), 29–36. https://doi.org/10.5281/ZENODO.48751

Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., & Coutte, F. (2022). Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms*, *10*(9), 1810. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091810/S1

Lee, J., Kim, S., Jung, H., Koo, B.-K., Han, J. A., & Lee, H.-S. (2023). Exploiting Bacterial Genera as Biocontrol Agents: Mechanisms, Interactions and Applications in Sustainable Agriculture. *Journal of Plant Biology, 66, 485–498.* https://doi.org/10.1007/s12374-023-09404-6

Ley, N., Basilio, J., San Martín, C., Ibarra, R., Angulo, M., & García, R. (2022). Induced biosynthesis of fengycin and surfactin in a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* with oomyceticidal activity on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Argentina de Microbiologia, 54*(3)*, 181–191*. https://doi.org/10.1016/J.RAM.2022.03.002

Liu, Z., Zhou, J., Zeng, Y., & Ouyang, X. (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering, 65*(3), *391–396.* https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.01.038

Londoño, A., Penieres, J., García, C., Carrillo, L., Quintero, M., García, S., Mendoza, M., & Cruz, A. (2013). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Revista Tecnología En Marcha, 21*(1), *pág. 49-55.* https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1338

López, O., Muñoz, A., Carmona, R., Torres, L., & González, M. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión de extracto acuoso de *Calendula officinalis L. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 11*(1), *1–8.* http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Luo, D., Cai, J., Sun, W., Yang, Q., Hu, G., & Wang, T. (2024). Tomato SlWRKY3 Negatively Regulates *Botrytis cinerea* Resistance via TPK1b. *Plants 2024, 13*(12), *1597*. https://doi.org/10.3390/PLANTS13121597

Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., & Wang, W. (2015). Microencapsulation of *Bacillus subtilis B99-2* and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control, 90, 34–41.* https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2015.05.013

Marqués, M., Sarmento, T., de Oliveira, E., Leitãoda, E., & de Jesus, E. (2016). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida sp. Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(1), 159–166. https://doi.org/10.1016/J.BJM.2015.11.009

Martínez, B., Obret, Y., Pérez, S., & Reyes, Y. (2014). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma spp*. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada). *Revista de Protección Vegetal*, *29*(2), 106–111. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Martínez, E., & Pérez, L. (2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales. *Revista de Protección Vegetal, 30, 127–127*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000400104&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Martínez, F., Cervantes, L., Aíl, C., Hernández, L., Sánchez, C., & Rueda, E. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate *(Solanum lycopersicum l.)* en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal, ESJ, 12*(18)*, 232.* https://doi.org/10.19044/ESJ.2016.V12N18P232

Martínez, P., Osorio, H., Estrada, D., López, S., Varela, F., & Torres, C. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma spp. Agro Productividad, 10*(3)*, 9–14.* https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/961

Mercier, J., Kong, M., & Cook, F. (2010). Fungicide Resistance Among *Botrytis cinerea* Isolates from California Strawberry Fields. *Plant Health Progress, 11*(1). https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0806-01-RS

Miclea, R., Suciu, L., & Puia, C. (2012). Estudios *in vitro* sobre la morfología de *Botrytis cinerea pers*. Aislado de plantas de geranio. *ProMediu. ProEnvironment, 3*(5)*, 60–66.* https://journals.usamvcluj.ro/index.php/promediu/article/view/7851

Ministerio de Salud Pública. (2021). *Subsecretaría de vigilancia de la salud pública subsistema de vigilancia sive-alerta efectos tóxicos año 2021*. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Recuperado el 14 de marzo de 2024, de https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Toxicos-y-quimicos-SE-02.pdf

Montiel, L., & Vásquez, A. (2021). *Botrytis cinerea*, agente causal de muerte de retoños de *Vaccinium corymbosum l.* cv. biloxi en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana, 44*(2)*, 261–261.* https://doi.org/10.35196/RFM.2021.2.261

Mooranian, A., Negrulj, R., Chen, N., Al, H., Fang, Z., Mukkur, T., Mikov, M., Golocorbin, S., Fakhoury, M., Watts, G., Matthews, V., Arfuso, F., & Al, H. (2014). Microencapsulation as a novel delivery method for the potential antidiabetic drug, Probucol. *Drug Design, Development and Therapy, 8, 1221.* https://doi.org/10.2147/DDDT.S67349

Moradi, M., Saberi, R., Ranjbar, R., Hassanisaadi, M., Rahdar, A., & Baino, F. (2022). Microencapsulation of *Bacillus velezensis* using alginate-gum polymers enriched with TiO_2 and SiO_2 nanoparticles. *Micromachines 2022, 13*(9)*, 1423*. https://doi.org/10.3390/MI13091423

Parra, R. (2010). Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 63*(2)*, 5669–5684.*

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000200020&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Pastuña, A., López, O., Debut, A., Vaca, A., Rodríguez, E., Vicente, R., Gonzalez, V., González, M., & Tapia, F. (2016). Microencapsulación de aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.)* mediante secado por aspersión. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas, 45*(3), 422–437. https://doi.org/10.15446/RCCIQUIFA.V45N3.62029

Pellegrini, M., Guerra, B., Mitra, D., Hasan, A., Tabassum, B., Hashim, M., & Khan, N. (2024). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Plant Growth Enhancer for Sustainable Agriculture: A Review. *Bacteria 2024, 3*(2)*, 59–75.* https://doi.org/10.3390/BACTERIA3020005

Pérez, I., & Sánchez, K. (2019). Aspectos fisiológicos del género *Cladosporium* desde la perspectiva de sus atributos patogénicos, fitopatogénicos y biodeteriorantes. *Revista cubana de ciencias biológicas, 7*(1), 1–10. http://www.rccb.uh.cu

Pour, M., Saberi, R., Mohammadinejad, R., & Hosseini, A. (2019). Nano-Encapsulation of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Metabolites Using Alginate-Silica Nanoparticles and Carbon Nanotube Improves UCB1 Pistachio Micropropagation. *J. Microbiol. Biotechnol., 29*(7), *1096–1103.* https://doi.org/10.4014/JMB.1903.03022

Quintero, L., Ríos, L., Quintana, D., & León, B. (2019). Sistema Experto para el diagnóstico presuntivo de enfermedades fúngicas en los cultivos Expert System for the presumptive diagnosis of fungal diseases in crops. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas, 13*(1)*, 61–75*. http://rcci.uci.cu

Rafiee, F., Fazeli, M. R., Sepahi, A. A., & Noormohammadi, Z. (2022). Isolation, screening, and identification of native and new *Bacillus subtilis* with strong antifungal compound against *Fusarium oxysporum. In Biocontrol Science 27*(4). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36567116/

Ramirez, H., Herrera, S., & Chavez, R. (2024). Microencapsulation and controlled release of *Bacillus clausii* through a novel non-digestible carbohydrate formulation as revolutionizing probiotic delivery. *Heliyon, 10*(2), *e24923*. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E24923

Ramos, S., Gutiérrez, A., Flores, Y., Lozano, M., Chura, L., Mamani, R., Castañeta, H., & Almanza, G. (2022). Determinación de parámetros de secado por aspersión para la obtención de extracto

seco rico en Saponinas de residuos de escarificado de Quinua. *Revista Boliviana de Química, 39*(4), *1–12*. https://doi.org/10.34098/2078-3949.39.4.1

Ríos, S., & Gil, M. (2021). Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: una revisión. *TecnoLógicas, 24*(51)*, e1836–e1836.* https://doi.org/10.22430/22565337.1836

Riseh, R. S., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Pour, M. M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(20). https://doi.org/10.3390/IJMS222011165

Rodríguez, C., Montaño, B., Velázquez, R., Sánchez, J., García, M., González, R., & Gutiérrez, P. (2021). Estado actual de métodos alternativos, de control de hongos y su efecto en la calidad postcosecha de frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum). TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, 24*. https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2021.388

Rodríguez, R., Zúñiga, J., & Moreno, L. (2020). Agroquímicos y otros peligros contaminantes en la microcuenca Potrero–Caimital, en Guanacaste, Costa Rica: un estudio con productores y pobladores. In *Clima, Agua y Producción Sostenible* (pp. 85–105). eUNA. Recuperado de https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/27034

Saberi, R., Moradi, M., Mohammadinejad, R., & Kumar, V. (2021). Biopolymers for Biological Control of Plant Pathogens: Advances in Microencapsulation of Beneficial Microorganisms. *Polymers 2021, Vol. 13, Page 1938, 13*(12)*,* 1938. https://doi.org/10.3390/POLYM13121938

Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Mohammadi, A. (2019). Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International Journal of Biological Macromolecules, 140, 59–68.* https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.08.133

Shafi, J., Tian, H., & Mingshan, J. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31*(3)*, 446–459.* https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950

Shali, A., Rigi, G., Pornour, M., & Ahmadian, G. (2017). Expression and Secretion of Cyan Fluorescent Protein (CFP) in *B. subtilis* using the Chitinase Promoter from *Bacillus pumilus SG2*. *Iranian Biomedical Journal, 21*(4)*, 240–248*. https://doi.org/10.18869/ACADPUB.IBJ.21.4.240

Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., & Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers, 96*(1), *181–189*. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.03.068

Sun, W., Nguyen, Q. D., Süli, B. K., Alarawi, F., Szécsi, A., Gupta, V. K., Friedrich, L. F., Gere, A., & Bujna, E. (2023). Microencapsulation and Application of Probiotic Bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* 299v Strain. *Microorganisms 2023*, *11*(4), 947. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11040947

Tenberge, K. (2007). Morphology and Cellular Organisation in *Botrytis* Interactions with Plants. *Botrytis: Biology, Pathology and Control, 67–84*. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_5

Torkian, B., Hann, S., Preisner, E., & Norman, S. (2020). BLAST-QC: Automated analysis of BLAST results. *Environmental Microbiomes, 15*(1)*, 1–8*. https://doi.org/10.1186/S40793-020-00361-Y/FIGURES/6

Troussieux, S., Gilgen, A., & Souche, J. L. (2023). Fighting tomato fungal diseases with a biocontrol product based on *Amoeba lysate*. *Plants, 12*(20). https://doi.org/10.3390/plants12203603

Valenzuela, J. O. S. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *CIENCIA Ergo-Sum*, *25*(1), 1-11. https://doi.org/10.30878/CES.V25N1A5

Valenzuela, V., Gálvez, G., Villa, E., Parra, F., Santoyo, G., & de los Santos, S. (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus:* revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 11*(2), *419–432.* https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V11I2.2191

Vázquez, J. (2020). *Botrytis cinerea: características, taxonomía, síntomas, control*. Lifeder. Recuperado el 12 de junio, de https://www.lifeder.com/botrytis-cinerea/

Vidal, N., Argumedo, R., Sánchez, J., Chiquito, R., González, D., & Sánche, G. (2021). Antagonist microorganism: An alternative for the biological control of fungal diseases present in coffee crop *(Coffea arabica L.). ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria, 117*(3), *214–226.* https://doi.org/10.12706/itea.2020.042

Villalobos, S., Parra, F. I., Montoya, A. C., Gómez, L., Aguirre, J., Martínez, E., Arteaga, R., Moreno, J., & Ruvalcaba, J. (2023). A Look at Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Plants 2023, 12*(8), *1668*. https://doi.org/10.3390/PLANTS12081668

Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & Santos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology, 36*(1). https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5

Wang, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., & Wang, A. (2018). A Biocontrol Strain of *Bacillus subtilis WXCDD105* Used to Control Tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum Cooke* and Promote the Growth of Seedlings. *International Journal of Molecular Sciences 2018, 19*(5)*, 1371*. https://doi.org/10.3390/IJMS19051371

Weber, R., & Petridis, A. (2023). Fungicide Resistance in *Botrytis spp*. and Regional Strategies for Its Management in Northern European Strawberry Production. *BioTech 2023, 12*(4)*, 64*. https://doi.org/10.3390/BIOTECH12040064

Wu, Z., Li, X., Liu, X., Dong, J., Fan, D., Xu, X., & He, Y. (2020). Membrane shell permeability of Rs-198 microcapsules and their ability for growth promoting bioactivity compound releasing. *RSC Advances, 10*(2)*, 1159–1171*. https://doi.org/10.1039/C9RA06935F

Yi, Y. J., Yin, Y. N., Yang, Y. A., Liang, Y. Q., Shan, Y. T., Zhang, C. F., Zhang, Y. R., & Liang, Z. P. (2022). Antagonistic activity and mechanism of *Bacillus subtilis xz16-1* suppression of wheat powdery mildew and growth promotion of wheat. *Phytopathology, 112(12), 2476–2485.* https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-22-0118-R

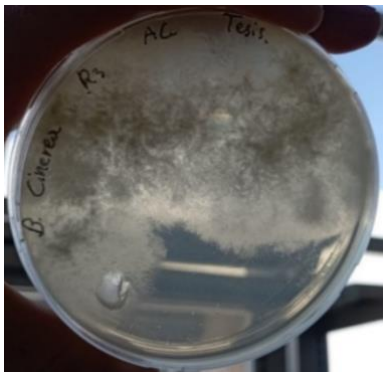
Zdenek, F., Herrmann, S., & Kubat, J. (2004). FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Bacillus subtilis. Microbiological Research, 159*(3)*, 257–262.* https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2004.05.002

ANEXOS

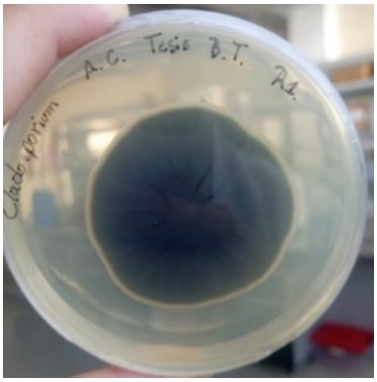
Anexo 1. Activación de cepas



B. subtilis AC01

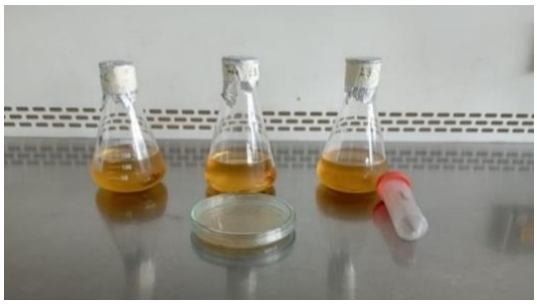


B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001

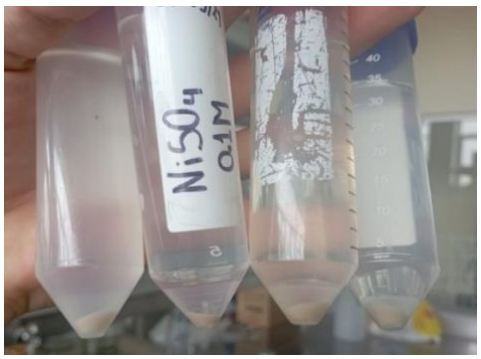


C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10

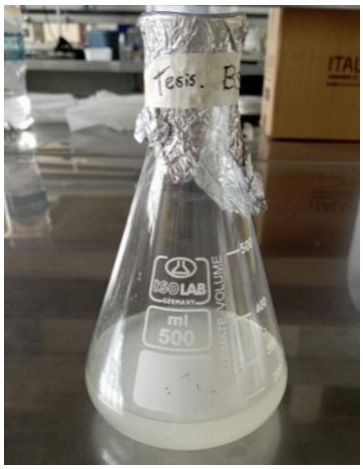
Anexo 2. Preparación de inóculo de *B. subtilis AC01*



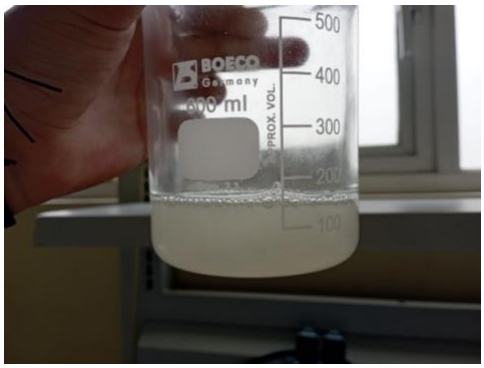
Anexo 3. Centrifugación de células de *B. subtilis AC01*



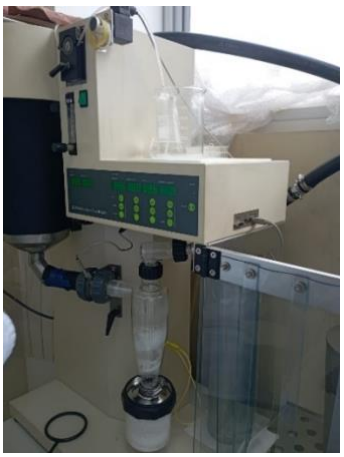
Anexo 4. Resuspención de células de *B. subtilis AC01* en solución salina



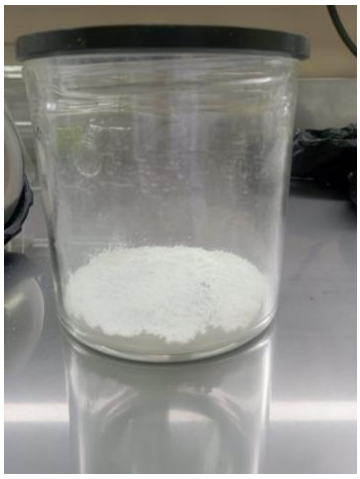
Anexo 5. Proceso de microencapsulación por secado por aspersión



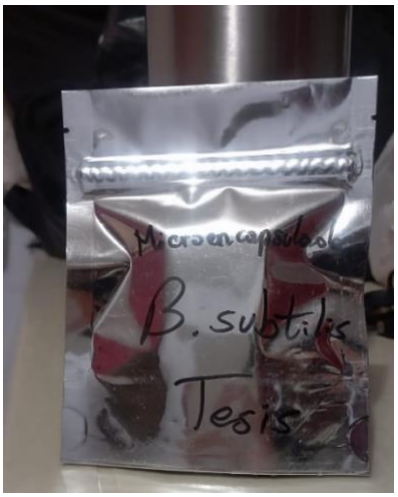
Mezcla de polímeros e ingrediente activo



Microencapsulación por secador por aspersión



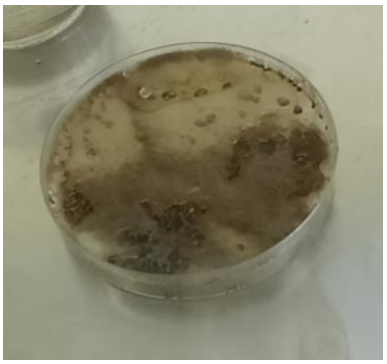
Resultado final de la microencapsulación



Recolección y almacenamiento de microcápsulas

Anexo 6

Lavado de células de hongos fitopatogenos

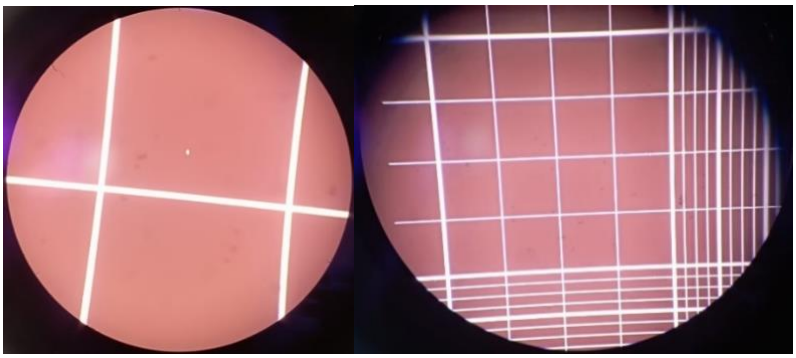


Lavado de células de B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001

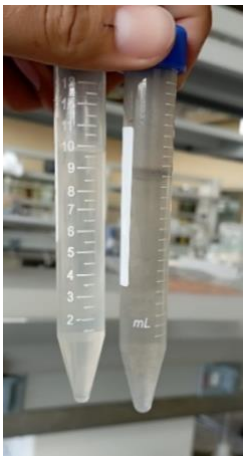


Lavado de células de C. fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10

Anexo 7. Conteo de células en hemocitómetro



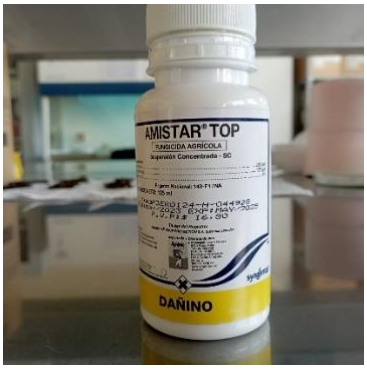
Anexo 8. Células de hongos fitopatógenos resuspendidas en solución salina



Anexo 9. Preparación de soluciones soluciones de microencapsulado a diferentes concentraciones



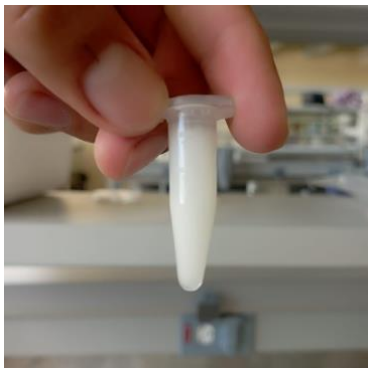
Anexo 10. Prepararación de control positivo con el producto comercial Amistar Top



Producto comercial



Preparación de control positivo



Control positivo

Anexo 11. Herramienta BLAST Online- secuencias significativas de *B. subtilis*

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all *0 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain SRCM100761, complete genome	Bacillus subtilis subsp. subtilis	292	17969	32%	4e-73	97.65%	3988630	CP021889.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain SRCM100757, complete genome	Bacillus subtilis subsp. subtilis	292	17969	32%	4e-73	97.65%	3988649	CP021499.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain SRCM101444, complete genome	Bacillus subtilis subsp. subtilis	292	17969	32%	4e-73	97.65%	3988602	CP021498.1

Anexo 12. Rendimiento de las microcápsulas después del secado por aspersión

Principio activo: *1,54 g*

Contenido de los materiales encapsulantes: *6,16 g*

Maltodextrina: 4,62 g

Goma arábiga: 1,54 g

Agua: 26 g

Rendimiento

$$\%\ rendimiento\ de\ microencapsulado\text{:}\ \frac{peso\ final}{peso\ inicial} * 100$$

$$\%\ rendimiento\ de\ microencapsulado\text{:}\ \frac{8{,}53\ g}{33{,}7\ g} * 100\ \%$$

$$\%\ rendimiento\ de\ microencapsulado\text{:}\ 25{,}31\ \%$$

Anexo 13. Eficiencia de microencapsulación

$$ME = \frac{(A - B)}{A} * 100$$

Donde:

A= concentración bacteriana total en la suspensión.

B= concentración de la bacteria sin microencapsular encontrada en el sobrenadante.

$$ME = \frac{(1x10^5 cel/mL - 1{,}75x10^4 cel/mL)}{1x10^5 cel/mL} * 100$$

$$ME = 82{,}5\ \%$$

Anexo 14. Porcentaje de humedad del microencapsulado

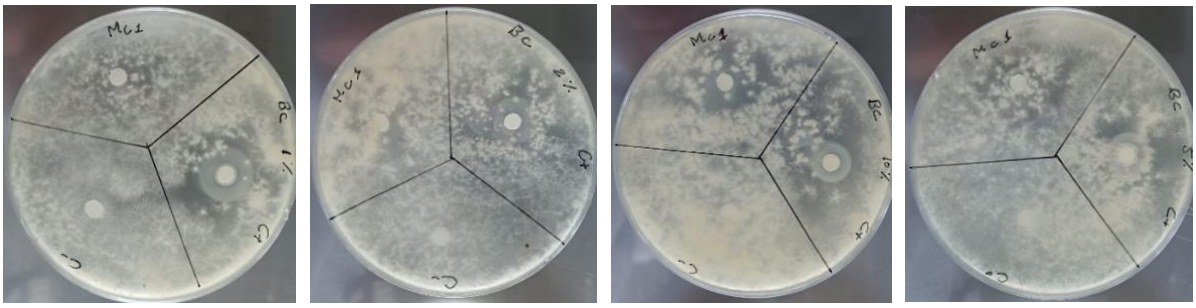


Anexo 15. Medición del diámetro de inhibición para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* y sus respectivos controles

Tratamiento	*Réplica*	*Tratamiento y control*	*Halos de inhibición (mm)*
BC1	*1*	*BC1R1*	*7*
	1	*C+*	*16*
	1	*C-*	*0*
	2	*BC1R2*	*8*
	2	*C+*	*15*
	2	*C-*	*0*
	3	*BC1R3*	*7*
	3	*C+*	*17*
	3	*C-*	*0*
BC2	*1*	*BC2R1*	*8*
	1	*C+*	*14*
	1	*C-*	*0*
	2	*BC2R2*	*8*
	2	*C+*	*15*
	2	*C-*	*0*
	3	*BC2R3*	*7*
	3	*C+*	*14*
	3	*C-*	*0*
BC3	*1*	*BC3R1*	*8*
	1	*C+*	*14*
	1	*C-*	*0*
	2	*BC3R2*	*8*
	2	*C+*	*14*
	2	*C-*	*0*
	3	*BC3R3*	*8*
	3	*C+*	*15*
	3	*C-*	*0*
BC4	*1*	*BC4R1*	*8*
	1	*C+*	*13*
	1	*C-*	*0*
	2	*BC4R2*	*9*

Tratamiento	*Réplica*	*Tratamiento y control*	*Halos de inhibición (mm)*
	2	*C+*	*14*
	2	*C-*	*0*
	3	*BC4R3*	*9*
	3	*C+*	*14*
	3	*C-*	*0*
BC5	*1*	*BC5R1*	*10*
	1	*C+*	*17*
	1	*C-*	*0*
	2	*BC5R2*	*9*
	2	*C+*	*15*
	2	*C-*	*0*
	3	*BC5R3*	*10*
	3	*C+*	*15*
	3	*C-*	*0*

Anexo 16. Tratamientos para *B. cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01*



C1:10 mg/mL *C2:20 mg/mL* *C3: 50 mg/mL* *C4:100 mg/mL*

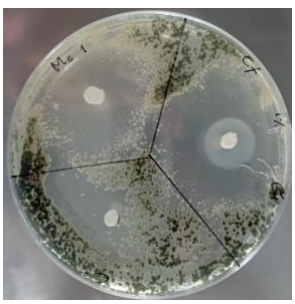
Anexo 17. Medición del diámetro de inhibición para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01* y sus respectivos controles

Tratamiento	*Réplica*	*Tratamiento y control*	*Halos de inhibición (mm)*
	1	*CF1R1*	*23*
	1	*C+*	*34*
	1	*C-*	*0*
CF1	*2*	*CF1R2*	*22*
	2	*C+*	*30*

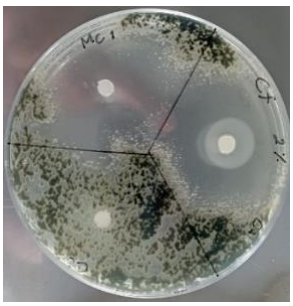
Tratamiento	*Réplica*	*Tratamiento y control*	*Halos de inhibición (mm)*
	2	*C-*	*0*
	3	*CF1R3*	*23*
	3	*C+*	*32*
	3	*C-*	*0*
	1	*CF2R1*	*28*
	1	*C+*	*32*
	1	*C-*	*0*
CF2	*2*	*CF2R2*	*28*
	2	*C+*	*31*
	2	*C-*	*0*
	3	*CF2R3*	*29*
	3	*C+*	*32*
	3	*C-*	*0*
	1	*CF3R1*	*30*
	1	*C+*	*35*
	1	*C-*	*0*
CF3	*2*	*CF3R2*	*32*
	2	*C+*	*32*
	2	*C-*	*0*
	3	*CF3R3*	*30*
	3	*C+*	*34*
	3	*C-*	*0*
	1	*CF4R1*	*35*
	1	*C+*	*40*
	1	*C-*	*0*
CF4	*2*	*CF4R2*	*34*
	2	*C+*	*39*
	2	*C-*	*0*
	3	*CF4R3*	*35*
	3	*C+*	*41*
	3	*C-*	*0*
	1	*CF5R1*	*34*
	1	*C+*	*35*
	1	*C-*	*0*

Tratamiento	*Réplica*	*Tratamiento y control*	*Halos de inhibición (mm)*
CF5	*2*	*CF5R2*	*36*
	2	*C+*	*38*
	2	*C-*	*0*
	3	*CF5R3*	*38*
	3	*C+*	*41*
	3	*C-*	*0*

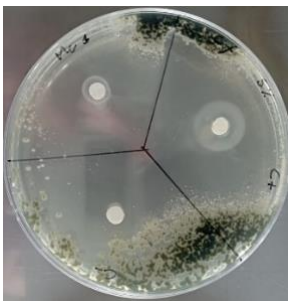
Anexo 18. Tratamientos para *C. fulvum CC-FCAGP-Cf- Epi10* con diferentes concentraciones de microencapsulado de *B. subtilis AC01*



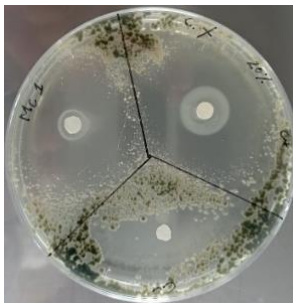
C1:10 mg/mL



C2:20 mg/mL



C3:50 mg/mL



C4:100 mg/mL