



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LOS  
EXTRACTOS CRUDOS DE BIOSURFACTANTE PRODUCIDOS POR  
*Bacillus* spp AISLADOS DE DIFERENTES FUENTES AMBIENTALES  
DEL ECUADOR, A NIVEL DE LABORATORIO”**

**AUTORA: OLMEDO FONSECA, PAOLA CAMILA**

**DIRECTOR: IZQUIERDO ROMERO, ANDRÉS RICARDO PhD.**

**SANGOLQUÍ**

**2019**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE BIOSURFACTANTE PRODUCIDOS POR Bacillus spp AISLADOS DE DIFERENTES FUENTES AMBIENTALES DEL ECUADOR, A NIVEL DE LABORATORIO”* fue realizado por la señorita *Olmedo Fonseca, Paola Camila* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Firma: .....

**Ing. Andrés Izquierdo, PhD**

C.C. 1714479506

Sangolqui. junio del 2019



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, *Olmedo Fonseca, Paola Camila*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “*Evaluación del potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante producidos por Bacillus spp aislados de diferentes fuentes ambientales del Ecuador, a nivel de laboratorio*” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, junio del 2019

Firma:  .....

**Paola Camila Olmedo Fonseca**

C.C.: 1724876147



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, *Olmedo Fonseca, Paola Camila*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “*Evaluación del potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante producidos por Bacillus spp aislados de diferentes fuentes ambientales del Ecuador, a nivel de laboratorio*” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, junio del 2019

Firma: .....

**Paola Camila Olmedo Fonseca**

C.C.: 1724876147

Dedico este trabajo a mis padres, Verónica y Omar, quienes me han brindado todo su amor y confianza. Todos mis logros son para ellos.

*Paola Camila Olmedo Fonseca*

## AGRADECIMIENTO

A mi madre, Verónica, gracias por el ejemplo de lucha y dedicación que siempre me has dado, por apoyarme y amarme incondicionalmente. A mi padre Omar, por los ánimos y consejos, por no dejarme rendir jamás. Gracias a los dos por ser mis pilares y creer en mí.

A mi hermano David por todo el cariño, a pesar de nuestras diferencias, sé que siempre serás mi mejor aliado.

A Thelmo por todas las experiencias vividas, por la felicidad y amor.

A mis amigas, Grace, Andrea, Nathalí, Fernanda y Karla, gracias por todo estos años de amistad y por los que vendrán. Las quiero muchísimo.

Alma Koch y Andrés Izquierdo, quienes me impulsaron y asesoraron en la elaboración de esta investigación. Gracias por todo el apoyo, interés, confianza, dedicación y conocimiento.

A mis compañeras y amigas de Laboratorio Cris, Bere y Denise, gracias por la alegría y tiempo compartido.

*Paola Camila Olmedo Fonseca*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN .....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	ii
AUTORIZACIÓN .....	iii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vi
LISTADO DE FIGURAS .....	ix
LISTADO DE TABLAS.....	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT.....	xv
<b>CÁPITULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1.    Formulación del Problema.....	1
1.2.    Justificación del Problema .....	2
1.3.    Objetivos de la Investigación.....	4
1.3.1.    Objetivo General.....	4
1.3.2.    Objetivos Específicos.....	4
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
2.1. Pesticidas.....	5
2.1.1. Clasificación de los Pesticidas .....	6
2.1.2. Contaminación ambiental producida por pesticidas.....	7

2.2. Biopesticidas .....	10
2.2.1. Clasificación de los Biopesticidas.....	11
2.2.2. Biopesticidas en el Ecuador .....	12
2.2.3. El género <i>Bacillus</i> como biocontrolador.....	13
2.3.1. Aplicaciones de los lipopéptidos producidos por el género <i>Bacillus</i> .....	17
2.3.2. Biosíntesis de los lipopéptidos producidos por el género <i>Bacillus</i> .....	19
2.4. Hongos fitopatógenos de relevancia .....	23
2.4.1. Fitopatología de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
2.4.2. Fitopatología de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	26
2.5 Hipótesis .....	27
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1. Revisión Bibliográfica. ....	28
3.2. Reactivación de las cepas bacterianas.....	28
3.3. Comprobación de la pureza de las cepas bacterianas.....	29
3.4. Tamizaje para la producción de biosurfactante.....	29
3.4.1. Actividad hemolítica microbiana .....	29
3.4.2. Tamizaje molecular.....	30
3.5. Producción del biosurfactante.....	31
3.5.1. Producción de biosurfactante por el método de Mnif et al. (2013).....	31
3.5.2. Producción de biosurfactante por el método de El-Sheshtawy et al. (2015).....	32
3.5.3. Comprobación de la producción de biosurfactante .....	32
3.6. Extracción del biosurfactante.....	32
3.7. Determinación del rendimiento de producción de biosurfactante.....	33
3.8. Evaluación del potencial antifúngico del extracto de biosurfactante <i>in vitro</i> .....	33
3.9. Análisis Estadístico.....	35
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. Reactivación y comprobación de pureza de las cepas .....	37
4.2. Tamizaje para producción de biosurfactantes mediante actividad hemolítica .....	38
4.4. Producción de biosurfactantes .....	43
4.5. Potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante.....	46
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES .....	56
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES .....	58
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA.....	59

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de ISR.....	16
<b>Figura 2.</b> Estructuras de miembros representativos dentro de las tres familias de lipopéptidos sintetizadas por especies de <i>Bacillus</i> .....	17
<b>Figura 3.</b> Operones responsables de la biosíntesis de los lipopéptidos de <i>Bacillus</i> spp.....	21
<b>Figura 4.</b> Corte transversal de tallo de tomate afectado por <i>F. oxysporum</i> con marchitez vascular .....	25
<b>Figura 5.</b> Costra negra del papa generado por <i>R. solani</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Cultivos en Agar de nutriente en caja Petri de: A: UFAB25 ( <i>B. subtilis</i> ), B: UFAB19 ( <i>B. licheniformis</i> ), C: UFAB29 ( <i>B. subtilis</i> ). .....	37
<b>Figura 7.</b> Tinción Gram 1000X. A: UFAB18, B: UFAB19, C: UFAB25, D: UFAB26, E: UFAB28, F: UFAB29, G: UFAB29.1, H: UFAB31.5, I: UFAB37 .....	38
<b>Figura 8.</b> Tamizaje en Agar Sangre para cepas de <i>Bacillus</i> . A: UFAB19, B: UFAB25, C: UFAB26, D: UFAB28, E: UFAB29, F: UFAB29.1, G: UFAB31.5, H: UFAB37, I: UFAB18. Zonas de hemólisis: h <sub>β</sub> .....	39
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen <i>sfp</i> . Cepas positivas UFAB25 y UFAB29 ( <i>B. subtilis</i> ). .....	40
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen <i>srf-AA</i> . Cepas positivas UFAB25 y UFAB29 ( <i>B. subtilis</i> ). .....	41
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen <i>fenB</i> , Cepa positiva UFAB25 ( <i>B. subtilis</i> ). .....	41
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen <i>Lich-AA</i> . Cepas positivas UFAB18, UFAB19, UFAB37 ( <i>B. licheniformis</i> ). .....	42

- Figura 13.** Prueba de dispersión de crudo. En la parte superior: sobrenadante de cultivos en el medio Mm1. Parte inferior: sobrenadante de Mm2. A: UFAB25, B: UFAB29, C: UFAB19. Zona de dispersión: /..... 44
- Figura 14.** Gráfico de barras de los resultados de la prueba de dispersión de crudo. Las distintas letras en los bloques de tratamiento muestran las diferencias significativas... 45
- Figura 15.** Diagrama de caja del rendimiento de producción de biosurfactante crudo por las cepas UFAB19, UFAB25 y UFAB29. .... 46
- Figura 16.** Determinación del potencial antifúngico del biosurfactante por medio del método de difusión en pozo. Parte superior *F.oxysporum*, en la parte inferior *R. solani*. Placas a la izquierda: ensayo con extractos de biosurfactante de UFAB25, placas centrales: UFAB29. Placas a la derecha UFAB19. Los pocillos contienen a: Bs<sub>1</sub>, b: Bs<sub>2</sub>, c: F<sub>OH</sub>-Bs<sub>1</sub>, d: metanol (control). .... 47
- Figura 17.** Gráfico de barras de los resultados inhibición del crecimiento micelial por acción de los biosurfactantes (BS). Gráfica superior *F. oxysporum*, inferior: *R. solani*. Valores p menores a  $\alpha$  (0,05) indican diferentes significativa..... 49

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Pesticidas registrados y comercializados en el Ecuador, plaga y cultivo aplicado</i> .....	5
<b>Tabla 2</b> <i>Clasificación de pesticidas basada en el organismo diana</i> .....	7
<b>Tabla 3</b> <i>Empresas productoras de biopesticidas en el Ecuador</i> .....	12
<b>Tabla 4</b> <i>Listado provisional de cepas de Bacillus reportadas como inductores de resistencia sistémica de plantas</i> .....	14
<b>Tabla 5</b> <i>Estructura de las familias de lipopéptidos sintetizadas por el género Bacillus</i> .....	17
<b>Tabla 6</b> <i>Lipopéptidos del género Bacillus más estudiados, aplicaciones y actividades</i> .....	18
<b>Tabla 7</b> <i>Fuente de aislamiento de las cepas de Bacillus spp.</i> .....	29
<b>Tabla 8</b> <i>Niveles de hemólisis e interpretación de la actividad hemolítica microbiana</i> .....	29
<b>Tabla 9</b> <i>Cebadores empleados en el tamizaje molecular</i> .....	30
<b>Tabla 10</b> <i>Soluciones metanólicas de los extractos crudos de biosurfactante</i> .....	34
<b>Tabla 11</b> <i>Análisis estadístico empleada para cada uno de los ensayos</i> .....	35
<b>Tabla 12</b> <i>Diseño multifactorial para la evaluación del potencial antifúngico in vitro contra F. oxysporum y R. solani</i> .....	36
<b>Tabla 13</b> <i>Resultados de la actividad hemolítica como tamizaje para cepas productoras</i> .....	38
<b>Tabla 14</b> <i>Resultados de la comparación realizada en Blast de la secuenciación de los productos de PCR</i> .....	42
<b>Tabla 15</b> <i>Valores promedio de los diámetros de las zonas de desplazamiento</i> .....	43
<b>Tabla 16</b> <i>Porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos por acción de los diferentes extractos de biosurfactante</i> .....	48

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b>PCBs</b>	Bifenilos policlorados
<b>DDT</b>	Dicloro difenil tricloroetano
<b>BS</b>	Biosurfactante
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>Mm2</b>	Medio mineral 2
<b>Mm1</b>	Medio mineral 1
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>ng</b>	nanogramos
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>mg</b>	miligramo
<b>g</b>	Gramo
<b>L</b>	Litro
<b>mL</b>	Mililitros
<b>µg</b>	Microgramos
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

**ATCC** American Type Culture Collection

**ANOVA** Análisis de varianza

**nm** Nanómetros

**d** días

**min** minutos

**h** horas

**h<sub>β</sub>** zona de hemólisis completa

**α** nivel de significancia

## RESUMEN

El uso indiscriminado de pesticidas ha generado impactos negativos en la salud humana y en el ambiente, llegando a eliminar predadores benéficos e inducir resistencias en organismos fitopatógenos. En este contexto, existe la necesidad de desarrollar métodos y tecnologías amigables con el ambiente para combatir plagas y cuidar los cultivos agrícolas. El uso de los biosurfactantes producidos por el género bacteriano *Bacillus* representa una alternativa viable frente a los compuestos químicos. El trabajo tiene como finalidad evaluar el potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante, mediante la técnica de difusión en pozo, producidos por tres cepas de *Bacillus* seleccionadas previamente por tamizaje molecular. Se determinó que el extracto de biosurfactante producido por la cepa UFAB25 (*B. subtilis*), positiva para genes involucrados en la biosíntesis de surfactina y fengicina, inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* ( $43,6\% \pm 13$ ) y *Rizhoctonia solani* ( $34,47\% \pm 2$ ). No se observó inhibición por las cepas UFAB29 y UFAB19 de *B. lichemiformis*, positivas para genes asociados a la producción de surfactina y lichenisina, respectivamente. La cepa UFAB25 de *B. subtilis* presentó el mayor rendimiento promedio de producción con 515,33 mg/L en el medio mineral descrito por Mnif et al. (2013). Por lo tanto, sería posible utilizar a futuro a la cepa UFAB25 y sus lipopéptidos como biopesticidas.

### PALABRAS CLAVE:

- LIPOPÉPTIDOS
- INHIBICIÓN MICELIAL
- BIOPESTICIDAS

## ABSTRACT

The indiscriminate use of pesticides has generated negative impacts on human health and the environment, leading to the elimination of beneficial predators and inducing resistances in phytopathogens organisms. In this context, development of friendly environmental technologies is needed in order to take care of crops. The use of the *Bacillus* genus and its biosurfactants represent a viable alternative to the chemical compounds currently used. The purpose of this work is to evaluate the antifungal potential of crude biosurfactant extracts produced by three strains of the *Bacillus* genus, using well diffusion technique. Previously, molecular screening was employed as a selection criterion from nine strains. It was determined that the biosurfactant extract produced from the strain UFAB25 (*B. subtilis*), positive in molecular screening for genes involved in the biosynthesis of surfactin and fengycin, succeeded in inhibiting the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Rizhoctonia solani* with a percentage of  $43.6 \pm 13$  and  $34.47 \pm 2\%$ . No inhibition of phytopathogens was observed by the biosurfactats produced by strains UFAB29 (*B. subtilis*) and UFAB19 (*B. lichemiformis*), positive for genes associated with the production of surfactin and lichenysin respectively. Strain UFAB25 showed the highest average production yield with 515.33 mg / L in the mineral medium described by Mnif et al. (2013). Therefore, it is possible to say that the strain UFAB25 (*B. subtilis*) and its lipopeptides could be used in the future as possible biopesticides.

### KEY WORDS:

- LIPOPEPTIDES
- MYCELIAL INHIBITION
- BIOPESTICIDE



## CÁPITULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del Problema

De acuerdo con Aspelin (1997) en todo el mundo se emplea cerca de 2,6 millones de toneladas métricas anuales de pesticidas, el 85% corresponde a uso agrícola, con mayor incremento en países subdesarrollados. A medida que pasa el tiempo, la cantidad de pesticida utilizado por acre de suelo aumenta, los agricultores optan por productos más fuertes y el uso mixto de agroquímicos. En un principio, el uso de pesticidas resultó efectivo para reducir la presencia de plagas en los cultivos e incrementar la productividad; sin embargo, con el tiempo las plagas desarrollan resistencias generando el incremento de dosis y su continua aplicación, perjudicando al ambiente y a la salud humana, así como a la producción agrícola (Wilson & Clem, 2001).

Estudios han demostrado que menos del 0.3% de los pesticidas empleados llegan a la planta diana, el resto contamina suelo y agua, afectando a la biota. El uso de agroquímicos no solo afecta el área donde circulan, sino también a la salud humana (Torres & Capote, 2004; Van der Werf, 1996).

Una de las principales actividades económicas del Ecuador es la agricultura, por eso el uso indiscriminado de agroquímicos como plaguicidas, fungicidas e insecticidas para mantener una alta productividad de los cultivos se han convertido en un problema latente. De acuerdo con el Banco Central, en el año 2016, se invirtió más de 117000 millones de dólares en importaciones de fungicidas (Hidalgo, 2017), adquiridos y utilizados sin análisis previos de los requerimientos de cultivos y suelos (Cadena, 2007).

Estudios realizados por Cáceres et al. (2002) señalan el potencial impacto sobre la acuicultura y la salud del ecosistema de dos fungicidas de contacto utilizados en los sistemas de

producción de banano en Ecuador. En el estudio se mostró la absorción alta y variada de clorotalonil, fenamifos y dos de sus metabolitos en suelos superficiales de la cuenca del río Guayas. Se han reportado efectos tóxicos de los cuatro químicos analizados sobre mamíferos, peces y otras especies acuáticas.

Actualmente se busca emplear tecnologías amigables con el ambiente, fomentando una agricultura sostenible basada en recursos naturales y renovables, para enfrentar la continua degradación y contaminación del medio ambiente por el uso incorrecto de los agroquímicos (Celis et al., 2008).

## **1.2. Justificación del Problema**

Se han documentado consecuencias negativas por el uso excesivo de agroquímicos como; daño y disminución de la fertilidad de tierras agrícolas y contaminación de fuentes de agua, fauna y flora, afección a la salud humana, tanto a corto como a largo plazo. A pesar del impacto y alto costo de los pesticidas, los agricultores continúan usándolos (Wilson & Clem, 2001).

Uno de los principales inconvenientes es la aparición de resistencias. Desde 1970 se ha documentado el abandono de tierra agrícola debido a la ineficacia de los pesticidas y la falta de un método para proteger los cultivos. El aumento en el uso de pesticidas ha generado un incremento en la virulencia de muchas especies de plagas debido a la destrucción involuntaria de sus predadores naturales en el equilibrio de los ecosistemas (Wilson & Clem, 2001; Litsinger, 1989). A causa de los problemas asociados con el uso de pesticidas, resulta de gran interés y discusión la búsqueda de nuevas tecnologías para el desarrollo de una agricultura sostenible y amigable con el ambiente.

Entre las alternativas destaca el estudio y desarrollo de biopesticidas y biocontroladores (Borriss, 2011).

Se ha documentado la capacidad controladora de plagas del género *Bacillus* mediante la producción de metabolitos en la supresión de varias especies fitopatógenas. Los biosurfactantes lipopeptídicos activos de membrana poseen un alto potencial microbicida (Ariza & Sánchez, 2012), activos en condiciones extremas de pH, salinidad y altas temperaturas (De la Rosa et al., 2014).

Las diferentes cepas de *Bacillus* sintetizan metabolitos secundarios a nivel de laboratorio al ser sometidas a un estrés nutricional (Perez et al., 2017). *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* (Tendulkar et al., 2007) y *B. thuringiensis* (Kim et al., 2004), han sido reportadas como productoras de biosurfactantes con actividad fungicida. El presente estudio se enfoca en evaluar el potencial antifúngico de biosurfactantes, a nivel de laboratorio, producidos por cepas nativas de *Bacillus*, aisladas en el proyecto PIC 2015 002: “Análisis y caracterización microbiológica y molecular de la comunidad microbiana en fuentes geotermales del Ecuador”, financiado por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Las cepas del género *Bacillus* fueron obtenidas tanto de fuentes geotermales como de suelos contaminados con hidrocarburos pesados.

### **1.3. Objetivos de la Investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar el potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante producido por diferentes cepas nativas del género *Bacillus*.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Realizar un tamizaje molecular para genes involucrados en la producción de surfactina y fengicina en diferentes cepas nativas del género *Bacillus*.
- Producir biosurfactante mediante el cultivo de *Bacillus* spp, positivos en el tamizaje molecular para producción de surfactina y fengicina, en medio mineral optimizado.
- Extraer el biosurfactante producido por miembros del género *Bacillus* a nivel de laboratorio.
- Llevar a cabo pruebas *in vitro* con el biosurfactante extraído, empleando como organismos de prueba dos hongos fitopatógenos.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Pesticidas

Los pesticidas o plaguicidas son cualquier sustancia química utilizada para controlar o destruir un organismo no deseado, es decir, una plaga, incluidos microorganismos, plantas, animales e insectos perjudiciales para los procesos de producción y comercialización agrícola (Trujillo, 2006).

La FAO atribuye el término plaguicida a las sustancias empleadas como reguladores de crecimiento de las plantas, desecantes, agentes para generar la caída de hojas o evitar el desprendimiento prematuro del fruto y compuestos destinados a la protección del producto agrícola durante los procesos de almacenamiento y transporte; sin embargo, el término excluye a los fertilizantes (López, Obiols, & Subás, 1998).

La Agencia Ecuatoriana de regulación y control fito y zoonosanitario Agrocalidad, reportó más de 2900 pesticidas registrados en el país (Agrocalidad, 2017). También informó sobre la prohibición y restricción de 47 plaguicidas, sus formulaciones y mezclas (Agrocalidad, 2018). En la Tabla 1 se muestran algunos de los productos registrados y comercializados en el país.

**Tabla 1**

*Pesticidas registrados y comercializados en el Ecuador, plaga y cultivo aplicado*

Nombre Comercial	Tipo de pesticida	Composición	Uso Autorizado Plaga/ Cultivo
Alto 100 Ls	Fungicida	Cyproconazole 100 g/L	<i>Oidium</i> sp. / Rosas y maíz
Topsim M 50 Sc Thiofin 50 Sc	Fungicida	Thiophanate Methyl 500 g/L	<i>Botrytis cinerea</i> / Rosa y tomate
Siganex Delcut	Fungicida	Pyrimethanil 600 g/L	<i>Fusarium oxysporum</i> / Musa y banano

**CONTINUA**

Custom	Fungicida	Propiconazol 250 g/L	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> / Banano
Limber 500	Fungicida	Iprodione 500 g/Kg	<i>Helminthosporium</i> sp/ Arroz
Hidrocob	Fungicida	Hidroxido de Cobre 770 g/Kg	<i>Phytophthora infestans</i> / Tomate
Polyoxin 10% Pm	Fungicida	Polyoxins 100 g/Kg	<i>Alternaria solani</i> / Tomate <i>Oidium</i> sp / Rosa
Majestic	Fungicida	Mancozeb 800 g/Kg	<i>Phytophthora infestans</i> / Papa
Acefato 75 Sp / Olate 75	Insecticida	Acephate 750 g/Kg	<i>Tuta absoluta</i> / Tomate
Zendo	Insecticida	Chlorpyrifos 400 g/L	<i>Spodoptera frugiperda</i> / Maíz
Corridabul	Insecticida	Diflubenzuron 480 g/L	<i>Premnotrypes vorax</i> / Papa
Wipe Down 757	Herbicida	Glyphosate 757 g/Kg + Glyphosate Ammonium 757 g/Kg	<i>Cyperus rotundus</i> / Palma africana
Hervax 3	Herbicida	Paraquat 240 g/L	<i>Amaranthus hybridus</i> / Banano, avena sativa y papa
Status	Herbicida	Cyhalofop-Butyl 180 g/L	<i>Eleusine indica</i> / Arroz

Fuente: (Agrocalidad, 2017)

### 2.1.1. Clasificación de los Pesticidas

Los pesticidas incluyen a varias clases de insecticidas, herbicidas, fungicidas y químicos de jardín, entre otros. Se tratan de compuestos sintéticos xenobióticos formulados por el hombre. Actualmente, existen tres métodos de clasificación basados en: el modo de entrada, composición química y por la función del pesticida o el organismo que controla o mata (Yadav & Devi, 2017).

La clasificación en base al modo de entrada incluye pesticidas sistémicos, de contacto, fumigantes y repelentes. Mientras que en la categorización dado por la función del pesticida la nomenclatura se refiere al organismo diana con el sufijo “cida” (muerte) según la Tabla 2 (Yadav & Devi, 2017).

**Tabla 2**  
*Clasificación de pesticidas basada en el organismo diana*

<b>Tipo de Pesticida</b>	<b>Plaga diana/Función</b>	<b>Ejemplo</b>
Insecticidas	Combate insectos y otros artrópodos.	Aldicarb
Fungicidas	Ataca hongos, incluidos mohos y roya.	Azoxistrobina
Bactericidas	Actúa contra bacterias.	Complejos de cobre
Herbicidas	Mata malezas y plantas indeseables.	Atrazina
Acaricida	Mata ácaros que se alimentan de plantas o animales	Bifenazato
Larvicida	Inhibe el crecimiento de larvas	Metopreno
Ovicidas	Inhibe el crecimiento de huevos de insectos y ácaros	Benzoxazina
Molusquicidas	Inhibe o mata moluscos (caracoles)	Metaldehído
Nematicida	Actúa contra nematodos, parásitos de la planta	Aldicarb

Modificado de: (Yadav & Devi, 2017)

### **2.1.2. Contaminación ambiental producida por pesticidas**

Se define un proceso de contaminación como una alteración en el medio, dada por el aumento de materia orgánica o inorgánica en un sistema, generando una acumulación visible y un desequilibrio en las condiciones del ambiente que puede afectar a los organismos vivos presentes. La contaminación también depende de la toxicidad y el tiempo de permanencia del contaminante; por ejemplo, los compuestos xenobióticos, con actividad biocida ya que perjudican a todos los organismos vivos, incluso pueden incorporarse en las cadenas tróficas acumulándose en los tejidos (Castelló Orvay, 1993).

En la década de los 40, se empiezan a emplear los primeros pesticidas sintéticos (DDT y PCBs) para aumentar la productividad de los cultivos; sin embargo, en los 60 se reportan los primeros efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana (Van der Werf, 1996).

Solo un 0.3% del pesticida llega al organismo diana, el porcentaje restante se convierte en contaminante, del suelo, agua y otros organismos (Torres & Capote, 2004; Van der Werf, 1996), generando efectos secundarios indeseables a nivel de especies, o incluso alterando comunidades y ecosistemas en conjunto (Van der Werf, 1996).

El impacto de los pesticidas sobre el ambiente depende del nivel de exposición, grado de dispersión y concentración en el medio, así como de sus propiedades toxicológicas (Emans, Beek, & Linders, 1992).

En el Ecuador, el uso de pesticidas se ha incrementado de forma notable, en especial en las zonas agrícolas de la costa y el oriente. La aplicación de fungicidas e insecticidas en los monocultivos se da sin ningún tipo de precaución, ya que los agricultores desconocen los efectos de su uso indiscriminado sobre los ecosistemas y fertilidad de los suelos (Da Ros, 1995).

#### **2.1.2.1. Impacto de los pesticidas en la salud Humana.**

Los pesticidas pueden ingresar al cuerpo humano por inhalación de aire contaminado, polvo y vapores; por vía oral al consumir alimentos y agua contaminados; así como por exposición cutánea directa (Sacramento, 2008). Al ser utilizados sobre alimentos, como frutas y verduras, se dispersan por el suelo y fuentes de agua para el consumo humano. La toxicidad, la dosis, la ruta (oral, dérmica e inhalación) y tiempo de exposición determinan el grado de impacto en la salud humana y puede ser aguda o crónica (Yadav & Devi, 2017), cuando es generada por una sola exposición a cualquier vía de entrada durante la aplicación y el envenenamiento intencional o no intencional se denomina "toxicidad aguda" (Dawson et al., 2010). Se han reportado varios síntomas, como dolores de cabeza y corporales, erupciones cutáneas, falta de concentración, náuseas, mareos,



problemas de visión, calambres, ataques de pánico y, en casos graves, coma y muerte (Yadav & Devi, 2017).

La toxicidad a partir de pequeñas dosis repetidas durante un período de tiempo prolongado se denomina "Toxicidad crónica". Los efectos crónicos sospechosos de la exposición a ciertos pesticidas incluyen defectos de nacimiento, tumores benignos o malignos, cambios genéticos, trastornos nerviosos y alteración endócrina, entre otros (Yadav & Devi, 2017). Estudios realizados en Ecuador muestran los alimentos como fuente de contaminación para la población, no solo de carácter bacteriano y parasitario, sino también químico, debido a su consumo con trazas de pesticidas; se han reportado intoxicaciones por carbofuran y metamidofos (Cadena, 2007; Yanggen et al., 2003; Da Ros, 1995).

#### **2.1.2.2. Impacto de los pesticidas en el medio ambiente**

Los pesticidas llegan al ambiente por las descargas agrícolas y de la comunidad en general. Resulta imposible delimitar el área afectada, ya que se dispersan por el aire y se absorben en el suelo, llegando a aguas subterráneas al filtrarse, eventualmente contaminando un área mucho más grande. Los efectos pueden producir daños leves del ecosistema hasta la pérdida de diversidad de especies (Tiryak & Temur, 2010).

El empleo de una agricultura intensiva, con altas cantidades de pesticidas y fertilizantes, ha generado una pérdida en la biodiversidad de los campos agrícolas (Geiger et al., 2010), en efecto, se ha reportado la alteración notable de la diversidad microbiana, llegando a afectar la fertilidad del suelo (Johnsen et al., 2001).

La mayoría de los pesticidas perjudican a organismos no objetivo como lombrices de tierra, depredadores naturales y polinizadores (Ware, 1980). Desafortunadamente, los depredadores naturales de plaga son los más susceptibles a los insecticidas. Su destrucción puede exacerbar los problemas de plagas por la necesidad de más pesticidas (Yadav & Devi, 2017; Wilson & Clem, 2001).

Además de los daños causados al suelo agrícola y al medio ambiente, los pesticidas tienen un alto impacto en la vida acuática, ya que presentan una toxicidad alta para los peces, incluso en una tasa normal de aplicación. También pueden generar la disminución de insectos y otros invertebrados, así como la destrucción de plantas acuáticas y la consiguiente reducción de los niveles de oxígeno disuelto en agua interrumpiendo la dinámica de las redes alimentarias del ecosistema. (Wilson & Clem, 2001).

## **2.2. Biopesticidas**

Los biopesticidas son agentes o sustancias de origen biológico, procedentes de plantas, microorganismos o insectos, usados para reprimir o eliminar las infestaciones de algún patógeno o plantas indeseables en un cultivo agrícola de interés. Los pesticidas biológicos son virus, bacterias, hongos, metabolitos secundarios, extractos crudos de una planta o de un microorganismo (Yadav & Devi, 2017; Manahan, 2007; Sukhwani, 1995).

La principal ventaja de estos compuestos naturales es la alta especificidad para combatir o repeler un determinado organismo, actuando solo contra la plaga objetivo y los organismos vinculados. Por otro lado, los pesticidas químicos suelen tener un amplio rango de afectación sobre un gran grupo de organismos no objetivo. Los biopesticidas suelen ser ecológicos, ya que son

menos tóxicos, se descomponen fácilmente y se requieren en pequeñas cantidades (Yadav & Devi, 2017).

### **2.2.1. Clasificación de los Biopesticidas.**

Los biopesticidas suelen clasificarse en tres grupos de acuerdo a su fuente de origen (Yadav & Devi, 2017) como se explica a continuación:

#### **2.2.1.1. Biopesticidas Microbianos.**

Los microorganismos como bacterias, hongos o protozoarios que matan insectos por la liberación de toxinas o por infección constituyen la sustancia activa en los biopesticidas. Un ejemplo es la toxina bacteriana producida por *Bacillus thuringiensis* y la bacteria viva *Bacillus sphaericus*. La mayoría de los pesticidas microbianos son más selectivos que los bioquímicos (Yadav & Devi, 2017).

#### **2.2.1.2. Protectores Incorporados a la planta.**

Los protectores de plantas son compuestos producidos por las plantas de forma natural. También se incluye la producción de biopesticidas en plantas modificadas a través de la ingeniería genética (Yadav & Devi, 2017).

#### **2.2.1.3. Biopesticidas Bioquímicos**

Los biopesticidas bioquímicos incluyen a compuestos no tóxicos para controlar plagas. Por ejemplo, las feromonas sexuales de insectos actúan interfiriendo en el apareamiento y reproducción de la plaga, así como los extractos de plantas aromáticas atraen a las plagas hacia las trampas para insectos (Yadav & Devi, 2017).

### 2.2.2. Biopesticidas en el Ecuador

En el 2014, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) realizó una fuerte inversión en la infraestructura de 13 laboratorios satélites en 12 provincias del país, para el desarrollo de biocontroladores e insumos. En las instalaciones se produce Trico-Fert, una solución a base de cepas de *Trichoderma* para el crecimiento robusto de plantas y evitación de algunas enfermedades, como la pudrición en la cebolla colorada (El Telégrafo, 2016). El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ejecutó el proyecto: “Implementación del Control Biológico de Plagas” cuyo objetivo fue la generación de tecnología empleando organismos benéficos, como *Bauveria* sp, para combatir al gusano blanco de la papa (MAGAP, 2013).

En el Vademécum Florícola 9na edición consta cerca de 70 productos de control biológico (Hidalgo, 2017). La mayoría de empresas ofertantes de biopesticidas en el país se dedican a su distribución. La Tabla 3 muestra algunas de las empresas dedicadas a la formulación de biocontroladores y pesticidas naturales en el Ecuador.

**Tabla 3**  
*Empresas productoras de biopesticidas en el Ecuador*

<b>Empresas</b>	<b>Oficinas</b>	<b>Actividad</b>
GreenTech Naturally Organic	Guayaquil	Producción y distribución
Fumieco	Guayaquil/ Quito	Prestación de servicios
Organic Farm Bioelixir	Quito	Producción y distribución
Biocontrol science	Quito	Producción
Koppert Ecuador	Quito	Producción y distribución
Agrodiagnostic	Quito	Producción y distribución
Agromikroben	Riobamba	Producción y distribución
El Agro	Riobamba	Producción y distribución
Biotecdor	Guayaquil	Producción y distribución

\*Elaborado por la autora

Los productores agrícolas grandes han optado por incorporar laboratorios para elaborar compuestos biológicos que permitan mejorar y proteger la producción de los cultivos, por ejemplo: Hilsa Investments, quienes desde hace años fabrican sus propios bioinsumos. En el país, extractos de ruda, arrayan, *Verticillium lecani* y *Beauveria bassiana*, se emplean como biocontroladores de trips y pulgones en rosas. La implementación de estas formulaciones ayuda a disminuir considerablemente el uso pesticida sintéticos (Hidalgo, 2017).

### **2.2.3. El género *Bacillus* como biocontrolador.**

Los miembros del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas, formadoras de endosporas, ampliamente empleadas como agentes biocontroladores. Entre los mecanismos usados por *Bacillus* spp para lograr un efecto antagónico sobre los organismos patógenos figuran: competir por el nicho ecológico y nutrientes disponibles, secretar sustancias tóxicas, como enzimas extracelulares líticas y, finalmente, estimular las capacidades defensivas de la planta huésped (Ongena et al., 2005).

*Bacillus* spp son considerados como fábricas microbiológicas por producir una vasta cantidad de moléculas activas con potencial inhibitorio contra fitopatógenos, tales como kanosamina o zwittermicina A por *B. cereus* (Ogena & Jacques, 2008), o el empleo de cristales de *B. thuringiensis*, proteínas tóxicas para las especies de *Lepidoptera*, *Coleoptera* y *Diptera* (Ben-Dov et al., 1997). Entre el 4 y 5% del genoma de *B. subtilis* se dedica a la síntesis de antibióticos, mientras que el 9 % del genoma de *B. amyloliquefaciens* está destinado a la producción de metabolitos secundarios que suprimen microbios y nemátodos dañinos (Chowdhury et al., 2015).

La capacidad del género *Bacillus* de formar endosporas lo hace aún más atractivo para el desarrollo de biopesticidas, porque permite la formulación de productos estables, debido a su alta resistencia a condiciones de sequedad (Ogena & Jacques, 2008).

Las plantas han perfeccionado varios mecanismos de defensa inducible contra ataques de patógenos. La resistencia sistémica adquirida (SAR) se da cuando una primera infección por un patógeno necrotizante (hongos y bacterias) desencadena una reacción de autodefensa provocando que el huésped sea menos susceptible a una infección posterior en los tejidos distales. Por otra parte, la planta también puede presentar una resistencia sistémica inducida (ISR) generada por algunas rizobacterias no patógenas, entre ellas bacterias del género *Bacillus*, que le confieren resistencia a la entrada de patógenos adicionales. El número de bacterias identificadas como inductores de ISR ha crecido rápidamente en los últimos 15 años, incluyendo a bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas* y *Serratia*, así como bacterias Gram-positivas principalmente al género *Bacillus*. En la Tabla 4 se muestran las cepas y los patosistemas (subsistema hospedero - patógeno) sobre los cuales actúan (Ogena & Jacques, 2008; Ongena et al., 2005).

**Tabla 4**

*Listado provisional de cepas de Bacillus reportadas como inductores de resistencia sistémica de plantas*

Espece, cepa	Patosistema
<i>B. subtilis</i> sp	Algodón/ <i>Meloidogyne</i> (nematodo)
GBO3	Pepino/ <i>Erwinia</i> (bacteria)
IN937b	Tomate/ TMV (Tomato mottle virus)
S499	Pepino/ <i>Colletotrichum</i> ; Tomate/ <i>Pythium</i> ; Frejol/ <i>Botrytis</i>
FZB-G	Tomate/ <i>Fusarium</i>
BacB	Remolacha/ <i>Cercospora</i>
<i>B. pumilus</i> SE34	Tabaco/ <i>Peronospora</i> ; Pepino/escarabajos; Tomate/ <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , CMV, TMV
T4	Tabaco/ <i>Pseudomona</i>
INR-7	Pepino/escarabajos
203-6	Remolacha/ <i>Cercospora</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i> IN937	Tomate/ CMV, TMV
EXTN-1	Tabaco/PMV (Pepper mild mottle virus); Pepino/ <i>Colletotrichum</i>
<i>B. thuringiensis</i> Berliner	Café/ <i>Hemileia</i>
<i>B. mycoides</i> BacJ	Remolacha / <i>Cercospora</i>
<i>B. pasteurii</i> C-9	Tabaco/ <i>Peronospora</i> ; Pepino/escarabajos; Tomate/ <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , CMV, TMV

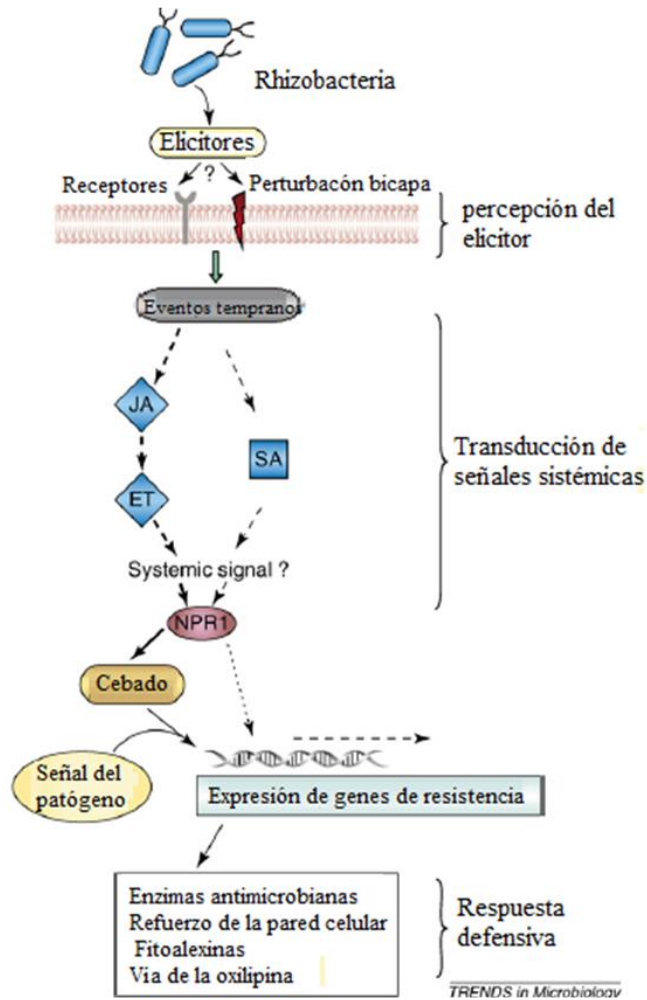
**CONTINUA**

<i>B. sphaericus</i> B43	Papa/nematodos
<i>B. cereus</i> B1	Trébol blanco / nematodos

---

Fuente: (Ogena & Jacques, 2008)

La Figura 1 muestra el esquema general de ISR. La vía de transducción de señales en la mayoría de los casos está controlada por la sensibilización secuencial del ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) en el sitio de aplicación del agente inductor. La ISR mediada por rizobacterias requiere de la proteína reguladora positiva NPR1 activada después de los eventos de señalización sistémica tras la percepción de ET. Esto resulta en un efecto de cebado, es decir, que la aparición del fenómeno no suele ir acompañada de una estimulación transcripcional directa de los genes relacionados con la defensa en el reconocimiento de las rizobacterias no patógenas, sino que la capacidad de resistencia del huésped aumenta una vez producido el proceso de infección por un patógeno. Alternativamente, algunas rizobacterias no patógenas desencadenan una vía de señalización dependiente de ácido salicílico (SA) conducente a un estado de resistencia inducida similar al SAR dependiente de patógenos (Ogena & Jacques, 2008).



**Figura 1.** Esquema general de ISR.

Fuente: (Ogena & Jacques, 2008)

### 2.3. Biosurfactantes lipopeptídicos del género *Bacillus*.

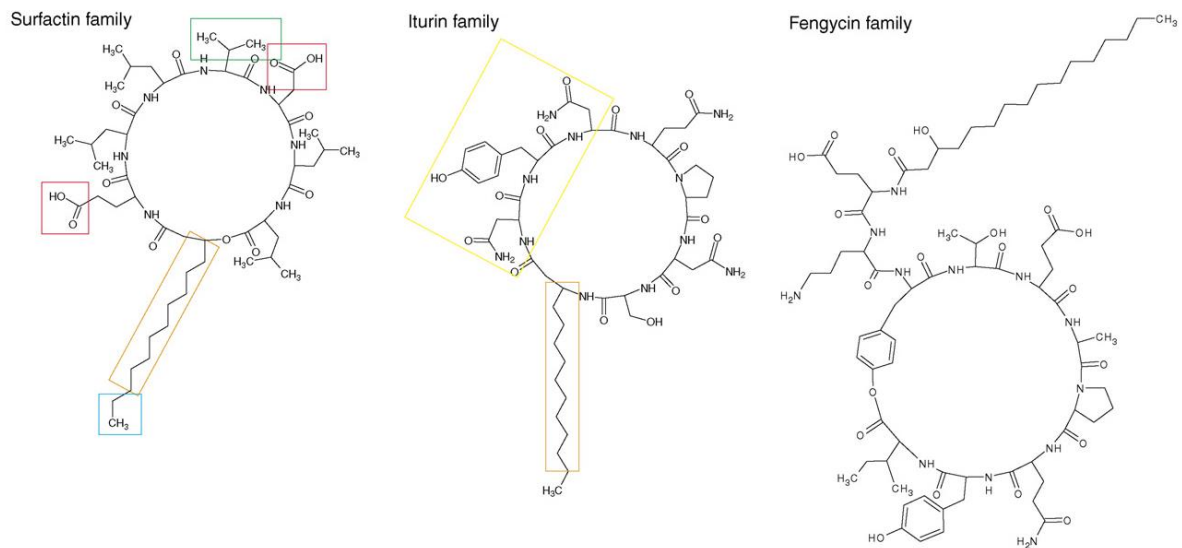
Entre los metabolitos producidos por el género *Bacillus*, con propiedades biocontroladoras, están los lipopéptidos (Figura 2 y Tabla 5) de las familias de la surfactina, iturina y fengicina (Mnif et al., 2015; Ogena & Jacques, 2008). Se trata de moléculas anfipáticas, con actividad biosurfactante y propiedades tensoactivas.



**Tabla 5***Estructura de las familias de lipopéptidos sintetizadas por el género Bacillus*

Familia de lipopéptidos	Sección aminoacídica	Sección lipídica
Surfactina	Siete $\alpha$ aminoácidos	Cadena de ácido graso $\beta$ -hidroxi de 13 a 16 carbonos
Iturina	Siete $\alpha$ aminoácidos	Cadena de ácido graso $\beta$ -amino de 14 a 17 carbonos
Fengicina	Diez $\alpha$ aminoácidos	Cadena de ácido graso $\beta$ -hidroxi de 14 a 18 carbonos

Fuente: (Ogena &amp; Jacques, 2008).

**Figura 2.** Estructuras de miembros representativos dentro de las tres familias de lipopéptidos sintetizadas por especies de *Bacillus*

Fuente: (Ogena &amp; Jacques, 2008).

**2.3.1. Aplicaciones de los lipopéptidos producidos por el género *Bacillus***

Los lipopéptidos de las familias de la iturina y fengicina poseen una fuerte actividad antifúngica. Por otro parte, la surfactina exhibe propiedades antimicrobianas en sinergismo con otros lipopéptidos; por sí sola no presenta actividad antifúngica (Ongena et al, 2005).

Un estudio realizado por Ongena et al. (2007) muestra que las surfactinas y fengicinas pueden estar involucrados en el desarrollo de resistencia sistémica inducida (ISR) al actuar como elicitores. Los resultados sugieren que la fengicina y surfactina proporcionaron un efecto protector significativo mediado por ISR en las plantas de frejol, similar al inducido por las células vivas de la cepa de *B. subtilis* S449.

Aparte de las propiedades mencionadas, los lipopéptidos también tienen uso potencial en la industria biotecnológica y farmacéutica debido a sus cualidades surfactantes (Ogena & Jacques, 2008), actividades antiadherente y antiinflamatoria, moduladoras inmunológicas, así como propiedades antivirales y antimicoplasma, entre otras. También han sido ampliamente utilizadas en procesos de biorremediación, al facilitar la degradación de contaminantes y de secuestro de metales pesados. En la industria alimenticia son empleados como conservantes, emulsificantes y solubilizantes (Mnif et al., 2015). En la Tabla 6 se especifican las familias de lipopéptidos junto a sus diferentes aplicaciones y actividades, así como los organismos productores.

En el 2000 se reportó una nueva familia de lipopéptidos producido por *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* y, en consecuencia, se los denominó como kurstakinas. Estos compuestos muestran actividad antifúngica contra *Stachybotrys charatum*. El potencial operón codificante de la kurstakina sintetasa fue descubierto apenas en el 2009 (Soberón-Chávez, 2011).

**Tabla 6**

*Lipopéptidos del género Bacillus más estudiados, aplicaciones y actividades*

	<b>Lipopéptidos</b>	<b>Microorganismos Productores</b>	<b>Actividades/ Aplicaciones</b>
Familia de Surfactina	Surfactina	<i>B. subtilis</i>	Permite la recuperación de crudo
	Lichenisina	<i>B. polyfermenticus</i>	Antibacterial
	Fungina	<i>B. megaterium</i>	Antiviral
	Pumilacidina	<i>B. licheniformis</i>	Antimicoplasma
		<i>B. pumilus</i>	Antitumoral <b>CONTINUA</b>

		<i>B. amyloliquefaciens</i>	Anticoagulante Inhibición de Enzimas Antiinflamatorio
Familia de Iturina	Iturina	<i>B. subtilis</i>	Antifúngico
	Bacillomicina	<i>B. megaterium</i>	Biopesticida
	Mycosubtilina		
	Subtulene		
Familia de Fengicina	Fengicina	<i>B. subtilis</i>	Fuerte agente anti fúngico contra hongos filamentosos
	Plipastatina	<i>B. thuringensis</i>	
	Agrastatinl	<i>B. circulans</i>	Inmunomodulador
		<i>B. megaterium</i>	

---

Fuente: (Beltran-Gracia et al., 2017)

### 2.3.2. Biosíntesis de los lipopéptidos producidos por el género *Bacillus*

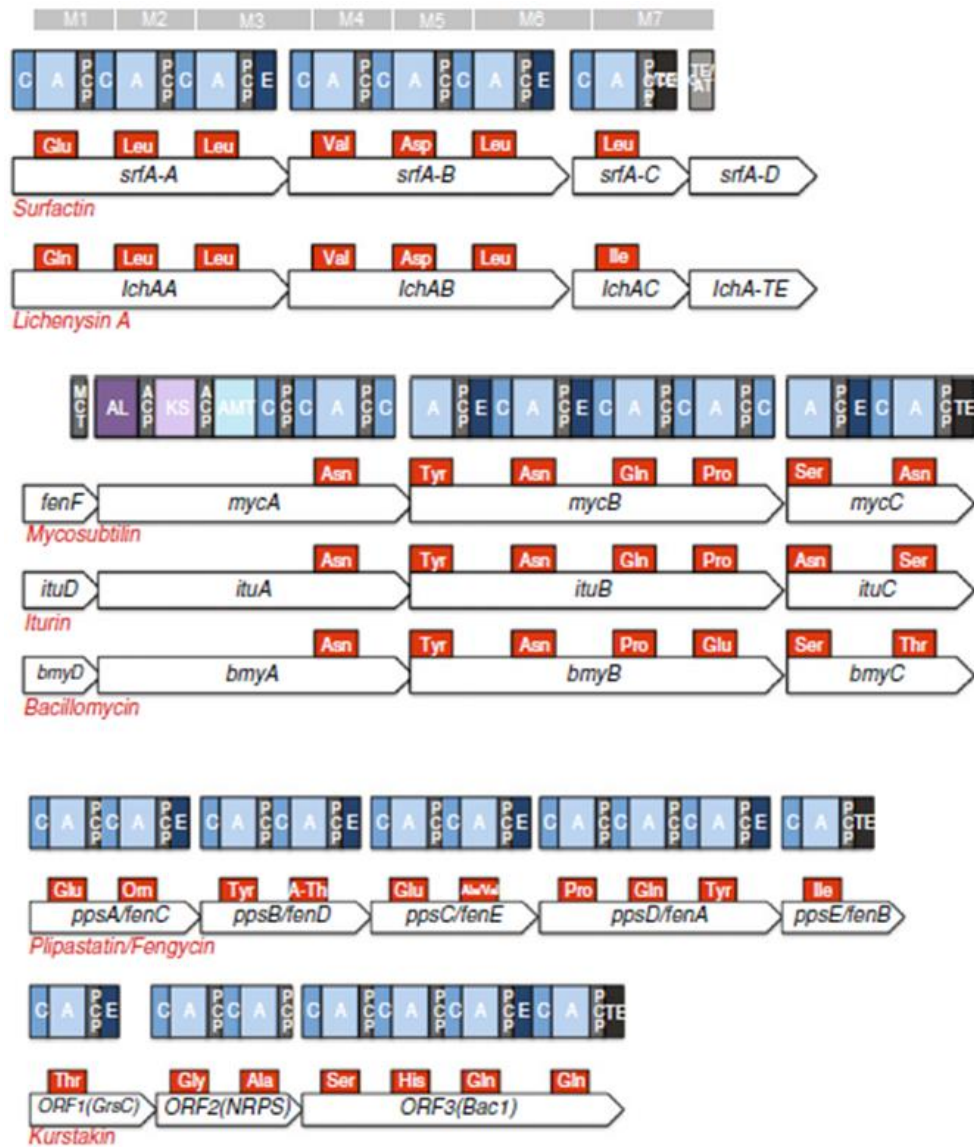
La síntesis de lipopéptidos por el género *Bacillus* está dada por complejos multienzimáticas denominados sintetasas de péptidos no ribosómicos o NRPS. Estas grandes proteínas se organizan en módulos (Sieber & Marahiel, 2005). Cada módulo es responsable de la incorporación de un aminoácido en la cadena peptídica, y a su vez, está conformada por varios dominios con actividad enzimática específica (Soberón-Chávez, 2011).

Cuatro dominios principales están presentes en una NRPS: adenilación (A), tiolación (T), condensación (C) y tioesterasa (TE). El dominio de adenilación selecciona el aminoácido y lo activa como adenilato de aminoácido, transferido luego al dominio T, también llamado proteína portadora de peptidilo (PCP), unido covalentemente a la cadena lateral 4'PP (serina unida a 4'-fosfopantetina). El dominio C cataliza la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos activados unidos a los PCPs de los módulos adyacentes. La terminación de la síntesis es catalizada por la enzima terminal del último módulo. En la mayoría de los casos y para la síntesis de lipopéptidos, esta reacción se realiza mediante un dominio de tioesterasa (TE) (Soberón-Chávez, 2011).

Otros dominios de adaptación pueden formar parte de NRPS, como ciclización (Cy), metilación (Me), oxidación (Ox), glicosilación, epimerización (E) y adición de cadena de ácido graso; los dos últimos están involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos en el género *Bacillus* (Soberón-Chávez, 2011).

Para la activación de una NRPS es necesaria una 4'-fosfopanteteinil transferasa, codificada en *B. subtilis* por el gen *sfp*, esencial para transformar una NRPS de su apo-forma a su holo-forma (Mofid et al, 2004).

Los complejos multienzimáticos son codificados por operones. El operón de la surfactina presenta tres marcos de lectura (ORF) correspondientes a los genes *srfA-A*, *srfA-B* y *srfA-C* (Galli et al., 1994). En conjunto los genes dan lugar a una matriz lineal de siete módulos (un módulo por residuo), tres módulos están presentes en cada uno de los productos de *SrfA-A* y *SrfA-B*, respectivamente, y el último en *SrfA-C*. En la Figura 3 se muestra de forma detallada los operones responsables de la biosíntesis de los lipopéptidos de *Bacillus* spp, así como los módulos, dominios y la cadena peptídica del respectivo lipopéptido (Soberón-Chávez, 2011).



**Figura 3.** Operones responsables de la biosíntesis de los lipopéptidos de *Bacillus* spp.

Fuente: (Ogena & Jacques, 2008).

### 2.3.3. Tamizajes de cepas productoras de biosurfactantes.

#### 2.3.3.1 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica es un método cualitativo para identificar microorganismos productores de biosurfactante. Se emplean placas de agar sangre donde se inocula la bacteria y

después de un periodo de incubación, se determinan zonas transparentes de hemólisis alrededor de las colonias (Thavasi et al., 2008).

### **2.3.3.2 Colapso de gota**

El ensayo de colapso de gota consiste en aplicar una gota de sobrenadante de cultivo bacteriano sobre una placa de poliestireno con pozos poco profundos cubiertos de aceite. La gota se extenderá sobre el aceite solo si el sobrenadante contiene biosurfactantes (Satpute et al., 2008; Soberón-Chávez, 2011)

### **2.3.3.3. Método de placas de agar azul**

El método de placas de agar azul consiste en un medio de sales minerales suplementado con 2% CETAB y 0.2 mg/mL de azul de metileno. Se realiza un estriado de la bacteria y se incuba. Se considera un resultado positivo para la producción de biosurfactantes la formación de un halo azul oscuro alrededor de las colonias (Satpute et al., 2008).

### **2.3.3.4. Otros métodos.**

Otro método empleado para la identificación de bacterias productoras de biosurfactante es el índice de emulsificación. La actividad emulsificante se mide en un mililitro de sobrenadante junto con 4 mL de agua y 6 mL de keroseno homogenizado por vortex en un tubo de ensayo. Después de 48 horas, se calcula el índice de emulsificación (IE) al dividir la altura de la fase emulsificada (a) para la altura total de la solución (b), multiplicado por 100 ( $IE = a/b * 100$ ). Los biosurfactantes tienen la capacidad de formar emulsiones estables a partir de una mezcla con dos fases, así las bacterias de los sobrenadantes que presenten mayor índice se consideran positivas. El método conocido como HOA por sus siglas en inglés (hidrocarbon overlay agar) consiste en colocar 40  $\mu$ l de queroseno, hexadecano, benceno, tolueno, Diesel o petróleo crudo en una placa de agar medio

mineral. Posteriormente, aislados bacterianos puros se estrían sobre las placas recubiertas. Después de un periodo de incubación, un halo emulsionado alrededor de la colonia será considerado positivo para la producción de biosurfactante (Satpute et al., 2008).

#### **2.3.3.5. Tamizaje molecular.**

Los tamizajes moleculares para la selección e identificación de posibles cepas productoras de lipopéptidos de interés han sido ampliamente utilizados (Farzand et al., 2019). La técnica se basa en identificar genes involucrados en la producción de biosurfactantes lipopeptídicos mediante métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) sensibles (Mora et al., 2011). Entre los genes más empleados están: bmyB (bacillomicina L sintetasa B), fenD y fenB (fengicina sintetasa), ituC y ituD (iturina A sintetasa), srfAA (surfactina sintetasa subunidad 1) y bacA (proteína de biosíntesis para bacilsina), entre otros (Płaza et al., 2015; Mora et al., 2011; Chung et al, 2008).

Un marcador ampliamente identificado en cepas productoras es el gen sfp, codificador para la enzima 4-fosfopantetheinyl transferasa. Tiene un rol regulador al activar el complejo multienzimático NRPS (Hsieh, Li, Lin, & Kao, 2004). También se han empleado otros marcadores moleculares reguladores de la biosíntesis de biosurfactantes como rhlR, rklI y dnaK (Płaza et al., 2015).

Los métodos de PCR han representado un enfoque rápido para la detección e identificación de aislados bacterianos con un potencial uso para la producción de biosurfactante (Farzand et al., 2019; Płaza et al., 2015).

## **2.4. Hongos fitopatógenos de relevancia**

La fitopatología estudia las enfermedades de las plantas, tanto al organismo infectado como al patógeno. Participa de las biociencias Botánica, Micología, Microbiología y Virología. A su vez,

también se trata de una ciencia agrícola, puesto que interviene en el diagnóstico de plagas y enfermedades, propone medidas de cuidado en los cultivos, y la creación de las condiciones para minimizar las pérdidas. El estudio de la interacción entre un organismo superior e inferior, una planta huésped y un parásito, es de suma importancia, ya que, sin su conocimiento, análisis y uso práctico, incluso los cultivares más resistentes perderán rápidamente la resistencia y los fungicidas más activos se volverán ineficientes (Dyakov, Dzhavakhiya, & Korpela, 2007).

Los hongos fitopatógenos poseen una gran variedad de enzimas líticas que destruyen los polímeros de carbohidratos, componentes de las paredes celulares de las plantas. El proceso de infección se puede describir en tres fases. Primero, el parásito emplea estas enzimas para penetrar en la célula y alimentarse de sus nutrientes. Segundo, en algunos casos las enzimas producidas son tan activas que degradan una parte más grande de la pared celular; una vez eliminada esta barrera, los procesos osmóticos destruyen el protoplasto, las células mueren y pierden las propiedades inmunitarias. En tercer lugar, los microorganismos destruyen el tabique (red intercelular de unión), lo que les permite moverse más lejos en los tejidos de las plantas infectadas (Dyakov, Dzhavakhiya, & Korpela, 2007).

#### **2.4.1. Fitopatología de *Fusarium oxysporum***

El género *Fusarium* está compuesto por especies de hongos productoras de macro-conidios fusiformes largos y ligeramente curvados, muy característicos. Se distribuyen ampliamente en el suelo y en sustratos orgánicos (Pietro et al., 2003).

Las especies del género *Fusarium* son importantes patógenos de plantas o contaminantes en los alimentos para humanos y animales debido a la producción de micotoxinas (Moss & Smith,



2011; Pietro et al., 2003). Ciertos miembros del género pueden actuar como patógenos en humanos, específicamente en individuos inmunocomprometidos (Pietro et al., 2003; Boutati & Anaissie, 1997).

La especie *Fusarium oxysporum* incluye tanto a cepas patógenas como no patógenas (Gordon & Martyn, 1997). A las formas fitopatógenas se le atribuyen la marchitez vascular de una gran variedad de plantas. Los síntomas iniciales de la enfermedad incluyen el aclaramiento de las venas de la hoja, seguido de retrasos en el crecimiento, coloración amarillenta a café de las hojas inferiores, marchitamiento progresivo de las hojas y el tallo, defoliación y finalmente la muerte de la planta. En las secciones transversales del tallo, se observa la presencia de un anillo marrón en el área de los haces vasculares. Algunas formas de *F. oxysporum* no son principalmente patógenas vasculares, sino agentes causales de la pudrición radicular de la planta (Elliott, 2010; Pietro et al., 2003).



**Figura 4.** Corte transversal de tallo de tomate afectado por *F. oxysporum* con marchitez vascular

Fuente: (Millas & France, 2017).

El rango de hospederos de *F. oxysporum* es muy amplio a nivel de especie. Se ha logrado identificar más de 120 formas diferentes o cepas basados en la especificidad de las especies hospedantes pertenecientes a una vasta gama de familias de plantas. Entre los cultivos económicamente relevantes afectados por *F. oxysporum* consta la mayoría de vegetales, flores,

algodón, tabaco, banano, plátano, café, caña de azúcar y algunos árboles de sombra (Pietro et al., 2003).

#### **2.4.2. Fitopatología de *Rhizoctonia solani***

*Rhizoctonia* es un género de hongos perteneciente al grupo conocido como "Mycelia Sterilia". Estos hongos no generan esporas asexuales y crecen a partir de la producción de hifas. Las etapas sexuales o telomorfos de muchas especies de *Rhizoctonia* han sido clasificados dentro de los géneros *Thanatephorus*, *Waitea*, y *Ceratobasidium*; encontrar las formas sexuales en la naturaleza es muy raro (Tredway & Burpee, 2001).

*R. solani* ha sido reportada como un hongo ampliamente distribuido, destructivo y como un fitopatógeno versátil, desde su primer aislamiento por Kuhn en 1858 (Parmeter, 1970). *Rhizoctonia solani* abarca varios grupos de anastomosis (AGs), en donde los aislados se categorizan en base a la habilidad de sus hifas para fusionarse con otras, fenómeno conocido como anastomosis (Wharton et al., 2007).

Entre las enfermedades atribuidas a *R. solani*, constan la necrosis de raíz y córtex, pudrición radicular, así como colapso y muerte de las plántulas jóvenes (Kasim et al., 2018). También es el agente causal de varias enfermedades conocidas comúnmente como la mancha bandeada del maíz (Perdomo et al., 2007), el parche marrón en pastos (Tredway & Burpee, 2001) y la costra negra de la papa (Torre, 2002), entre otras.



**Figura 5.** Costra negra del papa generado por *R. solani*

Fuente: (Acuña & Tejada, 2019)

*R. solani* tiene un amplio rango de hospederos que abarca más de 200 especies de plantas, especialmente la familia *Solanaceae*. Entre los cultivos afectados por *R. solani* constan: berenjena, pimiento, papa, tabaco y tomate, tanto en condiciones de invernadero como de campo (Gondal, Rauf, & Naz, 2019).

## 2. 5 Hipótesis

Los extractos de biosurfactante producidos por las especies de *Bacillus*, positivas en el tamizaje molecular para la producción de surfactina y fengicina, muestran potencial antifúngico contra dos especies de hongos fitopatógenos.

## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Revisión Bibliográfica.

Se investigó sobre los pesticidas y su impacto en la salud humana y ambiente, los tipos de biopesticidas; sus ventajas y uso en el Ecuador. También se inquirió sobre el género *Bacillus*, sus lipopéptidos y su aplicación como biocontroladores y sobre dos hongos fitopatógenos de interés agrario

Se realizó una revisión bibliográfica sobre tamizajes bioquímicos y moleculares para cepas productoras de biosurfactantes. Se indagó sobre las condiciones de fermentación y cultivo, métodos de extracción de lipopéptido y las diferentes técnicas para evaluar el potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante.

### 3.2. Reactivación de las cepas bacterianas.

Las cepas empleadas se encontraban en condiciones de preservación a - 80°C, en el laboratorio de Microbiología (Carrera de Ingeniería en Biotecnología) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y forman parte de los proyectos PIC-2015-002: “Análisis y caracterización microbiológica y molecular comunidad microbiana en fuentes geotermales del Ecuador” y PIC-2015-001: “Desarrollo de una nueva técnica de degradación de hidrocarburos de petróleo mediante aplicación combinada de nanopartículas metálicas y microorganismo” (Tabla 7).

Las cepas se reactivaron siguiendo el protocolo de Freire & Sato (1999). Los microtubos con las cepas fueron sometidos a baño maría a 37°C por 2 min, para después ser sembrados en medio líquido e incubados a 37°C por 24 h.

**Tabla 7***Fuente de aislamiento de las cepas de Bacillus spp.*

Código de cepa	Especie (16S)	Fuente
UFAB19	<i>B. licheniformis</i>	Fuente geotermal "Aguas Hediondas"-Carchi
UFAB25	<i>B. subtilis</i>	
UFAB28	<i>B. megaterium</i>	Suelos con Hidrocarburos El Rosario Quinindé-
UFAB31	<i>B. toyanensis</i>	Esmeraldas.
UFAB29.1	<i>B. cerus</i>	
UFAB18	<i>B. licheniformis</i>	Fuente geotermal "Guapán" - Cañar
UFAB29	<i>B. subtilis</i>	Fuente geotermal "El Riñón"- Azuay
UFAB26	<i>B. circulans</i>	
UFAB37	<i>B. licheniformis</i>	Fuente geotermal "El Salado"-Tungurahua

### 3.3. Comprobación de la pureza de las cepas bacterianas.

Para comprobar la pureza de las cepas se realizó un estriado en agar nutriente, esperando obtener colonias con forma y color uniformes. Mediante una tinción Gram, se observó bacilos, Gram +, característicos del género *Bacillus*.

### 3.4. Tamizaje para la producción de biosurfactante.

#### 3.4.1. Actividad hemolítica microbiana

El ensayo de actividad hemolítica se realizó en placas de agar sangre, mediante un estriado de las diferentes cepas de *Bacillus*, incubadas a 37 °C por 42 h. Se identificaron zonas amarillentas o transparentes de hemólisis alrededor de las colonias como resultado positivo para la producción de biosurfactantes (Youssef et al., 2004). En la Tabla 8 se describen los niveles de hemólisis.

**Tabla 8***Niveles de hemólisis e interpretación de la actividad hemolítica microbiana*

Nivel de hemólisis	Interpretación
-	No existe hemólisis
+	Hemólisis incompleta (zona verdosa)
++	Hemólisis completa con un diámetro de lisis menor a 1 cm
+++	Hemólisis completa con un diámetro de lisis mayor o igual a 1 cm

Fuente: (Youssef et al., 2004)

### 3.4.2. Tamizaje molecular

Se realizó la extracción de ADN genómico bacteriano empleando el protocolo de Jarrín (2010) modificado (Anexo 1). Para la cuantificación de ADN y determinación del ratio de calidad, A280/260, se empleó el NanoDrop 2000 Spectrophotometer marca Thermo Scientific, considerándose valores de 1.8-2 como ADN puro (Sambrook & Russell, 2001). Las concentraciones de ADN se ajustaron a 40 ng/ $\mu$ L.

Se realizaron PCRs para los genes involucrados en la ruta biosintética de los lipopéptidos: surfactina, fengicina y lichenisina. Los cebadores junto a las temperaturas de annealing se muestran en la Tabla 9. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ L con 6,5  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 12,5  $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix, 2X de Promega, 0.6  $\mu$ M de cada cebador y 3 $\mu$ l de ADN genómico. Las condiciones para la amplificación de todas las secuencias objetivo fueron las siguientes: 95 °C durante 2 min, 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, temperatura de annealing de 30 s y 72 °C de 30 s - 45 min. Una etapa de extensión final a 72 °C durante 7 min, seguida por la temperatura de almacenamiento a 4 °C. Los productos de PCR obtenidos de los diferentes genes fueron visualizados en gel de agarosa, después de electroforesis, en un Transiluminador UV – M20V marca UVP

**Tabla 9**  
*Cebadores empleados en el tamizaje molecular.*

Lipopéptidos	Gen	Primer	bp	T. annealing	Referencia
Surfactina	sfp	F-5' ATGAAGATTTACGGAATTTA 3' R-5' TTATAAAAGCTCTTCGTACG 3'	675	46 °C	Hsieh et al. (2004)
	srf-AA	F-5' TCGGGACAGGAAGACATCAT 3' R-5' CCACTCAAACGGATAATCCTGA 3'	200	55 °C	Chung et al. (2008)
Fengicina	fenB	F-5' CCTGGAGAAAGAATATACCGTACCY 3' R-5' GCTGGTTCAGTT KGATCACAT 3'	670	57 °C	Chung et al. (2008)
Lichenisina	Lich-AA	F-5' ACTGAAGCGATTTCGCAAGTT 3' R- 5' TCGCTTCATATTGTGCGTTC 3'	472	56,5 °C	Madslie et al. (2013)

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados por la empresa Macrogen Korea mediante tecnología Sanger. Las secuencias fueran limpiadas empleando el programa Geneius y Mega7 hasta obtener una calidad aceptable ( $HQ > 85\%$ ). Las secuencias resultantes fueron comparadas en la base de datos Blast.

### **3.5. Producción del biosurfactante.**

Para la producción de biosurfactante se seleccionaron las cepas UFAB25 y UFAB29, positivas en el tamizaje bioquímico y molecular para *sfp*, *srf-AA* y *fenB* así como UFAB19, negativa en el tamizaje bioquímico y positiva para *Lich-AA*. Se emplearon dos métodos diferentes para la producción de biosurfactante, como se detalla a continuación.

#### **3.5.1. Producción de biosurfactante por el método de Mnif et al. (2013).**

El inóculo se preparó de acuerdo al protocolo empleado por Ghribi et al. (2012). Una colonia de la cepa de interés se inoculó en 3 mL de medio LB y se incubó a 37°C por una noche. Una alícuota de 0,2 ml se inoculó en 50 mL de medio LB en un frasco Erlenmeyer de 250 mL y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 3 a una longitud de onda de 600nm. Se inoculó una alícuota del cultivo en medio mineral hasta obtener una densidad óptica inicial de 0.15 correspondiente a  $0.8 \cdot 10^7$  UFC/mL.

Para el medio mineral 1 (Mm1) se usó medio optimizado por Mnif et al., (2013), con la siguiente composición: 15 g/L glucosa, 7.5 g/L urea, 1 g/L  $K_2HPO_4$ , 1g/L sulfato de amonio, 0.5 g/L NaCl, 0.2 g/L  $MgSO_4$ , 0.5 g/L  $KH_2PO_4$ , y 0.001 g/L de cada una de las siguientes sales:  $MnSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$  y  $CaCl_2$ . El cultivo se llevó a cabo en 150 mL de medio en frascos de 500 mL. Se incubó a 30°C y 150 rpm durante 3 d.

### **3.5.2. Producción de biosurfactante por el método de El-Sheshtawy et al. (2015)**

Se empleó como inóculo una alícuota de 5 mL de un cultivo de 24 horas de la bacteria de interés en caldo nutriente. Para el medio mineral 2 (Mm2) se empleó el medio descrito por El-Sheshtawy et al., (2015): 2% de glucosa, 3% de extracto de levadura, 2.5 g/L NaNO<sub>3</sub>, 0,1 g/L KCl, 3.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O y 5 mL de una solución de elementos traza; 0.116 g/L FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.232 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.41 g/L CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.008 g/L CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 0.008 g/L MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 0.022g/L [NH<sub>4</sub>]<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> y 0.174 g/L ZnSO<sub>4</sub>. El cultivo se realizó en 500 mL en frascos de tapa rosca completamente llenos, se incubó a 30°C y 150 rpm durante 3 d (El-Sheshtawy et al., 2015).

### **3.5.3. Comprobación de la producción de biosurfactante**

Para comprobar la producción de biosurfactante, se empleó la prueba de dispersión de crudo de acuerdo a la metodología descrita por Youssef et al., (2004) con modificaciones. Se agregó una solución de 50 mL de agua destilada más 20 µL de crudo a una placa Petri. Luego se añadió una gota (≈ 10 µl) del cultivo libre de células. Se midió el diámetro de la zona clara sobre la superficie del crudo. La prueba se realizó por triplicado para las tres cepas: UFAB25, UFAB29 y UFAB19, con los dos medios empleados. Se hizo una prueba control agregando una gota de agua. No se observó la formación de zonas claras.

### **3.6. Extracción del biosurfactante.**

Se llevó a cabo la extracción del biosurfactante de acuerdo a la metodología de Yiming et al., (2010) modificada por Jarrín (2018). Se separa los lipopéptidos de interés (presentes en el medio de cultivo) de la biomasa mediante centrifugación a 6000 rpm por 20 min. Posteriormente el sobrenadante es acidificado a un pH de 2.0 agregando HCl concentrado y almacenándolo a una



temperatura de 4°C durante una noche. El biosurfactante precipitado se colectó mediante centrifugación y se lo recuperó y agitó en metanol durante dos horas. Posteriormente se eliminó el solvente mediante evaporación.

### **3.7. Determinación del rendimiento de producción de biosurfactante**

La producción del biosurfactante fue cuantificada para las cepas UFAB25, UFAB29 y UFAB19, en el medio Mm1, debido a su bajo costo.

Para determinar el rendimiento de producción de biosurfactante, se calculó el peso del extracto seco de biosurfactante dividido para el volumen de medio de cultivo empleado en la producción. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de producción} = \frac{\text{Peso del extracto en polvo}(mg)}{\text{Volumen de medio cultivado}(L)}$$

### **3.8. Evaluación del potencial antifúngico del extracto de biosurfactante *in vitro***

Para la evaluación del potencial antifúngico se emplearon dos hongos fitopatógenos: *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, proporcionados por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Se realizaron soluciones metanólicas de los diferentes extractos de biosurfactante obtenidos a partir de las cepas UFAB25, UFAB29 y UFAB19; así como de los dos medios minerales utilizados. En la Tabla 10 se detalla las soluciones empleadas.

**Tabla 10***Soluciones metanólicas de los extractos crudos de biosurfactante.*

Cepas	Solución BS	Descripción
UFAB25	BS <sub>1</sub>	<b>BS<sub>1</sub></b> : Solución metanólica de BS producido en el medio Mm1 al 50% v/v aproximadamente, para la cepa UFAB19 se empleó una concentración mucho menor.
	F <sub>OH-</sub> BS <sub>1</sub>	
	BS <sub>2</sub>	
UFAB29	BS <sub>1</sub>	<b>F<sub>OH-</sub> BS<sub>1</sub></b> : Fracción metanólica de la solución Bs1. Se considera que la concentración de BS en la solución F <sub>OH-</sub> BS <sub>1</sub> para UFAB19 fue prácticamente nula
	F <sub>OH-</sub> BS <sub>1</sub>	
	BS <sub>2</sub>	
UFAB19	BS <sub>1</sub>	<b>BS<sub>2</sub></b> : Solución metanólica de BS producido en el medio Mm2 al 50% v/v aproximadamente
	BS <sub>2</sub>	
	F <sub>OH-</sub> BS <sub>1</sub>	

Para la evaluación del potencial antifúngico se usó el método de difusión en pozo. Se trata de una técnica cuantitativa que permite determinar si un extracto presenta potencial antifúngico (Pretorius & Van Der Watt, 2015). Se empleó el método de Ramarathnam et al. (2007) con modificaciones. En una caja Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) se inoculó un tapón micelial de 0,5 cm de diámetro de un cultivo de *R. solani* o *F. oxysporum*. Luego se cargaron 50 µL de las soluciones metanólicas de biosurfactantes en los pocillos (0,5 cm) hechos a 3 cm de distancia del centro de la placa, donde se inoculó el tapón micelial. También se cargó 50 µL de metanol en un pocillo control. Se cuantificó la inhibición del fitopatógeno cuando el crecimiento micelial alcanzó el pocillo control.

Se empleó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los hongos empleados (Simonettia et al., 2012).

$$I = \frac{C - T}{C} * 100$$

Donde:

$C$  = distancia radial del crecimiento micelial hacia el pocillo control.

$T$  = distancia radial de crecimiento micelial hacia el pocillo con el extracto.

$I$  = porcentaje de inhibición.

Los experimentos para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fueron realizados por triplicado.

### 3.9. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se ejecutaron en el programa informático “OriginPro 2018”. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se empleó tanto ANOVA de una vía como ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni. El nivel de significancia empleado fue de  $\alpha = 0.05$ . Los ensayos se realizaron por triplicado. En la Tabla 11 se indica el ensayo, el indicador empleado y el análisis estadístico realizado.

**Tabla 11**

*Análisis estadístico empleada para cada uno de los ensayos*

<b>Ensayo</b>	<b>Indicador</b>	<b>Análisis estadístico</b>
Comprobación de la producción de BS	Diámetro (mm) de la zona de dispersión	ANOVA de dos vías Bonferroni
Producción de BS	Rendimiento de producción (mg de BS/ L de cultivo)	ANOVA de una vía Bonferroni
Potencial antifúngico de los BS	% de inhibición del crecimiento micelial	ANOVA de dos vías Bonferroni

BS= Biosurfactante

Para evaluar el potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante producidos por diferentes cepas de *Bacillus* spp, se empleó un diseño multifactorial (Tabla 12)

**Tabla 12**

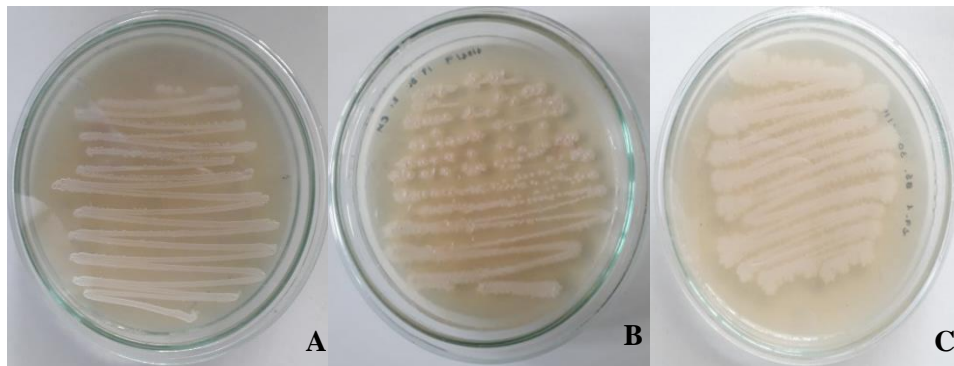
*Diseño multifactorial para la evaluación del potencial antifúngico in vitro contra F. oxysporum y R. solani*

<b>Fitopatógeno</b>	<b>Cepa</b>	<b>Biosurfactante</b>
<i>F. oxysporum</i>	UFAB25	Bs <sub>1</sub>
		F <sub>OH</sub> -Bs <sub>1</sub>
		Bs <sub>2</sub>
	UFAB29	Bs <sub>1</sub>
		F <sub>OH</sub> -Bs <sub>1</sub>
		Bs <sub>2</sub>
UFAB19	Bs <sub>1</sub>	
	Bs <sub>2</sub>	
<i>R. solani</i>	UFAB25	Bs <sub>1</sub>
		F <sub>OH</sub> -Bs <sub>1</sub>
		Bs <sub>2</sub>
	UFAB29	Bs <sub>1</sub>
		F <sub>OH</sub> -Bs <sub>1</sub>
		Bs <sub>2</sub>
UFAB19	Bs <sub>1</sub>	
	Bs <sub>2</sub>	

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

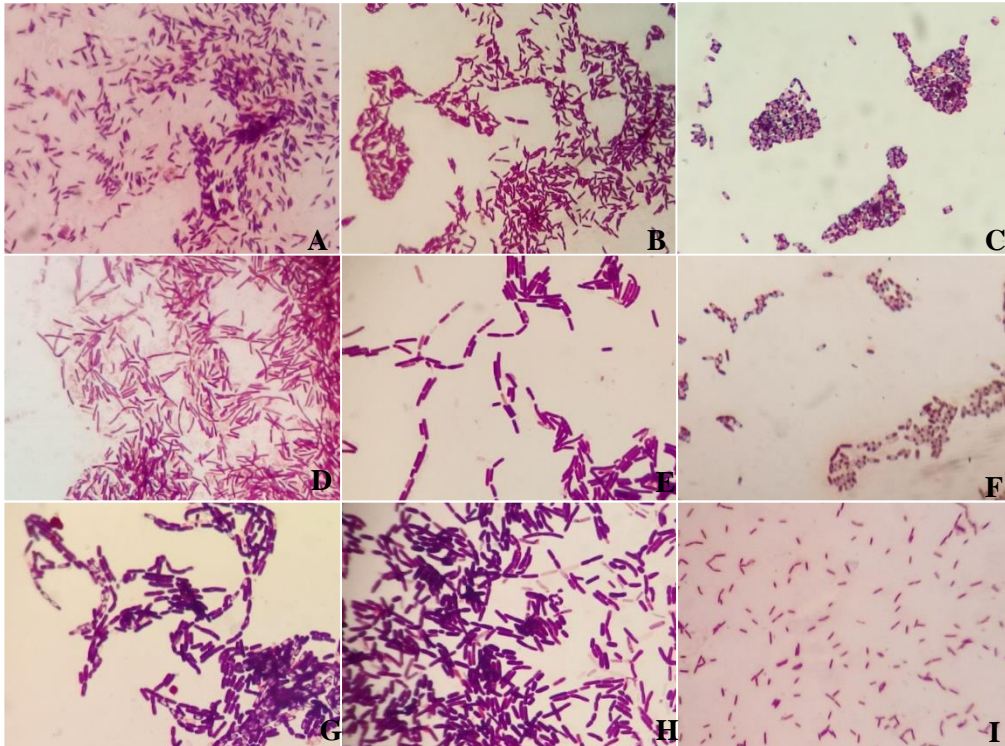
### 4.1. Reactivación y comprobación de pureza de las cepas

Las cepas de *Bacillus* fueron reactivadas en medio LB durante 24 horas a 37°C. Se confirmó la presencia del crecimiento bacteriano a partir de la turbidez del medio. Para corroborar la pureza de las cepas se realizaron estriados en agar nutriente y se estudió la morfología macroscópica de cada una. Se observaron colonias con bordes irregulares desde ondulados hasta espiculados, de color blanco o crema, algunas presentaron textura lisa, mientras que otras presentaron textura ligeramente rugosa. En la Figura 6 se muestra los estriados en Agar Nutriente de tres de las nueve cepas reactivadas.



**Figura 6.** Cultivos en Agar de nutriente en caja Petri de: A: UFAB25 (*B. subtilis*), B: UFAB19 (*B. licheniformis*), C: UFAB29 (*B. subtilis*).

Se realizó tinción Gram a las colonias aisladas de las diferentes cepas reactivadas para observar microscópicamente su morfología. Todas correspondieron a bacilos Gram positivos y se observaron endosporas, en concordancia con el género *Bacillus* (Figura 7).



**Figura 7.** Tinción Gram 1000X. A: UFAB18, B: UFAB19, C: UFAB25, D: UFAB26, E: UFAB28, F: UFAB29, G: UFAB29.1, H: UFAB31.5, I: UFAB37

#### 4.2. Tamizaje para producción de biosurfactantes mediante actividad hemolítica

En la Figura 8 se muestra la actividad hemolítica como método cualitativo para determinar cepas productoras de biosurfactantes. El 55,5 % de las cepas de *Bacillus*, correspondientes a UFAB25, UFAB28, UFAB29.1, UFAB29 y UFAB35, generaron hemólisis completa como se detalla en la Tabla 13.

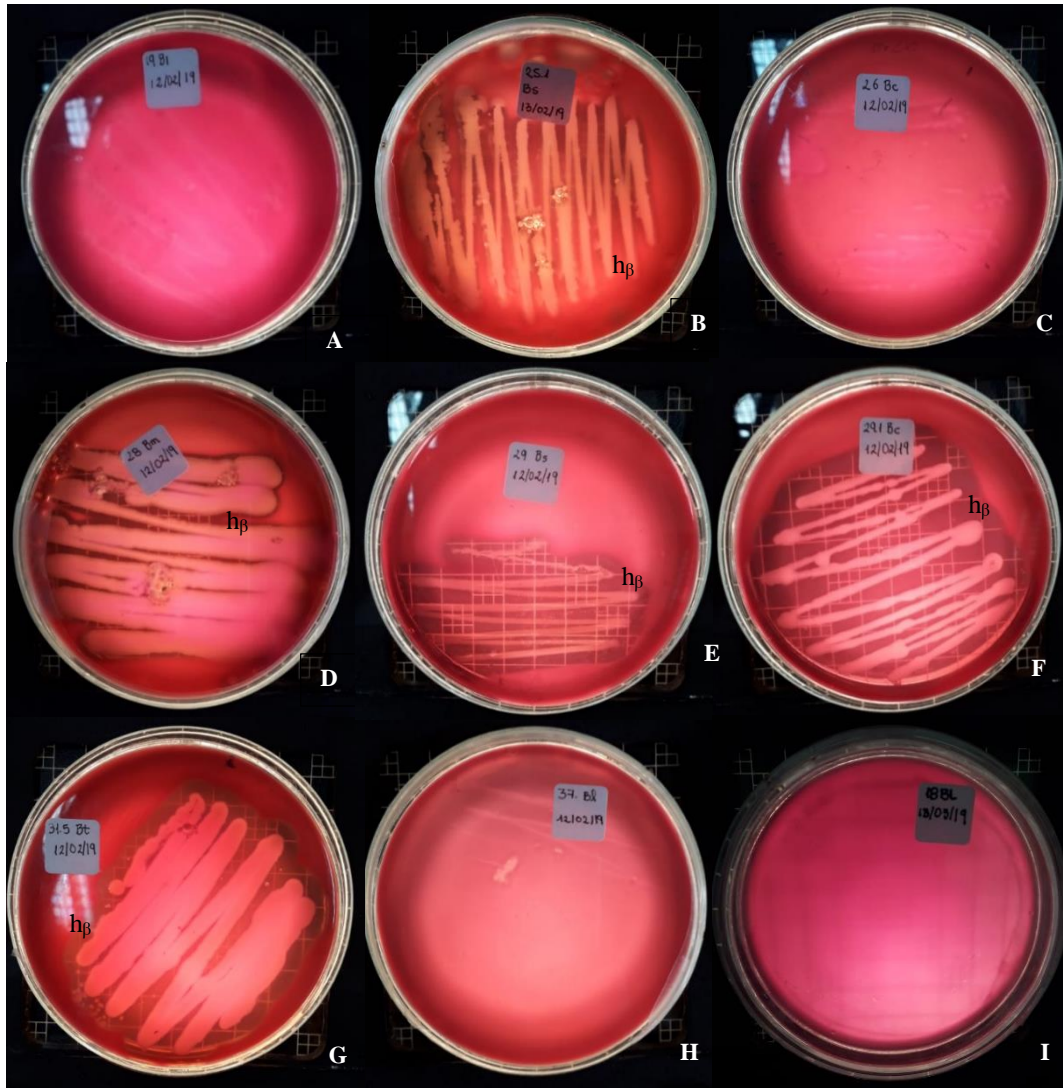
**Tabla 13**

*Resultados de la actividad hemolítica como tamizaje para cepas productoras*

Cepa	Especie (16S)	Hemólisis
UFAB25	<i>Bacillus subtilis</i>	++
UFAB19	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
UFAB29.1	<i>Bacillus cerus</i>	+++

**CONTINÚA**

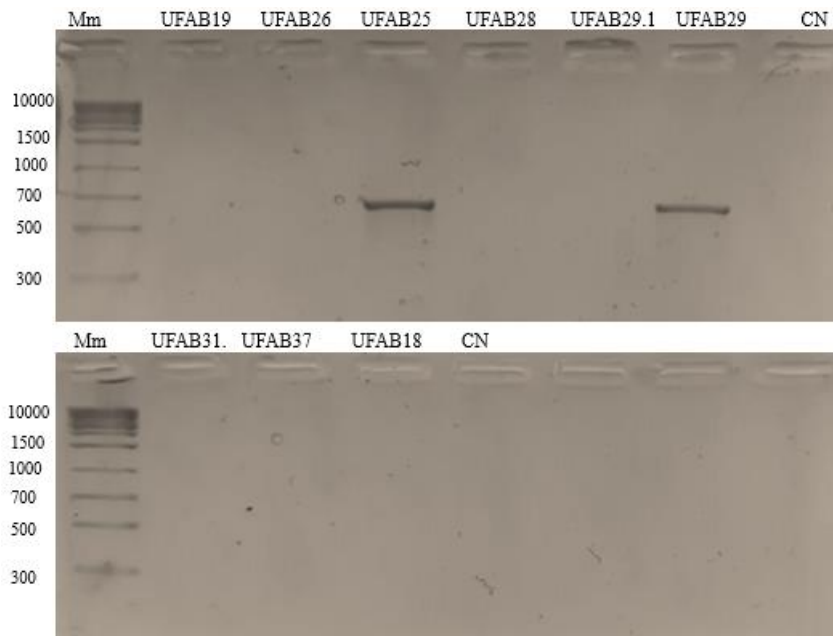
UFAB31	<i>Bacillus toyanensis</i>	+++
UFAB28	<i>Bacillus megaterium</i>	++
UFAB29	<i>Bacillus subtilis</i>	+++
UFAB26	<i>Bacillus circulans</i>	-
UFAB37	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
UFAB18	<i>Bacillus licheniformis</i>	-



**Figura 8.** Tamizaje en Agar Sangre para cepas de *Bacillus*. A: UFAB19, B: UFAB25, C: UFAB26, D: UFAB28, E: UFAB29, F: UFAB29.1, G: UFAB31.5, H: UFAB37, I: UFAB18. Zonas de hemólisis: h $\beta$

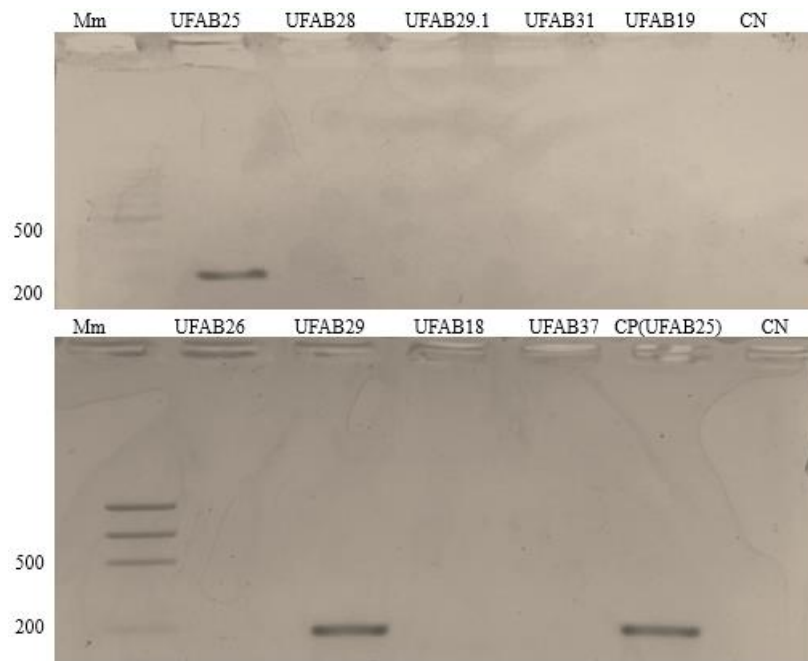
### 4.3. Tamizaje molecular para genes involucrados en la producción de biosurfactante

Los resultados de la cuantificación de ADN genómico bacteriano y el ratio de calidad A280/260 se muestran en el Anexo 2. 22, 2 % de las cepas presentan los genes *sfp* y *srf-AA*, involucrados en la producción de surfactina. Los aislados positivos corresponden a dos cepas (UFAB25, UFAB29) de *B. subtilis*. Para el gen *fenB*, fengicina, se estableció que solo la cepa UFAB25, de la especie *B. subtilis* lo tiene. Mientras que para el gen *Lich-AA*, lichenisina, se determinó el 33,3 % de las bacterias reactivadas lo presentan. Las cepas positivas pertenecen a *B. licheniformis*. Las Figuras 9, 10, 11 y 12 muestran los gels de agarosa con los productos de PCR para los diferentes genes.

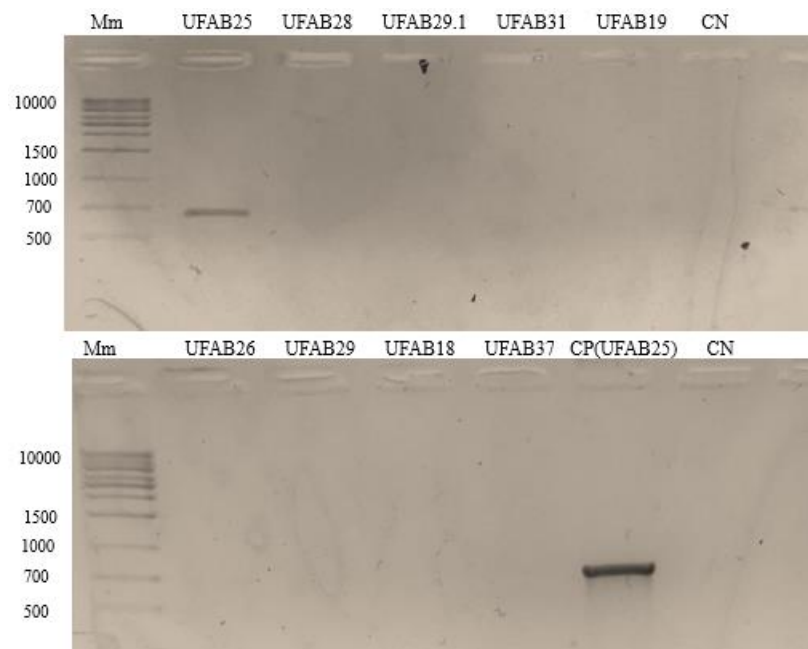


**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen *sfp*. Cepas positivas UFAB25 y UFAB29 (*B. subtilis*).

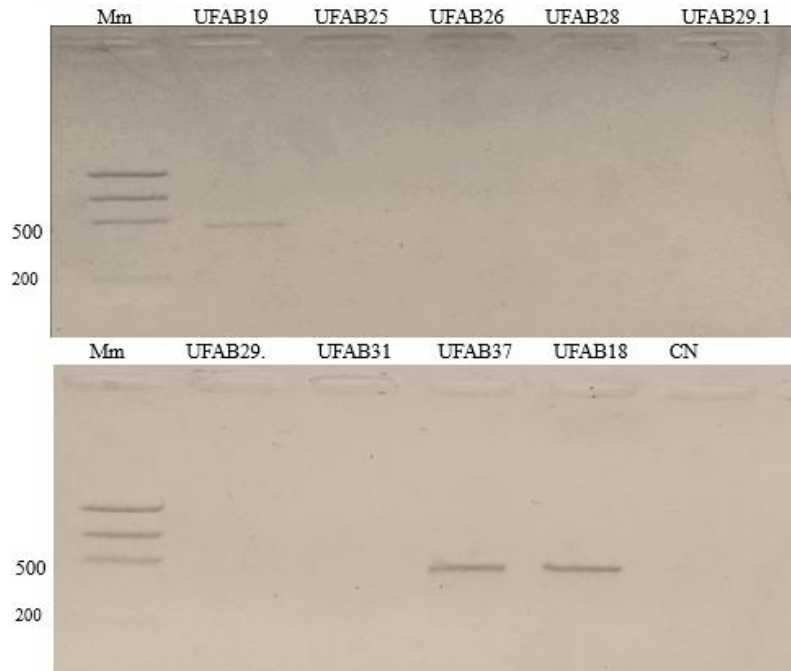




**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen srf-AA. Cepas positivas UFAB25 y UFAB29 (*B. subtilis*).



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen fenB, Ceba positiva UFAB25 (*B. subtilis*).



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para el gen Lich-AA. Cepas positivas UFAB18, UFAB19, UFAB37 (*B. licheniformis*).

Se confirmó mediante secuenciación Sanger que los productos de PCR corresponden a los genes de interés. Los resultados de la comparación realizada en Blast con las secuencias obtenidas se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14**

*Resultados de la comparación realizada en Blast de la secuenciación de los productos de PCR.*

Cepa	Gen	Código de accesión	Identidad	Query Cover	Producto
UFAB25	sfp	CP035397.1	99.85%	100%	4'-phosphopantetheinyl transferase
UFAB29	sfp	CP032872.1	99.53%	100%	4'-phosphopantetheinyl transferase
UFAB25	srf-AA	CP029609.1	97.66%	98%	surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA
UFAB29	srf-AA	CP032855.1	98.00%	99%	surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA
UFAB25	fenB	CP014858.1	99.84%	99%	non-ribosomal peptide synthase

**CONTINÚA**

UFAB18	Lich-AA	CP038186.1	100%	99%	lichenysin non-ribosomal peptide synthetase LicA
UFAB19	Lich-AA	CP025226.1	99.33%	99%	non-ribosomal peptide synthetase
UFAB37	Lich-AA	CP038186.1	100%	99%	lichenysin non-ribosomal peptide synthetase LicA

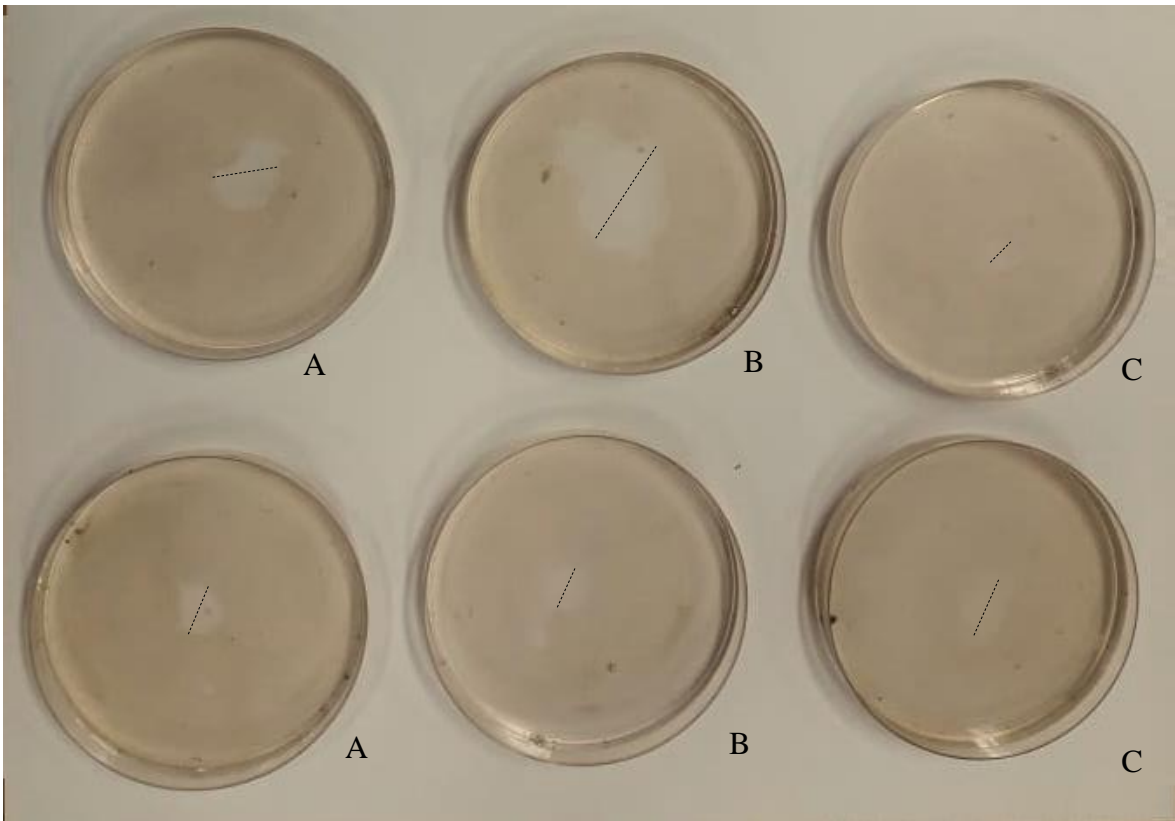
#### 4.4. Producción de biosurfactantes

La producción del biosurfactante en los medio Mm1 y Mm2 se comprobó mediante la prueba de dispersión de crudo. Se midió el diámetro de las zonas de desplazamiento del crudo al colocar una gota del medio libre de células. El mayor diámetro de dispersión de crudo (26,3 mm) correspondió a la cepa UFAB29 con el medio Mm1. La zona de dispersión de menor diámetro (5,7mm) fue con la cepa UFAB19. Todos los sobrenadantes ensayados generaron el desplazamiento del crudo confirmándose la producción de biosurfactante. En la Tabla 15 se muestran los resultados de la prueba de dispersión de crudo.

**Tabla 15**

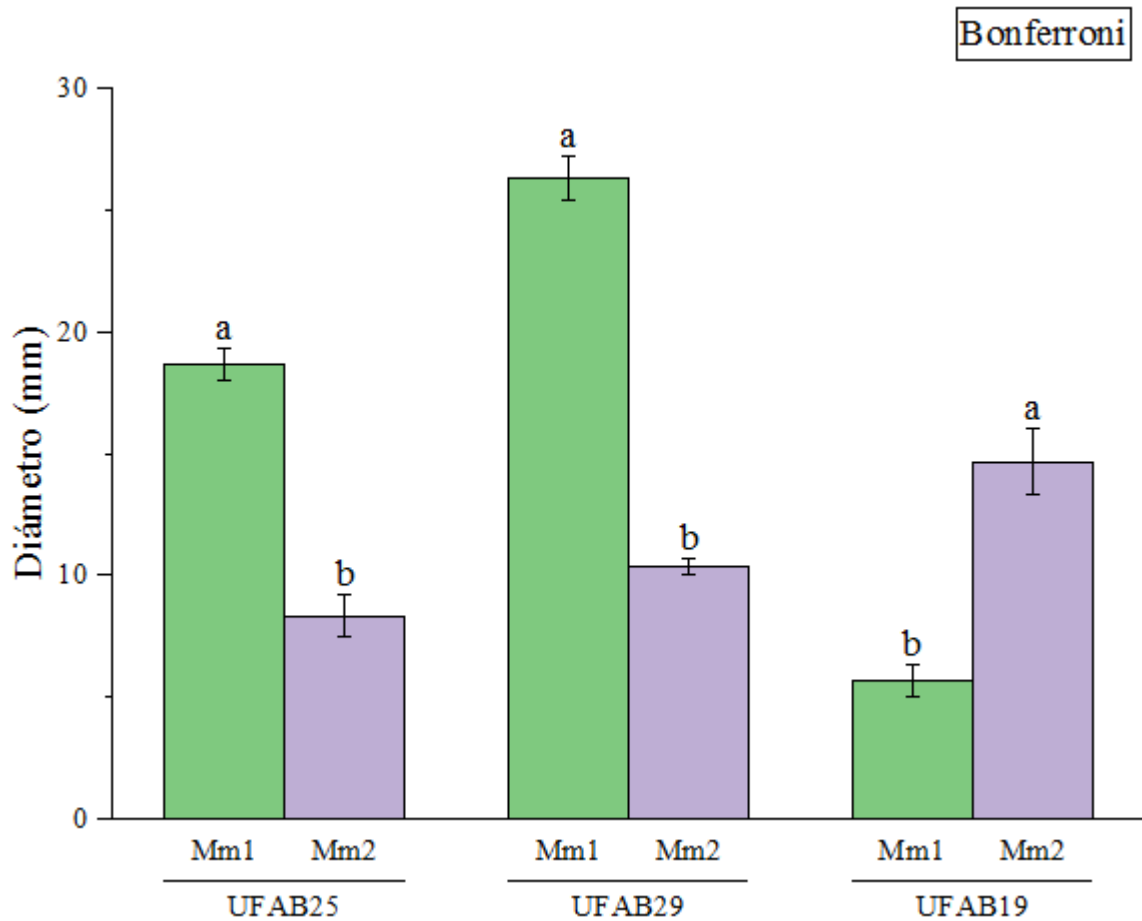
*Valores promedio de los diámetros de las zonas de desplazamiento*

Medio	Cepa	Diámetro (mm)	SD
Mm1	UFAB25	18,667	±1,1547
	UFAB29	26,333	±1,5275
	UFAB19	5,667	±1,1547
Mm2	UFAB25	8,333	±1,527
	UFAB29	10,333	±0,57735
	UFAB19	14,666	±2,3094



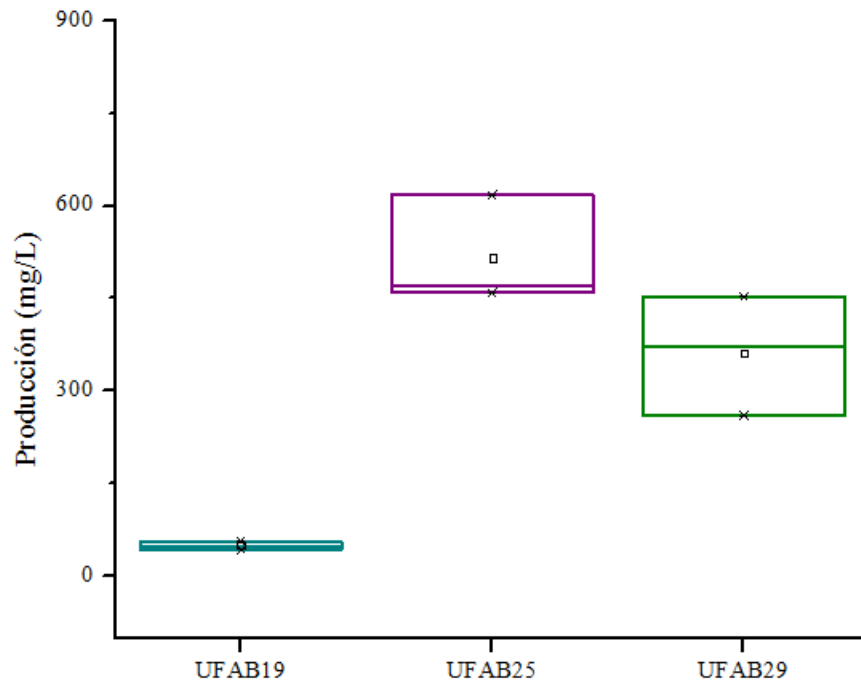
**Figura 13.** Prueba de dispersión de crudo. En la parte superior: sobrenadante de cultivos en el medio Mm1. Parte inferior: sobrenadante de Mm2. A: UFAB25, B: UFAB29, C: UFAB19. Zona de dispersión: /.

Existen diferencias significativas entre los promedios de los diámetros de dispersión para los diferentes tratamientos, ya que p-valor ( $< 0,001$ ) es menor al nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ). La interacción entre los factores; “Medio mineral” y “Cepa” son significativos (Anexo 3 y Figura 14).



**Figura 14.** Gráfico de barras de los resultados de la prueba de dispersión de crudo. Las distintas letras en los bloques de tratamiento muestran las diferencias significativas

En la Figura 15 se muestra el rendimiento de producción de biosurfactante crudo para las tres cepas empleadas en el medio Mm1. UFAB25 mostró la mayor producción (515,33 mg/L) mientras que UFAB19 y UFAB29 presentaron rendimientos promedio de 50,22 y 361,67 mg/L, respectivamente.



**Figura 15.** Diagrama de caja del rendimiento de producción de biosurfactante crudo por las cepas UFAB19, UFAB25 y UFAB29.

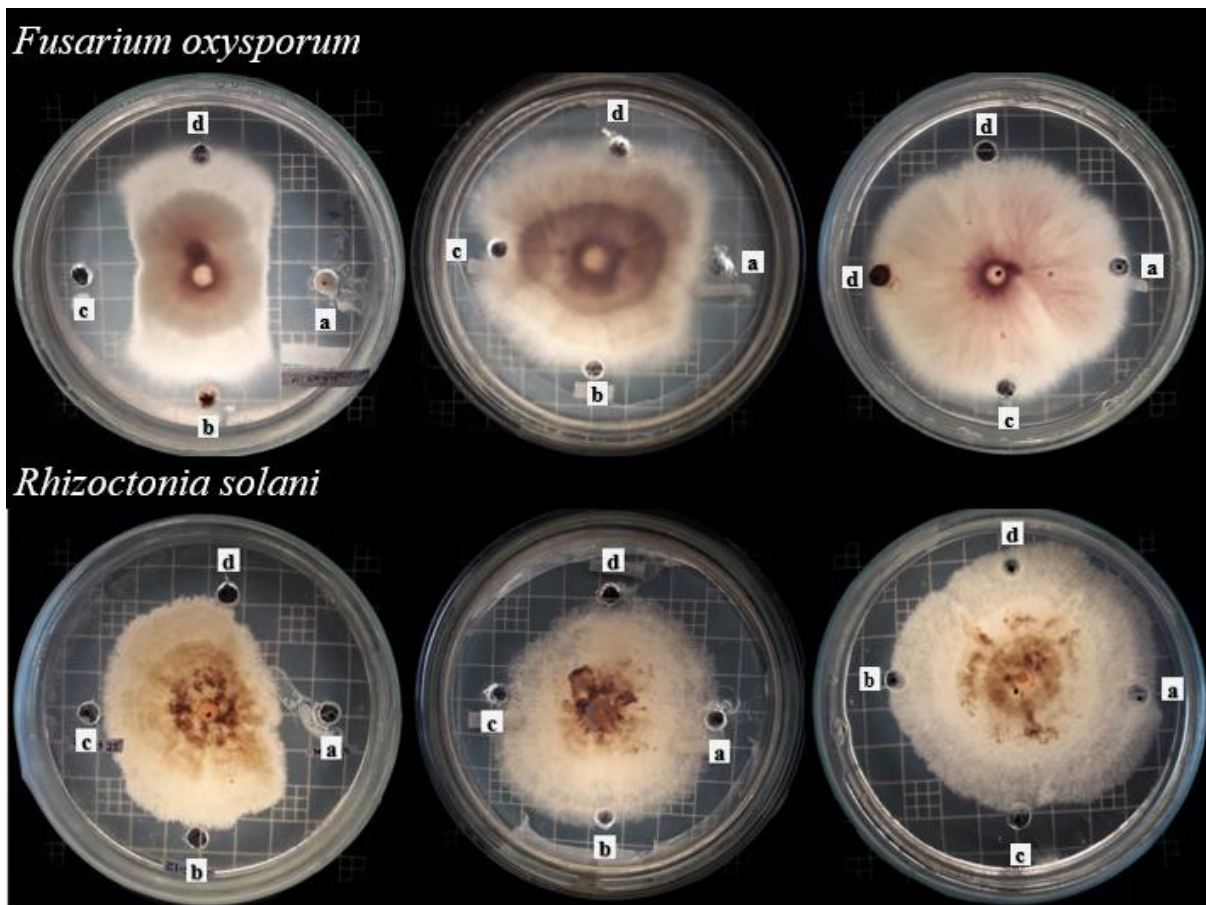
Existen diferencias significativas entre las medias de los rendimientos de producción para las tres cepas empleadas, ya que, p-valor ( $< 0,001$ ) es menor que el nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) (Anexo 4).

#### 4.5. Potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante

Los extractos de biosurfactante producidos por la cepa UFAB25 presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para *F. oxysporum* de 43.6, 40.9 y 19.7 %, mientras que para *R. solani* se determinaron porcentajes de inhibición de 34.5, 16.49 y 1,096 %, correspondientes a las soluciones de biosurfactante BS<sub>1</sub>, FOH-BS<sub>1</sub> y BS<sub>2</sub> respectivamente. Se observó una inhibición muy

baja o nula por parte de las soluciones de biosurfactante producidos por las cepas UFAB29 (*B. subtilis*) y UFAB19 (*B. licheniformis*) como se muestran en la Figura 16 y Tabla 16.

Debido a que el rendimiento (mg/L) de biosurfactante de UFAB19 en el medio Mm1 fue demasiado bajo, la cantidad de extracto resulto insuficiente para llevar a cabo las soluciones metanólicas  $BS_1$  y  $F_{OH-BS_1}$  al 50% v/v, por tanto, se realizaron las soluciones a una menor concentración. Se asume que la concentración de biosurfactante en la solución derivada de  $BS_1$  ( $F_{OH-BS_1}$ ) es prácticamente nula.



**Figura 16.** Determinación del potencial antifúngico del biosurfactante por medio del método de difusión en pozo. Parte superior *F.oxysporum*, en la parte inferior *R. solani*. Placas a la izquierda: ensayo con extractos de biosurfactante de UFAB25, placas centrales: UFAB29. Placas a la derecha UFAB19. Los pocillos contienen a:  $BS_1$ , b:  $BS_2$ , c:  $F_{OH-BS_1}$ , d: metanol (control).

**Tabla 16**

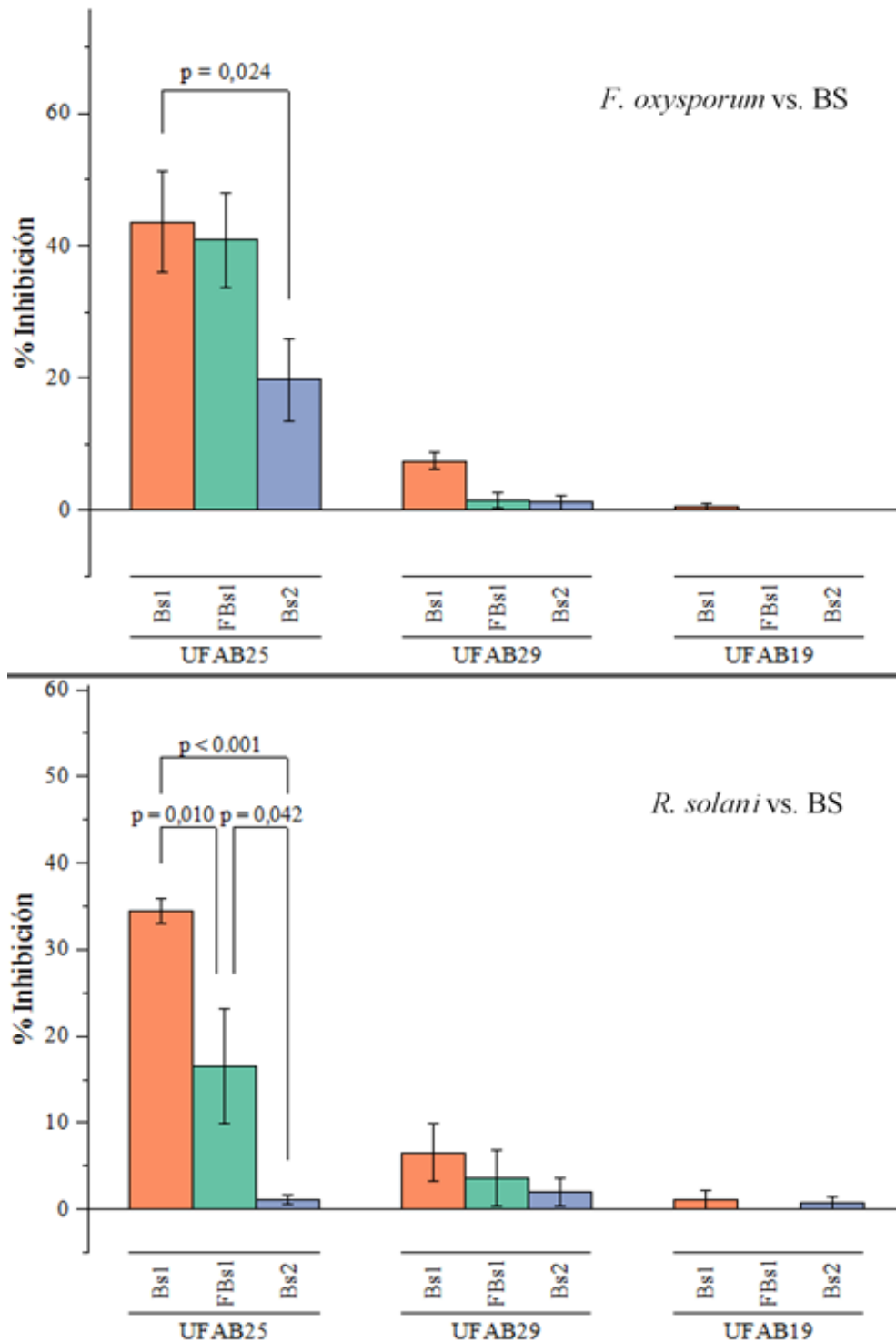
*Porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos por acción de los diferentes extractos de biosurfactante.*

Cepa	Soluciones BS	Fitopatógeno	% de inhibición	± SD
UFAB25	BS <sub>1</sub>	<i>F. oxysporum</i>	43,56	13,16
	FOH-BS <sub>1</sub>		40,90	12,38
	BS <sub>2</sub>		19,72	10,84
	BS <sub>1</sub>	<i>R. solani</i>	34,47	2,44
	FOH-BS <sub>1</sub>		16,49	11,46
	BS <sub>2</sub>		1,10	0,96
UFAB29	BS <sub>1</sub>	<i>F. oxysporum</i>	7,46	2,19
	FOH-BS <sub>1</sub>		1,49	1,97
	BS <sub>2</sub>		0,91	1,92
	BS <sub>1</sub>	<i>R. solani</i>	6,53	5,72
	FOH-BS <sub>1</sub>		3,63	5,69
	BS <sub>2</sub>		2,02	2,77
UFAB19	BS <sub>1</sub>	<i>F. oxysporum</i>	0,46	0,80
	BS <sub>2</sub>		0,10	0,17
	BS <sub>1</sub>	<i>R. solani</i>	1,12	1,95
	FOH-BS <sub>1</sub>		0	0
	BS <sub>2</sub>		0,70	1,22

Se muestra el valor promedio y desviación estándar (SD). BS= biosurfactante

Existe diferencias significativas entre los valores promedio del porcentaje de inhibición para los diferentes tratamientos respecto a cada factor, ya que los p-valores son menores al nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) (Figura 17). Se establece que la interacción entre los factores; “Soluciones de biosurfactante” y “Cepas Bacterianas” son estadísticamente significativos tanto para los ensayos realizados con *F. oxysporum* como para *R. solani* (Anexos 5 y 6).





**Figura 17.** Gráfico de barras de los resultados inhibición del crecimiento micelial por acción de los biosurfactantes (BS). Gráfica superior *F. oxysporum*, inferior: *R. solani*. Valores p menores a  $\alpha$  (0,05) indican diferentes significativa

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las cepas utilizadas fueron aisladas en estudios previos de diferentes ambientes del Ecuador como suelos contaminados con petróleo y fuentes geotermales, con altas concentraciones minerales. Bodour et al. (2003) menciona que una pequeña fracción de la comunidad microbiana es capaz de producir biosurfactante a menos que exista una presión selectiva. Los suelos contaminados con sustancias orgánicas o metales presentan mayor porcentaje de microorganismos productores de surfactante, sugiriendo una mayor presión de selección para la producción de tensoactivos.

Se realizó una prueba de hemólisis para las nueve cepas de *Bacillus* reactivadas. La actividad hemolítica ha sido ampliamente utilizada a manera de método cualitativo de la producción de biosurfactantes (Rodrigues et al., 2006; Mulligan et al., 1984 ); en algunos estudios fue la única técnica de cribado aplicada (Banat, 1993). Se confirmó al 55, 5 % (5/9) de las cepas de *Bacillus* analizadas como productoras de biosurfactantes. Por otro lado, Youssef et al. (2004 ) mencionan que en algunos casos, el ensayo hemolítico excluyó buenos productores de biosurfactantes, por lo tanto, no se pueden descartar definitivamente al resto de cepas.

Entre las bacterias que presentaron actividad hemolítica están UFAB25 y UFAB29, (*B. subtilis*); UFAB28 (*B. megaterium*); UFAB31.5 (*B. toyonensis*) y UFAB29.1 (*B. cerus*). La hemólisis generada por *B. subtilis* ha sido ampliamente reportada desde 1970 por Bernheimer & Avigad, quienes comprobaron la lisis de los hematíes por la surfactina producida por *B. subtilis*. Generalmente se asocia a algunos miembros de *B. megaterium* como no hemolíticas (Hshie et al., 2008), sin embargo, Thavasi et al. (2008) reporta una cepa de *B. megaterium* productora de biosurfactantes, tipo glicolipídicos, y con actividad hemolítica. Algunas cepas de *B. cerus* producen

lipopéptidos como micocereina (Soberón-Chávez, 2011) y fengicina (Ogena & Jacques, 2008). La capacidad hemolítica puede deberse no solo a la producción de biosurfactantes sino también a la presencia de hemolisina BL, una exotoxina ampliamente reportada en *Bacillus cereus*, con actividad hemolítica (Beecher, Schoeni, & Wong, 1995).

Se empleó un tamizaje molecular como criterio de selección de las cepas para la producción de biosurfactante y evaluación de su potencial antifúngico. Las tres cepas seleccionadas (UFAB25, UFAB29, UFAB19) presentaron resultados positivos para los genes involucrados en la producción de surfactina, fengicina y lichenisina (Tabla 14). Con base en la identificación de los genes codificantes de los lipopéptidos antimicrobianos, es posible estudiar la relación entre sus productos y la actividad antagonista. El aislamiento e identificación de nuevas cepas de *Bacillus* productoras de antimicrobianos es un área de investigación prometedora. Sin embargo, los métodos convencionales de cribado, en grupos grandes de microorganismos aislados de fuentes naturales, basados en su actividad antifúngica directa son laboriosos y demorados (Farzand et al., 2019), por eso es crucial el uso de marcadores moleculares, para la detección de genes en la selección de potenciales controladores biológicos (Tapi et al., 2010; Athukorala et al., 2009).

Durante el tamizaje molecular realizado, todas las cepas de *B. licheniformis* presentaron el gen Lich-AA, involucrado en la síntesis de lichenisina. Madslie et al., (2013) determinó que la gran mayoría de cepas de *B. licheniformes* lo tienen, indicando que gran parte, si no todas, son capaces de producirla. La lichenisina puede ser empleada como agente tensoactivo en extracción de metales, procesos de biorremediación, industria textil, papelera, alimenticia y controlador de biofilms de organismos patógenos, entre otros (Coronel-León et al., 2015; Coronel-Leon, Marques,

Bastida, & Manresa, 2015). Otro lipopéptido reportado para *B. licheniformis* es surfactina (Yiming, Shizhong, & Bozhong, 2010).

La cepa UFAB25 (*B. subtilis*) resultó positiva para los genes *sfp* y *srfAA* asociados a la producción de surfactina, así como para el gen *fenB* involucrado en la biosíntesis de fengicina. Se ha determinado que algunas cepas del género *Bacillus* puede producir una gran variedad de lipopéptidos antimicrobianos bajo un complejo sistema de regulación influenciado por factores bióticos y abióticos (Stein, 2005; Benitez et al., 2011). La producción simultánea de fengicina y surfactina por miembros de la especie *B. subtilis* ha sido ampliamente documentada (Ongena 2007, Plaza 2015), incluso se ha reportado la coproducción de surfactina, fencina e iturina A, aunque resulta muy inusual (Kim et al., 2010). La coproducción de lipopéptidos puede generar efectos sinérgicos sobre sus actividades biológicas (Perez et al., 2017).

Para comprobar la producción de biosurfactante en los medios Mm1 (Mnif et al., 2013) y Mm2 (Sheshtawy et al., 2015) se empleó la prueba de dispersión de crudo. Youssef et al. (2004) mencionan que se trata de un método confiable para detectar su producción. Esta técnica es una forma rápida y económica para medir directamente la actividad superficial de los biosurfactantes presentes en el medio libre de células. El diámetro de la zona de dispersión se correlaciona con la capacidad de los cultivos para reducir la tensión superficial (Morikawa et al., 2000). Por lo tanto, el biosurfactante con mayor actividad tensoactiva es el producido por la cepa UFAB29 (*B. subtilis*) en el medio Mm1 ya que presentó el mayor diámetro de zona de dispersión (26mm).

Se obtuvieron diferentes medidas de dispersión de crudo para una misma cepa al emplear medios de producción distintos. Se podría suponer que el perfil (concentración y/o tipo) de biosurfactantes sintetizados por la misma cepa varía de acuerdo al medio empleado, ya que el diámetro de la zona clara en la superficie del crudo se relaciona con la concentración y tipo de biosurfactante en la solución (Youssef et al., 2004).

La producción en el medio Mm1, usado en la síntesis de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* (Mnif et al., 2013; Mnif et al., 2015), y en el medio Mm2, empleado para la fabricación de lichenisina por *B. licheniformis* (El-Sheshtawy et al., 2015), presentan condiciones completamente diferentes de oxigenación así como de composición (concentraciones de iones y fuentes de nitrógeno y carbono). El rendimiento promedio de producción en el medio optimizado Mm1 fue de 515 mg/L y de 361 mg/L para las cepas UFAB25 y UFAB29 (*B. subtilis*) respectivamente; para UFAB19 (*B. licheniformis*) fue de apenas 50 mg/L. Mientras que en el medio Mm2 descrito por El-Sheshtawy et al., (2015), el rendimiento de UFAB19 fue superior, en concordancia con lo reportado por Jarrín (2018).

Los rendimientos obtenidos por UFAB25 (*B. subtilis*) de 515 mg/L son similares a los generados por Vater et al., (2002) para la cepa *B. subtilis* C-1, aislada de lodo de petróleo, con una producción de 547 mg/L. Ghribi, & Ellouze-Chaabouni (2011) lograron 720 mg/L de biosurfactante a partir de la cepa *Bacillus subtilis* SPB1, al incrementar la concentración de glucosa a 40 g/L. Las condiciones de producción y extracción de las dos investigaciones mencionadas fueron semejantes a las realizadas en este estudio.

Los extractos de biosurfactante producidos por UFAB25, cepa nativa del Ecuador identificada previamente como *B. subtilis* (16S) por Varela (2017), inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en  $43,6 \pm 13$  y  $34,47 \pm 2$  % respectivamente. El estudio realizado por Cazorla et al., (2007) menciona dos cepas de *B. subtilis*, cuyos extractos orgánicos inhibieron el crecimiento de *R. solani* y especialmente de *F. oxysporum*, estableciendo la capacidad de control biológico, estrechamente relacionada con la producción de lipopéptidos antifúngicos. El potencial de los biosurfactantes de *B. subtilis* para combatir a varias especies del género *Fusarium* han sido reportada previamente (Mnif et al., 2015; Ramarathnam et al., 2007). Mnif et al. (2015) indican que la inhibición del fitopatógeno se debe a la lisis del micelio en exceso y a la polinucleación y destrucción de las esporas por los lipopéptidos.

Entre los metabolitos producidos por *B. subtilis* con actividad antimicótica se encuentra los lipopéptidos de las familias de la fengicina e iturina, mientras que a las surfactinas se les atribuye potencial antibacteriano (Ogena & Jacques, 2008). Estos compuestos interaccionan con las membranas celulares de los microorganismos fitopatógenos generando la formación de poros y un desbalance osmótico resultando en muerte celular (Liu et al., 2014). El mecanismo de acción de la iturina se basa en la perturbación osmótica debido a la formación de poros conductores de iones de  $K^+$  fungitóxicos. La surfactina produce la ruptura y solubilización de las membranas. La fengicina altera la bicapa lipídica de la estructura de la membrana celular y afecta su permeabilidad (Farzand et al., 2019; Ogena & Jacques, 2008).

La cepa UFAB29 reportada como *B. subtilis* (16S) solo presentó los marcadores genéticos asociados a la surfactina y no mostró inhibición relevante contra los dos hongos fitopatógenos. Según Peypoux et al. (1999), la surfactina por sí sola no es antifúngica, por lo cual se podría

comprender la acción nula presentada. Perez et al. (2017) reportaron la cepa *Bacillus sp.* C3, positiva para el gen *sfp*, tuvo acción casi nula contra los microorganismos probados, incluyendo *F. oxysporum*. De forma similar, Farzand et al. (2019) determinaron que la cepa *B. subtilis* OKB105, positiva para surfactina, fue inefectiva para inhibir el crecimiento micelial de hongos filamentosos.

Se observaron diferencias en la actividad antifúngica de los lipopéptidos sintetizados por la cepa UFAB25 en los dos medios de cultivo (Tabla 16), junto con los resultados obtenidos de la prueba de dispersión de crudo y rendimiento de producción sugiere la influencia de las condiciones de cultivo en el perfil del biosurfactante. Coronel-León et al. (2015) mencionan que la naturaleza de la fuente de carbono, concentración de sales en el medio y las condiciones operativas como temperatura, agitación y disponibilidad de oxígeno intervienen en la naturaleza y cantidad del biosurfante sintetizado.

Se emplearon cepas nativas del Ecuador, del género *Bacillus*, aisladas de fuentes geotermales y suelos contaminados, para la producción de biosurfactantes y evaluación de su potencial antifúngico. Las cepas nativas presentan una ventaja para la síntesis de biopesticidas o como biocontroladores gracias a la capacidad de permanencia de los biosurfactantes y organismos en el suelo, ya que podría existir una adaptabilidad a las condiciones ambientales (Guigón-López & González-González, 2004).

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La cepa UFAB25 de *Bacillus subtilis* presentó los genes *sfp* y *srf-AA* involucrados en la producción de surfactina, así como el gen *fenB* de fengicina.

La cepa UFAB29 de *Bacillus subtilis* resultó positiva para los genes *sfp* y *srf-AA* implicados en la biosíntesis de surfactina.

Todas las cepas de *Bacillus licheniformis*, UFAB18, UFAB19 y UFAB37, mostraron el gen *Lich-AA* asociado a la producción de lichenisina.

Se demostró la producción de biosurfactantes por las cepas UFAB25, UFAB29 y UFAB19 en los medios minerales descritos por Mnif et al. (2013) y El-Sheshtawy et al. (2015) mediante la prueba de dispersión de crudo.

El rendimiento de biosurfactante en el medio mineral optimizado descrito por Mnif et al. (2013) para cada una de las tres cepas de *Bacillus* empleadas fue: UFAB25 (515,33 mg/L ), UFAB29 (361,67 mg/L) y UFAB19 ( 50,22 mg/L).

El biosurfactante producido por UFAB25 (*B. subtilis* ) en el medio descrito por Mnif et al. (2013) generó la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* y *Rizhoctonia solani* mediante la prueba de difusion en pozo.

No se observó inhibición de los hongos fitopatógenos por parte de los biosurfactantes obtenidos a partir de UFAB29 (*B. subtilis*) y UFAB19 (*B. licheniformis*).

Los resultados obtenidos en la prueba de dispersión de crudo y la actividad antifúngica de los lipopéptidos sintetizados por UFAB25 (*B. subtilis*) en los dos medios minerales empleados,



sugieren que el perfil (concentración y tipo) de lipopéptidos producidos por UFAB25 es diferente dependiendo de las condiciones de cultivo y composición del medio.

Los extractos de biosurfactante producidos por cepa UFAB25 (*B. subtilis*), positiva para los genes involucrados en la producción de surfactina y fengicina, inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *R. solani*, mientras que los producidos por UFAB29 (*B. subtilis*) y UFAB19 (*B. licheniformis*), positivas para los genes asociados a la surfactina y lichenisina respectivamente, no inhibieron el crecimiento de los hongos, por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada.

## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Realizar análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) que permita caracterizar los extractos crudos de biosurfactante, e identificar los lipopéptidos extraídos a partir del cultivo de las diferentes cepas de *Bacillus* analizadas.

Optimizar los protocolos de producción y extracción de biosurfactante, empleando como variables de cultivo: fuentes de carbono y nitrógeno, nivel de oxigenación, concentraciones de iones y temperatura. Esto permitirá mejorar el rendimiento y el escalado de los procesos hacia biorreactor.

Para el tamizaje molecular se recomienda amentar los marcadores empleados, incluyendo genes involucrados en la producción de otros lipopéptidos como iturina, bacillomicina, bacilisin, micosubtilina, subtilina, etc. Para la estandarización de PCRs se recomienda el uso de controles positivos como cepas ATCC.

Realizar ensayos *in vivo* de la actividad antifúngica de los extractos de biosurfactante así como de las cepas de *Bacillus* analizadas. Se recomienda incursionar en proyectos de investigación dirigidos a la resistencia sistémica inducida en plantas y la capacidad que poseen ciertas cepas de *Bacillus* y sus lipopéptidos para elicitar este sistema defensivo.

## CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

Acuña, I., & Tejada, P. (2019). *Manual Interactivo de la Papa INIA-CHILE*. Obtenido de Enfermedades Causadas por Hongos: <http://manualinia.papachile.cl/?page=manejo&ctn=214>

Agrocalidad. (2017). *Coodinación General de Registros de Insumos Agropecuarios-Plaguicidas Registrados*. Quito: Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario.

Agrocalidad. (2018). *Plaguicidas Prohibidos en el Ecuador* . Quito: Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario.

Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova Publicación Científica en Ciencias Biomedicas* .

Aspelin, A. (1997). *Pesticides Industry Sales and Usage: 1994-95 Market Estimates*. . Washington, DC.: U.S. Environmental Protection Agency,.

Athukorala, S., Fernando, W., & Rashid, K. (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian J. Microbiol.* 55, 1021-1032.

Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* SP . *Biotechnology Letters* 15(6), 591-594.

Beecher, D., Schoeni, J., Wong, A. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *American Society for Microbiology Journals* 63(11), 4423–4428.

- Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafaña-Rojas, J., Martinez-Rodriguez, A., Chavez-Castrillon, Y. Y., Espinosa-Escalante, F. M., & Beltran-Garcia, M. J. (2017). Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria. *Fermentation Processes*, 200-222.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., . . . Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *American Society for Microbiology*, 4883–4890.
- Bernheimer, A. W., & Avigad, L. S. (1970, 06). Nature and Properties of a Cytolytic Agent Produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 61(3), 361-369.
- Bodour, A., Drees, K., & Maier, R. (2003). Distribution of biosurfactant producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* 69, 3280-3287.
- Borriss, R. (2011). *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. En D. Maheshwari, *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. (págs. 41-76). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Boutati, E., & Anaissie, E. (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: Ten years' experience at a cancer center and implications for management. *BLOOD*, 999-1008.
- Cáceres, T., Ying, G., & Kookana, R. (2002). Sorption of pesticides used in banana production on soils of Ecuador . *Australian Journal of Soil Research* , 1085-1094.

- Cadena, G. (2007). Determinación de los índices ambientales por contaminación del uso de pesticidas agrícolas en la plantaciones de banano del sector el Tengel – Provincias del Guayas. *Universidad de Guayaquil -Facultad de Ingeniería Química* .
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva, G., Uad, I., & Gonzales, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Enviroment*, 3634-3640.
- Castelló Orvay, F. (1993). *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Barcelona: Publicacions Univesitat de Barcelona.
- Cazorla, F., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B., Vicente, A. D., & Bloemberg, G. (2007). Isolation and Characterization of Antagonistic *Bacillus subtilis* Strains from the Avocado Rhizoplane Displaying Biocontrol Activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1950-1959. .
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). Plant extracts used as biocontrol with emphasis on *Piperaceae* family. A review. *Agronomía Colombiana* 26(1), 97-106.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. . *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J., Lakshman, D., & Lydon, J. (2008). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Appl Microbiol Biotechnol* , 115–123.

- Coronel-León, J., Grau, G. D., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., & Marqués, A. M. (2015). *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: Production, chemical characterization and and properties. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2065-2078.
- Coronel-Leon, J., Marques, A., Bastida, J., & Manresa, A. (2015). Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of Applied Microbiology*, 99-111.
- Da Ros, G. (1995). *La contaminación de aguas en Ecuador: una aproximación económica*. Quito: Editorial Abya Yala.
- Dawson, A., Eddleston, M., Senarathna, L., Mohamed, F., Gawarammana, I., & Bowe., S. M. (2010). Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: A prospective cohort study. *PLoS Medicine*, 1–10.
- De La Rosa, N., Sánchez, E., & Ortiz, M. L. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 47-67.
- Dyakov, Y. T., Dzhavakhiya, V. G., & Korpela, T. (2007). *Comprehensive and molecular phytopathology*. . Elsevier.
- El Telégrafo. (12 de 29 de 2016). *13 Laboratorios producen biocontroladores* Obtenido de El Telegrafo: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/13-laboratorios-producen-biocontroladores>
- Elliott, M. (2010). Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* . *PALMAS* 31(1), 366-375.

- El-Sheshtawy, H., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 155-162.
- Emans, H., Beek, M., & Linders, J. (1992). Evaluation system for pesticides. *Agricultural pesticides*.
- Farzand, A., Moosa, A., Zubair, M., Khan, A. R., Hanif, A., Tahir, H. A., & Gao, X. (2019). Marker assisted detection and LC-MS analysis of antimicrobial compounds in different *Bacillus* strains and their antifungal effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 133, , 91-102. .
- Freire, J., & Sato, M. (1999). Conservación de Cultivos de Rizobios. *Revista Latinoamecana de Microbiología*, 35-41.
- Galli, G., Rodriguez, F., Cosmina, P., Pratesi, C., Nogarotto, R., de Ferra, F., & Grandi, G. (1994 ). Characterization of the surfactin synthetase multi enzyme complex. . *Biochim Biophys Acta* 1205, 19-28.
- Ghribi, D., & Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6. .
- Ghribi, D., Elleuch, M., Abdelkef, L., & Ellouze-Chaabouni, S. (2012). Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. *Journal of Stored Products Research*, 68-72.

- Gondal, A. S., Rauf, A., & Naz, F. (2019). Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan. *Scientific Reports*, 9(1).
- Gordon, T. R., & Martyn, R. D. (1997). The Evolutionary Biology Of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1), 111-128.
- Guigón-López, G., & González-González, P. (2004). Selección de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. con Actividad Antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y Promotoras de Crecimiento en el Cultivo de Chile. *Revista mexicana de fitopatología* 22(1), 117-124.
- Hidalgo, J. (2017). *La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola*. Quito: Tesis de postgrado.
- Hsieh, F., Li, M., Lin, T., & Kao, S. (2004). Rapid Detection and Characterization of Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. *Current Microbiology*, 49(3), 186–191.
- Jarrín, A. (2018). *Biosurfactante producido a partir de B. licheniformis aislado de la fuente geotermal aguas hediondas, Carchi*. Sangolquí: Tesis Pregrado.
- Jarrín, F. (2010). Protocolo de extracción de ADN de bacterias y hongos CTAB-Modificación del Centro Internacional de la PAPA. En A. Carrera, C. Yáñez, & E. Morillo, *Uso y conservación de la biodiversidad de cepas de Azospirillum spp. para la producción y validación de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la Sierra del Ecuador* (pág. 32). Quito: INIAP.
- Javaheri, M., Jenneman, G., McInerney, M., & Knapp, R. (1985). Anaerobic production of a biosurfact by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 698-705.



- Johnsen, K., Jacobsen, C., Torsvik, V., & Sørensen, J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. *Biology and Fertility of Soils*, 443-453. .
- Kasim, M., Salim, H., Mahdi, E., Majid, H., & Jalal, M. (2018). Antifungal activity of alcoholic extract of *Juglans regia* against phytopathogenic *Rhizoctonia solani*. *Chemistry Research Journal* 3(4), 105-109.
- Kim, P., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, H., Kim, Y., . . . Chi, Y. (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 942–949.
- Litsinger, J. (1989). Second generation insect pest problems on high yielding rices. *Tropical Pest Management* 35, 235–242.
- Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-Moussa, H., & Avis, T. (2014). Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biology* 118(11), 855-861.
- López, F., Obiols, J., & Subás, P. (1998). Plaguicidas agrícolas y salud . En I. Morell, & L. Candela, *Plaguicidas: aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos* (págs. 273-295). Madrid: Publicacions de la universitat Jaume I.
- Madslie, E., Rønning, H., Lindbäck, T., Hassel, B., Andersson, M., & Granum, P. (2013). Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 168-180.
- MAGAP. (10 de 05 de 2013). *NIAP inauguró laboratorio de Control Biológico e informó resultados de investigación sobre plagas*. Obtenido de Ministerio de Agricultura, Ganadería,

Acuicultura y Permacultura: <https://www.agricultura.gob.ec/iniap-inauguro-laboratorio-de-control-biologico-e-informo-resultados-de-investigacion-sobre-plagas/>

Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. Mexico, D.F.: Editorial Reverte.

Millas, P., & France, A. (2017). *Fitopatología – Enfermedades en hortalizas: Marchitez vascular en tomate. Ficha Técnica 73*. Quilamapu : INIA Ministerio de Agricultura de Chile.

Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Ali Triki, M., Manresa, A., & Dhouha, G. (2015). Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environ Sci Pollut Res*.

Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2013). Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants' potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environ Sci Pollut Res*.

Mofid, M., Finking, R., Essen, L., & Marahiel, M. (2004). Structure based mutational analysis of the 40 phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism. *Biochemistry* 43, 4128-4136.

Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY*, 213-223.

Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) . Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488(3), 211-218.

- Moss, M. O., & Smith, J. E. (2011). *The Applied mycology of Fusarium: Symposium of the British Mycological Society, held at Queen Mary College, London, September 1982*. . London: Cambridge University Press.
- Mulligan, C., Cooper, D., & Neufeld, R. (1984). Selection of microbes producing. *Journal of fermentation technology* 62(4), 311-314.
- Ogena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 115-125. .
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29-38.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., . . . Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), , 1084-1090.
- Parmeter, J. R. (1970). *Rhizoctonia solani, Biology and Pathology*. Los Angeles: University of California Press.
- Perdomo, R., Hernández, A., González, A., & Alezones, J. P. (2007). Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia*, 48-55.
- Perez, K. J., Viana, J. D., Lopes, F. C., Pereira, J. Q., Santos, D. M., Oliveira, J. S., . . . Nardi, R. M. (2017). *Bacillus* spp Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. *Frontiers in Microbiology*, 8(61), 1-14.

- Peypoux, F., Bonmatin, J., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 553–563.
- Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. (2003). *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 315-325.
- Płaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K., & Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. . *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1023-1034.
- Pretorius, J., & Van Der Watt, E. (2015). Antifungal Substances from wild plants for development of natural fungicides. En G. Sangeetha, K. Vadivel, & J. Jayaraman, *Sustainable crop disease management using natural products* (págs. 96-98). Boston: CAB International.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W. D., Xuewen, G., & Kievit, T. D. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 901-911.
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., Mei, H. C., & Oliveira, R. (2006). Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 53(1), 105-112. .
- Sacramento, C. (2008). Department of pesticide regulation “What are the Potential the Potential Health Effects of Pesticides?” Community Guide to Recognizing and Reporting Pesticide Problems. 27–29.

- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: Cold Spring Harbor .
- Satpute, S., Bhawsar, B., Dhakephalkar, P., & Chopade, B. (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria . *Indian Journal of Marine Sciences* 37(3), 243-250.
- Sieber, S., & Marahiel, M. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* 105, 715-738.
- Simonettia, E., Hernández, A., Kerber, N., Pucheu, N., Carmona, M., & García, A. (2012). Protection of canola (*Brassica napus*) against fungal pathogens by strains of biocontrol rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*,22(1), 111-115.
- Soberón-Chávez, G. (2011). *Biosurfactants From Genes to Applications*. Münster: Springer Berlin Heidelberg.
- Sukhwani, A. (1995). *Patentes naturistas*. Madrid: Oficina Española de Patentes y Marcas .
- Tendulkar, S., Saikumari, Y., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T., Balaram, P., & Chattoo, B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, 2331–2339 .
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Ibrahim, M. B. (2008). Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 917–925.

- Tiryak, O., & Temur, C. (2010). The Fate of Pesticide in the Environment . *J. Biol. Environ. Sci*, 29-38.
- Torre, H. (2002). *Manual de las enfermedades m-s importantes de la Papa en el Peru*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Torres, D., & Capote, D. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental . *Ecosistemas- Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente: 13(3)*, 2-6.
- Tredway, L. P., & Burpee, L. L. (2001). Rhizoctonia Diseases of Turfgrass. . *The Plant Health Instructor*.
- Trujillo, O. (2006). *Analisis de pesticidas por cromatografia de gas un modelo operacional*. Bogota: Universidad Nacional de Colombia.
- Van der Werf, H. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment . *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 81-96.
- Varela, C. (2017). *Evaluación del efecto de las nanopartículas metálicas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana de suelos contaminados con TPHs (fenantreno) a nivel de laboratorio*. Sangolquí: Tesis pregrado.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 Isolated from Petroleum Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210-6219.

- Ware, G. (1980). Effect of pesticides on non-target organisms. *Residue Reviews*, 173–201.
- Wharton, P., Kirk, W., Berry, D., & Snapp, S. (2007). *Rizoctonia stem canker and black scurf potato*. Michigan: Michigan State University.
- Wilson, C., & Clem, T. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics* 39, 449–462.
- Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. En R. Chandra, B. Gurjar, & J. Govil, *Environmental Science and Engineering Edition: Vol. 6: Toxicology* (págs. 140-158). USA: Studium Press LLC.
- Yanggen, D., Cole, D., Crissman, C., & Sherwood, S. (2003). Human Health, Environmental, and Economic Effects of Pesticide Use in Potato Production in Ecuador. *Centro Internacional de la Papa (CIP)*.
- Yiming, L., Shizhong, Y., & Bozhong, M. (2010). The Surfactin and Lichenysin Isoforms Produced by *Bacillus licheniformis* HSN 221. *Analytical Letters* 43(6), 929-940.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & Mcinerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339-347. .

