UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Diseño y evaluación de un prototipo de formulación a partir de Bacilos Aerobios Formadores de Endosporas (BAFEs) para el control de *Botrytis cinerea* en rosas

Kelly Patricia Piraquive Riveros

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrado Interfacultades de Microbiología
Bogotá, Colombia
2019

Diseño y evaluación de un prototipo de formulación a partir de Bacilos Aerobios Formadores de Endosporas (BAFEs) para el control de *Botrytis cinerea* en rosas

Kelly Patricia Piraquive Riveros

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Microbiología

Director:

Ph.D. Daniel Uribe Velez

Codirector:

M.Sc. Helber de Jesús Barbosa

Línea de Investigación:

Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias,

Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2019

A mis padres Fabio e Isabel quienes cobijaron con amor infinito a José Manuel.
A Mauro por su presencia en mi ausencia, su amor, apoyo constante y paciencia sin límites.
A mis hermanos Alex (un gladiador, hasta el final) y Andrea (calma ante la adversidad)
A José Manuel, pequeño maestro….mi tiempo vuelve a ser tuyo.

A todas las mamás que conocí durante esta travesía…sus historias de vida y ejemplo fueron mi inspiración.

Agradecimientos

A Dios, la fuerza de todos los días.

A mis padres, hermanos, esposo e hijo…estas líneas que hoy se escriben son la respuesta a su apoyo.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional y a todo su personal, por la gestión y las facilidades brindadas para poder desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

Al profesor Daniel Uribe Vélez, director del grupo de Investigación en Microbiología Agrícola, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su equipo, por sus enseñanzas tanto a nivel profesional como personal, su paciencia y por su incansable esfuerzo para que sus estudiantes busquen siempre la excelencia y se conviertan en la mejor versión de sí mismos.

Al profesor Helber Barbosa, por su asesoría y acompañamiento durante todo el trabajo.

A la profesora María Teresa Reguero directora curricular del programa de maestría por toda su colaboración.

A Tatiana Gómez y Sergio Aponte, miembros del departamento técnico de Gestiones y Representaciones Chía S.A.S, por su infinita ayuda y disposición al proporcionar el material vegetal para este estudio y por haber suministrado información importante para la realización de las pruebas.

A Ronnal Ortiz, por la asesoría en el análisis estadístico.

A Socorro Prieto (Soco), gran ejemplo de lucha… gracias por escucharme, aconsejarme y tu infinita disposición para ayudarme siempre, incondicionalmente y con la mejor actitud.

A mis compañeros de laboratorio: Gloria, Laura, Nicolás, Paula, Pilar y en especial a Vane y a Luz Adriana (futuras PhD, verdaderos ejemplos de determinación y empeño), que estuvieron siempre para darme una mano, orientarme y darme ánimo con sus palabras.

A Don Alvaro Rincón (Fermentaciones) por su ayuda incondicional.

A Ximena Rojas del Laboratorio de Microbiología, por su colaboración durante la fase de formulación y montaje de pruebas. A Don Julio, Yolanda, Cesar y Andrés, por toda su colaboración.

Resumen

Diferentes cepas de Bacilos Aerobios Formadores de Endospora (BAFEs) han mostrado actividad biocontroladora contra fitopatógenos por mecanismos como producción de metabolitos secundarios, competencia por espacio y nutrientes y producción de compuestos orgánicos volátiles. En este estudio se evaluaron 12 cepas de BAFEs, de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional con el fin de desarrollar un prototipo de formulación líquida que tuviera actividad de biocontrol contra *Botrytis cinerea.* Mediante ensayos *in vitro*, se evidenció la capacidad antagonista de las BAFEs con porcentajes de inhibición superiores al 90% en diez aislamientos diferentes de *Botrytis cinerea*. Adicionalmente se determinó su potencial biocontrolador mediante evaluación preventiva en pétalo, evidenciando disminución significativa en incidencia y severidad de la enfermedad con 3 de las 12 cepas evaluadas. Teniendo en cuenta los resultados de antagonismo y pruebas *in vivo* con varias repeticiones en el tiempo, se seleccionó la cepa IM2C6 (*Bacillus velezensis*) para el desarrollo del prototipo de formulación. Los polímeros utilizados para los prototipos (PEG y PVP) no afectaron la viabilidad celular de la cepa IM2C6, obteniéndose viabilidades celulares con rangos de $5x10^8$ a $9x10^8$UFC mL^{-1} después de 120 días de formulación. El porcentaje de eficacia en control de la enfermedad fue significativamente más alto (superior al 70%) en los prototipos almacenados a 4°C siendo el prototipo formulado con PVP (prototipo 4) junto al prototipo sin adición de excipientes (prototipo 5) los que presentaron los mejores valores en cuanto a índice de severidad (0,6 y 0,3 respectivamente). Los resultados aquí obtenidos, permiten proponer a los prototipos de formulación líquidas de BAFEs 4 y 5 cuyo principio activo es la cepa IM2C6 identificada como *Bacillus velezensis* como una alternativa de control de *Botrytis cinerea* en rosas de corte.

Palabras clave: (control biológico, antagonismo, BAFEs, *Botrytis cinerea*, polímeros, formulación).

Abstract

Different isolates of Aerobic Endospore Forming Bacteria (AEFB) have shown biocontrol activity against plant pathogens by different mechanisms such as antibiosis, competition for space and nutrients and production of volatile organic compounds. In this study, 12 AEFB isolates from the Agricultural Microbiology Laboratory of IBUN were evaluated in order to develop a liquid formulation prototype to control *B.cinerea. In vitro* test showed the antagonistic capacity of AEFB with inhibition percentages above 90% in 10 different isolates of *B.cinerea*. In addition, preventive test were performed on rose petals resulting in a significative decrease on incidence percentage and severity index of the disease on 3 out of 12 AEFB isolates. According to the *in vitro* an *in vivo* results, isolate IM2C6 (*Bacillus velezensis*) was selected for the prototype formulation. The polymers used in the prototypes (PEG and PVP) did not affect viability of the selected isolate. Cell concentrations after 120 days of formulation were among $5x10^8$ – $9x10^8$ CFU mL^{-1}. The percentage of disease control was significantly superior (above 70%) on prototypes stored at 4°C compared to 25°C. Prototype formulated with PVP (P4) and prototype without excipients (P5) exhibited the best control values on severity disease index (0,6 and 0,3 respectively). These results show that prototypes based on IM2C6 *B.velezensis* can be used as an alternative for control of *B.cinerea* on roses.

Keywords: biological control, antagonism, AEFB, *Botrytis cinerea,* polymers, formulation

Contenido

Pág.

1. MARCO TEÓRICO 5
1.1 El sector floricultor en Colombia 5
1.1.1 Cifras de exportacion y producción en cultivo de rosa 6
1.1.2 Problemas fitosanitarios en rosa 7
1.1.2.1 *Botrytis cinerea* en rosas 7
1.2 Botrytis cinerea 8
1.2.1 Biología 8
1.2.2 Ciclo de enfermedad 9
1.2.3 Caracterización de poblaciones de *Botrytis* 11
1.2.4 Importancia económica y científica 12
1.2.5 Estrategias empleadas en el control de *Botrytis* 13
1.2.5.1 Control químico 13
1.2.5.2 Control cultural 14
1.2.5.3 Control biológico 15
1.3 *Bacillus* en control biológico de *Botrytis* 16
1.3.1 Mecanismos de control de *Bacillus* 16
1.3.1.1 Antibiosis 17
1.3.1.2 Producción de enzimas líticas 18
1.3.1.3 Competencia por espacio y nutrientes 18
1.3.1.4 Producción de compuestos orgánicos volátiles 19
1.4 Medios de cultivo para producción de microorganismos 19
1.5 Formulaciones en control biológico 22
1.5.1 Tipos de formulación 22
1.5.1.1 Suspensiones 22
1.5.1.2 Características de las suspensiones concentradas 23
1.5.1.3 Dispersiones en aceite 23
1.5.1.4 Emulsiones 23
1.5.2 Excipientes utilizados en formulación 24
1.5.2.1 Uso de excipientes en formulación de *Bacillus* 24
1.6 Proceso de desarrollo de un bioplaguicida 25
1.6.1.1 Compatibilidad principio activo – excipientes 26
1.6.2.1 Concentración y viabilidad del agente biocontrolador 27
1.6.2.2 Contenido de contaminantes 27
1.6.2.3 Estabilidad del bioformulado en condiciones de almacenamiento 27
1.6.2.4 Pruebas de eficacia 28
1.7 Productos comerciales con *Bacillus* como principio activo 28
1.8 Antecedentes del grupo 29

2. OBJETIVOS 31

2.1 Objetivo general 31
2.2 Objetivos específicos 31

3. MATERIALES Y MÉTODOS 33
3.1 MICROORGANISMOS EMPLEADOS 33
3.1.1 Bacilos Aerobios Formadores de Endospora - BAFEs 33
3.1.2 Aislamientos de *Botrytis* sp. 34
3.2 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS BAFES CONTRA *Botrytis* sp. 35
3.2.1 Evaluación de la actividad antagonista de las BAFES en condiciones *in vitro* ..35
3.2.2 Experimentos de biocontrol en condiciones *in vivo* en pétalos de rosa variedad Vendela. 35
3.2.2.1 Material vegetal 36
3.2.2.2 Evaluación de actividad antagonista en pétalos de rosa 36
3.2.2.3 Pruebas con suspensión de esporas 36
3.2.2.4 Pruebas con suspensión de esporas más sobrenadante 37
3.2.3 Identificación molecular de cepa de BAFE y aislamiento de *Botrytis* utilizado en prototipo de formulación 37
3.2.3.1 Extracción de ADN de las BAFEs 37
3.2.3.2 Extracción de ADN del hongo fitopatógeno 38
3.2.3.3 Amplificación de genes de BAFEs por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 39
3.2.3.4 Amplificación de genes de *Botrytis* por PCR 40
3.3 DISEÑO Y EVALUACION DE PROTOTIPOS DE FORMULACION LÍQUIDA 41
3.3.1 Selección de medio para producción de ingrediente activo (BAFEs) 41
3.3.2 Curva de crecimiento en medio seleccionado para producción de ingrediente activo (BAFEs) 41
3.3.3 Selección de componentes mediante evaluación de viabilidad celular 42
3.3.4 Pruebas de adherencia con polímeros 44
3.3.5 Diseño del prototipo de formulación 45
3.3.6 Pruebas de viabilidad y pureza de prototipos 47
3.3.7 Pruebas de actividad de prototipos 47
3.3.7.1 Pruebas de actividad en pétalo 47
3.3.7.2 Pruebas de actividad en flor completa 49
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 50
3.5 ESQUEMA DE TRABAJO 50

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 51
4.1 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS BAFES CONTRA *Botrytis* sp. 51
4.1.1 Evaluación de la actividad antagonista de las BAFES en condiciones *in vitro* ..51
4.1.2 Experimentos de biocontrol en condiciones *in vivo* en pétalos de rosa variedad Vendela 57
4.1.2.1 Pruebas con esporas 57
4.1.2.2 Pruebas con sobrenadante. 58
4.1.2.3 Evaluación BAFEs 59
4.1.2.4 Pruebas con dilución de sobrenadante al 50% y 5% 61
4.1.2.5 Prueba con dilución de sobrenadante al 50%, 5% y 0,5% 63
4.1.2.6 BAFEs preseleccionadas con dilución de sobrenadante al 50%, 5% y 0,5% usando réplica biológica (Esporulaciones frescas) 65
4.1.3 Identificación molecular 67

4.1.3.1 Identificación molecular del aislamiento de *Botrytis* seleccionado 67
4.1.3.2 Identificación molecular de cepas de BAFEs preseleccionadas 68
4.1.4 Cepa de BAFEs seleccionada para prototipo de formulación 72
4.2 DISEÑO Y EVALUACION DE LOS PROTOTIPOS DE FORMULACION LIQUIDA 73
4.2.1 Selección de medio para producción de ingrediente activo 73
4.2.2 Curva de crecimiento en medio seleccionado para producción de ingrediente activo (BAFEs)..... 74
4.2.3 Selección de componentes mediante evaluación de viabilidad celular 76
4.2.3.1 Pruebas con polímeros: Pol-1, Pol-2, Pol-3 y Pol-4..... 77
4.2.3.2 Prueba de adherencia con polímeros..... 79
4.2.3.3 Pruebas con preservantes 80
4.2.3.4 Prueba con agente de suspensión 82
▪ Prueba con excipientes para confirmar suspendibilidad del principio activo... 83
4.2.3.5 Prueba con tensioactivo 86
4.3 PROCESO DE FORMULACIÓN 86
4.3.1 Pruebas de viabilidad y pureza de prototipos 88
4.3.1.1 Viabilidad lote de Formulación 1 94
Viabilidad en función del tiempo para cada prototipo 94
4.3.1.2 Viabilidad lote de Formulación 2 96
Viabilidad en función del tiempo para cada prototipo 96
4.3.1.3 Viabilidad lote de formulación 3..... 98
Viabilidad en función del tiempo para cada prototipo 98
4.3.2 Pruebas de actividad de prototipos..... 101
4.3.2.1 Pruebas de actividad en pétalo 101
4.3.2.2 Pruebas de actividad en flor completa..... 106

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 112
5.1 Conclusiones 112
5.2 Recomendaciones 113

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Principales países exportadores de flores de corte 2017. 5

Figura 1-2. Área sembrada por producto..... 6

Figura 1-3: Ciclo de enfermedad del Moho Gris causado por *Botrytis cinerea* en rosa.....10

Figura 3-1. Esquema del proceso de formulación una vez obtenido el principio activo hasta dosificación del producto para almacenamiento 46

Figura 3-2. Esquema de trabajo para obtención de prototipo de formulación líquida. 50

Figura 4-1. Área de antagonismo obtenida en evaluación *in vitro* de 12 cepas de BAFEs contra aislamientos de *Botrytis cinerea* provenientes de las fincas: A. Hato (HT) B. Melody (ML) y C. Santana (SN). 52

Figura 4-2. Área de antagonismo obtenida en evaluación *in vitro* de 12 cepas de BAFEs contra 10 aislamientos de *Botrytis cinerea*. 53

Figura 4-3. Porcentaje de inhibición de crecimiento de hongo obtenido en evaluación in vitro de 10 aislamientos de *Botrytis cinerea* 55

Figura 4-4. Cepas de BAFEs mostrando antagonismo contra aislamiento de *Botrytis cinerea* proveniente de Finca Ciprés (1) y Finca Tandil (2) 56

Figura 4-5. Evaluación de actividad de biocontrol usando suspensión de esporas de la cepa referencia AP 188 en pétalo de rosa variedad Vendela.....58

Figura 4-6. Evaluación de actividad de biocontrol usando suspensión de esporas y sobrenadante de la cepa referencia AP 188 en pétalo de rosa variedad Vendela.....58

Figura 4-7. Evaluación de actividad de biocontrol BAFEs grupo 1 en pétalo de rosa variedad Vendela. 60

Figura 4-8. Evaluación de actividad de biocontrol BAFEs grupo 2 en pétalo de rosa variedad Vendela. 61

Figura 4-9. Evaluación de actividad de biocontrol de las cepas IM4C5, IA3C11 e IM2C6 en pétalo de rosa variedad Vendela.....62

Figura 4-10. Evaluación de actividad de biocontrol de las cepas de IM4C5, IT1C8 e IM2C6 en prueba en pétalo de rosa variedad Vendela.....64

Figura 4-11. Evaluación de actividad de biocontrol de las cepas IM2C2, IT1C8 e IM2C6 en pétalo de rosa variedad Vendela. 66

Figura 4-12. Caracterización macro y microscópica de *Botrytis cinerea*. 68

Figura 4-13 Árboles de distancia genética elaborados a partir del análisis Neighboor joining 71

Figura 4-14. Curva de crecimiento de la cepa IM2C6 en medio de esporulación..... 75

Figura 4-15. Observación al microscopio de diferentes tiempos de la curva..... 75

Figura 4-16. Conteo células totales (células vegetativas más esporas) vs Esporas a las 24, 48, 72 y 96 horas..... 76

Figura 4-17. Pruebas de suspensión celular de cepa IM2C6 en mezcla con agente suspensor..... 84

Figura 4-18. Fases del proceso de formulación 87

Figura 4-19. Características macroscópicas de los dos morfotipos observados en prueba de pureza de los prototipos de formulación 88

Figura 4-20. Cambios físicos en morfotipos 1 y 2. 90

Figura 4-21. Prueba de antagonismo *in vitro* contra el aislamiento de *Botrytis* proveniente de la Finca Ciprés. 91

Figura 4-22. Eficacia de prototipos de formulación 103

Figura 4-23. Porcentaje de incidencia de prototipos de formulación 104

Figura 4-24. Severidad expresada como diámetro de afección promedio en pétalo en prototipos 105

Figura 4-25. Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en flor completa con aplicación de prototipos P3, P4 y P5..... 107

Figura 4-26. Índice de severidad de *Botrytis cinerea* en flor completa con aplicación de prototipos P3, P4 y P5..... 108

Figura 4-27. Índice de severidad de *Botrytis cinerea* en pétalos con aplicación de prototipos P3, P4 y P5..... 109

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1. Componentes y concentraciones utilizadas en pruebas de viabilidad celular. .43

Tabla 4-1. Resultados de porcentaje de incidencia e índice de severidad en pruebas de dilución de sobrenadantes para selección de cepas 65

Tabla 4-2. Resultados de alineamientos locales BLAST en la base de datos del NCBI. ..69

Tabla 4-3. Medios evaluados para producción de ingrediente activo - cepa IM2C6 (*Bacillus velezensis*) - para elaboración de prototipo de formulación. 73

Tabla 4-4. Componentes y sus concentraciones evaluados para diseño del prototipo de formulación. 77

Tabla 4-5. Evaluación de viabilidad celular de cepa IM2C6 después de 5 días en agitación con 4 polímeros 78

Tabla 4-6. Prueba de adherencia de polímeros en tejido de hoja de rosa.....80

Tabla 4-7. Viabilidad celular de cepa IM2C6 después de 48 horas en agitación con preservantes Pb 1, Pb 2 y Mezcla (Pb 1 + Pb 2). 81

Tabla 4-8. Viabilidad celular de la cepa IM2C6 después de 48 horas en agitación con preservante SK evaluado a dos concentraciones.....81

Tabla 4-9. Viabilidad celular de cepa IM2C6 después de 5 días en agitación con Agente suspensor S-1 evaluado a tres concentraciones.....83

Tabla 4-10. Pruebas de suspendibilidad celular de cepa IM2C6 85

Tabla 4-11. Pruebas de viabilidad celular de la cepa IM2C6 en mezcla con Tensioactivo al 0.5%.....86

Tabla 4-12. Prototipos de formulación y su composición.....87

Tabla 4-13. Concentración inicial de prototipos 1 a 5 después de procedimiento de formulación equivalente al tiempo inicial. 88

Tabla 4-14. Resultados de alineamientos locales BLAST en la base de datos del NCBI (Morfotipos 1 y 2) 92

Tabla 4-15. Tiempo de determinación de viabilidad de lotes de formulación preparados .93

Tabla 4-16. Evaluación en el tiempo de la viabilidad celular lote de Formulación 1.....95

Tabla 4-17. Evaluación en el tiempo de la viabilidad celular lote de Formulación 2.....98

Tabla 4-18. Evaluación en el tiempo de la viabilidad celular lote de Formulación 3.....99

Tabla 4-19. Concentración celular final de cada prototipo en prueba de eficacia en discos de pétalo.....102

Tabla 4-20. Concentración celular final de cada prototipo en prueba de eficacia en flor completa..... 106

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
BAFEs	Bacilos Aerobios Formadores de Endosporas
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxiribonucléico)
gyrA	Gen subunidad a de la girasa
HPMC	Hidro Propil Metil Celulosa
MOLP	Medium Optimum for Lipopeptide Production (Medio Óptimo para Producción de Lipopéptidos)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
SSigMol	Servicio de Secuenciamiento y Análisis Molecular
TSA	Tryptone Soya Agar (Agar Tripticasa de Soya)
TSB	Tryptone Soya Broth (Caldo Tripticasa de Soya)
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

Introducción

Una experiencia de más de 45 años ha consolidado a Colombia como el segundo exportador de flores a nivel mundial despues de Holanda. Para el 2017, se reportaron cifras de exportación cercanas a los 1.399 millones de dólares representados en aproximadamente 250.000 toneladas de flores. Con el 2,5% de todas las exportaciones nacionales, el sector floricultor se consolida como el primer renglón de exportaciones agrícolas no tradicionales del país (“TRADE MAP,” 2018).

En materia de productos, la rosa, cultivada principalmente en Cundinamarca, continúa ocupando el primer lugar de las exportaciones de flores colombianas con $309.4 millones de dólares al cierre del 2017 (AOCOLFLORES, 2018).

La rosa cuenta con 2158 ha cultivadas, siendo uno de los productos de mayor área de cultivo dentro de las flores de exportación, por lo que entender los problemas fitosanitarios que lo afectan es de vital importancia para los exportadores de flores colombianas. Las enfermedades más limitantes en el cultivo de rosa son: mildeo velloso (*Pernospora sparsa*), moho gris (*Botrytis cinerea*) y mildeo polvoso (*Sphaeroteca pannosa*) (Alvarez, 2012).

El moho gris causado por *Botrytis cinerea* es uno de los principales problemas fitopatológicos que afectan la producción de rosas en Colombia, ocasionando un 40% de perdidas al no prevenirse y/o controlarse oportunamente (Gómez, 2013).

El manejo de la enfermedad se aborda de manera integrada, considerando métodos culturales (monitoreo, remoción de residuos vegetales), físicos (manejo de ventilación en invernaderos) y un intensivo programa de aplicaciones químicas (una aplicación semanal, con refuerzo de aspersión ante porcentajes altos de afección en campo) sin que esto sea suficiente para su control (Gomez, comunicación personal 2017).

Adicionalmente, la aspersión de fungicidas ha sido implementada con tanta frecuencia e intensidad, que ya es evidente la aparición de fenómenos de resistencia del patógeno

(Leroch *et al.,* 2010; Yin *et al*., 2011; Fernandez, *et al.,* 2012; Grabke, *et al*., 2014), lo que ha obligado a la revisión de las estrategias empleadas.

Por otro lado, la necesidad creciente de los floricultores de conseguir certificación con sellos de sostenibilidad ambiental como Florverde®, han puesto sobre la mesa la necesidad de explorar alternativas diferentes o complementarias al control químico (como el control biológico), puesto que esto trae beneficios a nivel de preferencia de su producto, competitividad y apertura de nuevos mercados.

Dentro de los productos que existen para el control de *B. cinerea* se encuentran microorganismos antagonistas tales como hongos, levaduras y bacterias. Estudios llevados a cabo por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Caicedo, 2014; Davila, 2015 y Bautista Silva *et al*., 2016), han demostrado que prototipos de formulaciones granuladas y liquidas con levaduras como principio activo ejercen actividad de biocontrol.

Sin embargo, por su naturaleza las levaduras necesitan medios que las protejan de las condiciones ambientales extremas y las formulaciones que se han propuesto han presentado inconvenientes de tipo estético, dado que por las características propias de la formulación para cubrir las necesidades del microorganismo, el efecto residual de ciertos componentes puede quedar expuesto sobre las flores y el follaje, lo cual es indeseable porque afecta la presentación final del producto.

El control biológico de enfermedades a través del uso de otro tipo de microorganismos como los Bacilos Aerobios Formadores de Endosporas (BAFEs) se presenta como una buena estrategia para el control de este fitopatógeno (Martinez *et al*., 2014).

Los Bacilos Aerobios Formadores de Endospora cuentan con una ventaja como alternativa de control, dado que por sus estructuras de resistencia son capaces de sobrevivir en ambientes hostiles y son resistentes a condiciones de estrés, lo que es deseable para la formulación de productos biológicos (Dimkić et al., 2013)

Dentro de las BAFEs, se encuentran las cepas del genero *Bacillus* que engloban una gran diversidad genética y podría ser considerado una de las mayores fuentes de potenciales bioplaguicidas de origen microbiano, ya que presenta varias características deseables como competencia por espacio y nutrientes, generación de lipopéptidos (iturinas, fengicinas y surfactinas), producción de enzimas líticas y de compuestos

orgánicos volátiles que tienen actividad antagonista contra *Botrytis cinerea* (Haidar *et al*., 2016)

Teniendo como base lo anterior, el presente trabajo propone desarrollar un prototipo de formulación líquida a base de BAFEs como principio activo, que han sido caracterizadas y evaluadas en condiciones de laboratorio. Se espera que el prototipo resultante, ayude a reducir la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en rosa.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 El sector floricultor en Colombia

La floricultura colombiana inició su desarrollo a partir de la década de 1960 y se ha mantenido desde entonces como una actividad económica constante y de rápido crecimiento. Su modelo se basa en agricultura intensiva, lo que significa uso de tecnología e insumos para optimización en el empleo del espacio. Así mismo, se ha configurado como una actividad empresarial con un alto nivel de desarrollo y profesionalismo, logrando que cada dos de tres flores que se venden en Estados Unidos sean colombianas (Montero & Quintero, 2010).

En Colombia el sector floricultor surgió orientado hacia el mercado externo, ocupando actualmente el segundo lugar a nivel mundial despues de Holanda como país exportador. Para el año 2017, los principales países exportadores de flores a nivel mundial alcanzaron a producir $8.626 millones de dólares, dentro de los que se destacan: Holanda (48.8%), Colombia (16.2%) y Ecuador (10.2%) (TRADE MAP, 2018) (Figura 1-1).

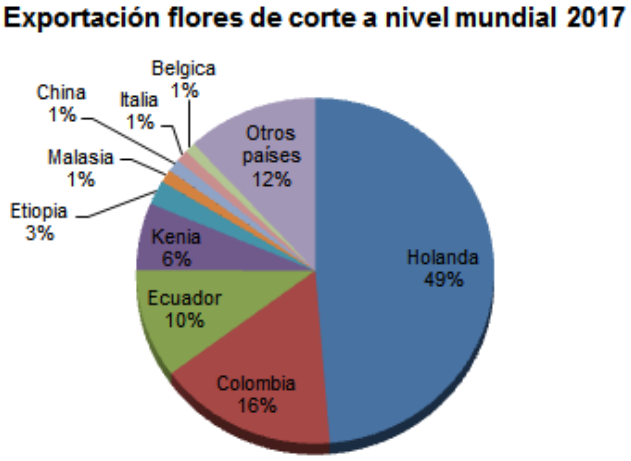


Figura 1-1. Principales países exportadores de flores de corte 2017. Fuente: TRADE MAP 2018

En el 2017 la producción de flores colombianas para exportación registró una cifra total de 246.118 toneladas. Los principales mercados de destino de las flores colombianas para el mismo año fueron: Estados Unidos (78.3% de participación), Japón (4%), Reino Unido (3.2%), Canadá (2.8%), Holanda (2%), Rusia (2%), España (1.6%) y otros países (6.1%) (“TRADE MAP,” 2018).

Las principales especies exportadas son rosa, clavel, hortensia, crisantemo y alstroemeria. El sector floricultor representa el segundo renglón de exportaciones agrícolas del país destinando el 95% de la producción a exportación, generando un importante ingreso de divisas que representan alrededor de 1.400 millones de dólares (para el año 2107) y aproximadamente 90.000 empleos formales directos, en su mayoría madres cabeza de familia (MADR, 2018).

1.1.1 Cifras de exportacion y producción en cultivo de rosa

El número de hectareas sembradas por producto para el año 2018 (datos a enero) ubicaron a la rosa en el primer lugar con un 34.6% de participación, seguida por la hortensia (18.7%), el clavel (12.1%), el crisantemo (11.8%), la alstroemeria (5.2%) y otras especies (7.7%) (ASOCOLFLORES, 2018)(Figura 1-2).

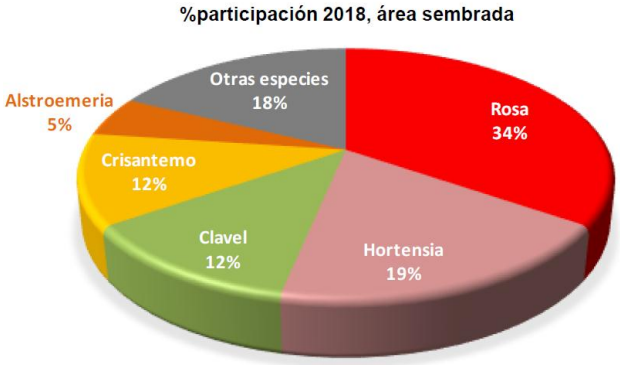


Figura 1-2. Área sembrada por producto**.** Fuente Asocolflores 2018

En 2017 la producción de rosas colombianas para exportación registró una cifra total de 48.482 toneladas, representadas en 309.408 millones de dólares. Los principales mercados de destino de las rosas colombianas para el mismo año fueron: Estados Unidos (74.1% de participación), Rusia (5.2%), Canadá (3.4%), España (2.4%), Reino Unido (2.4%), Holanda (2.3%), Brasil (1.3%), Australia (1.3%) y otros países (7.6%) (“TRADE MAP,” 2018).

1.1.2 Problemas fitosanitarios en rosa

Algunas de las enfermedades que afectan la producción de rosa son aquellas ocasionadas por hongos fitopatógenos. Entre estos se encuentran: mildeo velloso (producido por *Peronospora sparsa*), mildeo polvoso (producido por *Sphaeroteca pannosa*) y moho gris (producido por *Botrytis cinerea*) (Figueroa & Garcia, 2002).

1.1.2.1 *Botrytis cinerea* en rosas

Son varios los factores que ilustran la importancia económica de *Botrytis cinerea* en la floricultura colombiana. Uno de ellos es el uso de fungicidas para su manejo en campo y poscosecha (en promedio un 26% del total de agroquímicos). Otro es el relacionado con los reclamos por parte de los clientes y la exigencia de reembolso de dinero por pérdida de calidad (superior al 85% de las reclamaciones) (Restrepo, 2010). Así mismo, Los productores reportaron que para el año 2018, se consolidaron un total de 4,4 reclamos / Ha de calidad por causa de *Botrytis* (Aponte, S – Comunicación personal, 2019).

El moho gris se encuentra entre las enfermedades que producen mayor daño en rosas cultivadas alrededor del mundo, atacando plantas tanto fuera como dentro del invernadero así como en la fase de poscosecha (almacenamiento) y tránsito (Gleason & Helland, 2003).

El patógeno es ubicuo en los invernaderos, esporula abundantemente sobre los tejidos muertos y senescentes de la planta. Esto se produce debido a que una alta humedad y temperaturas medias conducen a una abundante producción de conidias y el agua libre sobre la superficie de las hojas es requerida para la infección. Las infecciones están con frecuencia en estado latente cuando las rosas son cosechadas, pero los síntomas pueden desarrollarse durante el almacenamiento y los despachos (Gleason & Helland, 2003).

La sintomatología en tallos de rosa incluye pequeñas manchas que se tornan de color café, puntos necróticos que se dispersan cubriendo la flor en su totalidad. Las lesiones en el tallo son elongadas, hundidas y de color negro y café (Gleason & Helland, 2003).

Las variedades de rosa se dividen en rosa de “color” y rosa roja. Los más susceptibles a *Botrytis* son los denominados rosa “color”, principalmente aquellos de color rosado, con un 43% de los ramos rechazados por lesiones causadas por *B.cinerea*, naranja con un 11%, amarillo 9% y blanco 3% (Gómez, 2013).

Durante el proceso de producción se generan residuos de cosecha por caída de hojas y cortes permanentes de los tallos de producción que favorecen la presencia permanente de *Botrytis* en el cultivo. Se considera que los principales reservorios del patógeno en el cultivo son: la hojarasca que se encuentra en el tercio inferior de las plantas sobre las camas, los tallos de corte en donde se ocasionan heridas debido a la manipulación de estos para la cosecha de los tallos y la flor (Gómez, 2013).

Con respecto al manejo de la enfermedad en campo, el control está basado en la aplicación de fungicidas de síntesis química, constituyéndose en uno de los principales mecanismos de protección eficiente y confiable contra el moho gris (Fillinger & Walker, 2016). Entre los principales ingredientes activos utilizados en productos de control se encuentran: clorotalonil, fluazinam, azoxystrobin, carbendazim, iprodione, tebuconazole entre otros (Fillinger & Walker, 2016).

Otras técnicas de manejo de esta enfermedad incluyen: uso de cultivares resistentes, procedimientos rigurosos de fitosanidad (monitoreos de la incidencia de enfermedad en el cultivo, limpieza de material vegetal que pueda servir como fuente de inóculo), manejo de condiciones ambientales dentro de los invernaderos (como supresión de alta humedad mediante el manejo de corrientes de aire dentro de estos) y una adecuada nutrición de las plantas (Elad, 2016).

1.2 Botrytis cinerea

1.2.1 Biología

El género *Botrytis* comprende cerca de 28 especies descritas (Beever & Weeds, 2007). La mayoría de las especies, con excepción de *Botrytis cinerea* tienen un rango de hospederos limitado atacando solo a unas pocas especies de plantas ya sean monocotiledóneas o dicotiledóneas mientras algunos como el hongo *Botrytis galantina* parece ser específico para un hospedero (Beever & Weeds, 2007).

Se han reportado especies de *Botrytis* atacando un total de 596 géneros de plantas vasculares, representando cerca de 1400 especies de plantas, aunque el rango de hospederos probablemente sea más amplio, debido a la limitación en reportes de enfermedad en plantas silvestres (Elad *et al*., 2016).

Indudablemente la especie más común y más importante del género es *Botrytis cinerea*, responsable de pérdidas considerables en cultivos y deterioro de frutos en la etapa de poscosecha (Droby & Lichter, 2007).

1.2.2 Ciclo de enfermedad

Muchas especies y aislamientos de *Botrytis* producen numerosas conidias (macroconidias) que son conidias asexuales que nacen en los extremos de las ramificaciones de los conidióforos, su tamaño depende de la especie (Beever & Weeds, 2007). Estas se encuentran principalmente en los restos vegetales apilados dentro o fuera de los invernaderos y se constituyen en la fuente de inóculo primario para el inicio de infección (Restrepo, 2010).

Al presentarse condiciones favorables tales como temperatura óptima (20 – 25°C), presencia de nutrientes (por ejemplo los que se dan a través de exudados en heridas de los tejidos), alta humedad relativa (90-100%) se produce la germinación de las conidias (Restrepo, 2010). Una vez germina la conidia, se produce la penetración en el tejido vegetal (ya sea por heridas o por acción de las enzimas) conduciendo a la muerte de las células adyacentes. Estos procesos dan lugar a la aparición de una lesión primaria, que conlleva a la diseminación en el tejido vegetal circundante (Holtz *et al*., 2007).

En la fase final se produce la esporulación sobre el tejido macerado, dando lugar a una nueva producción de conidios que se diseminarán e iniciarán un nuevo ciclo de infección (Holtz *et al*., 2007) (Figura 1-3).

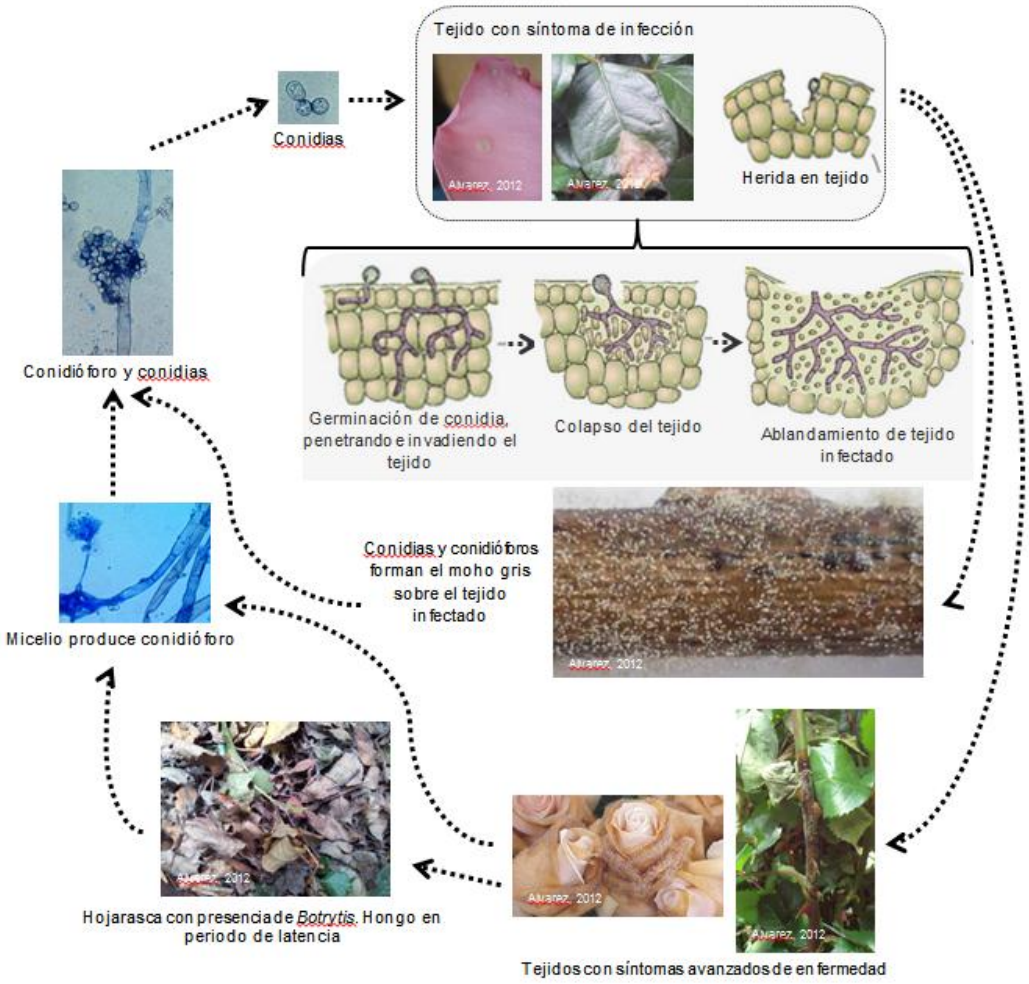


Figura 1-3: Ciclo de enfermedad del Moho Gris causado por *Botrytis cinerea* en rosa. Fuente: Modificado de Agrios (2005) (Alvarez, 2012) (Gómez, 2013)

El estado sexual o teleomorfo de *Botrytis* spp anteriormente conocido como *Botryotinia* spp no se observa frecuentemente en la naturaleza, esto puede deberse en parte a la falta de reconocimiento de los cuerpos fructíferos. Las microconidias, las cuales se producen bien sea a partir del desarrollo post germinación de las macroconidias o de la formacion endogena dentro de hifas viejas, son uninucleadas y se ha confirmado que actuan como esperma durante la reproducción sexual (Fukumori *et al*.,2004).

1.2.3 Caracterización de poblaciones de *Botrytis*

Algunas características morfológicas como tipo de micelio, conidias, estructura de conidióforos, tamaño y forma de esclerocios han sido útiles para la identificación de algunas especies de *Botrytis* (Kumari *et al*., 2014).

Por otro lado, se ha utilizado otro enfoque para la definición de especies biológicas, el cual consiste en determinar la distribución de la variación alélica con el fin de definir las poblaciones que se están cruzando y en el caso de *Botrytis*, estas comprenden dos grupos distintos: *B. cinerea* y *B.pseudocinerea* (Plesken *et al*., 2015).

Estudios genéticos revelaron que aproximadamente el 1.3% del genoma de *B. cinerea* consta de secuencias repetitivas llamadas transposones, que son elementos móviles repetitivos del ADN que representan componentes dinámicos de los genomas (DeMiccolis *et al*., 2016). La presencia de estos elementos en el genoma de *B. cinerea*, han hecho posible distinguir en la actualidad cuatro genotipos: *transposa, vacuma, boty* y *flipper* (Walker, 2016).

El desarrollo de primers contra *B. cinerea* ha permitido la fácil identificación a nivel de especie (Tomlinson *et al*., 2010). La variabilidad genética de este patógeno se ha estudiado usando herramientas moleculares como RFLP, presencia y ausencia de los elementos transponibles (*boty* y *flipper*), RAPD, AFLP y microsatélites (Kumari *et al*., 2014).

Esto ha tenido un impacto significativo en la identificación de especies, estudios taxonómicos y filogenéticos, incluyendo la diferenciación de grupos intraespecíficos o entre especies muy estrechamente relacionados, ayudando en los estudios de mapeo genético (Suresh *et al*., 2010) y ha definido el patrón del tipo de distribución entre la población del hongo de una misma región, diferentes hospederos y viceversa (Kumari *et al*., 2014).

Son varios los reportes que mencionan la diversidad genética de *Botrytis* en diferentes partes del mundo (Corwin *et al*., 2016; Fekete *et al*., 2012; Rasiukevičiūtė *et al*., 2018) teniendo en cuenta la naturaleza diversa de este patógeno (Kumari *et al*., 2014).

Para el caso de Colombia, Gómez (2013) realizó un estudio con 270 aislamientos de *Botrytis cinerea* provenientes de 6 fincas productoras de flores ubicadas en 3 zonas diferentes de la Sabana de Bogotá. Los análisis de aislamientos del hongo obtenidos a partir de diferentes tipos de tejido (hojarasca, tallo, flor) evidenciaron la presencia de todos los genotipos posibles por presencia de transposones (*transposa, vacuma, boty* y *flipper*). De esta manera se estableció una gran variabilidad morfológica y genética para este patógeno.

De acuerdo a los resultados de la investigación, se concluyó que la variabilidad genética detectada en poblaciones de este patógeno podría ofrecer una primera explicación a porque es común que se presenten diferencias en los resultados de manejo de la enfermedad del moho gris en rosa entre fincas (Gómez, 2013).

Por su alta plasticidad genética, el desarrollo de cepas resistentes dificulta a los agricultores seleccionar un compuesto antifúngico que pueda controlar la enfermedad, Debido a esto los investigadores deben enfocar sus esfuerzos en evaluar el potencial de algunos fungicidas en las bases de similitud fenotípica y genética entre cepas (Kanetis & Christodoulou, 2017).

1.2.4 Importancia económica y científica

De acuerdo a un sondeo realizado en el 2012 a miembros de la comunidad científica internacional que han hecho aportes y publicaciones en la revista “Molecular Plant Pathology”, *B. cinerea* figura en el segundo lugar del listado de los 10 hongos fitopatógenos considerados de mayor importancia económica y científica a nivel mundial (Dean *et al*., 2012).

Este segundo lugar, claramente indica que *B. cinerea* tiene un gran impacto en muchas áreas debido a su amplio rango de hospederos, causando daños severos tanto en pre como en pos cosecha (Dean *et al*., 2012)**.**

Actualmente existe poca información acerca del daño causado por *Botrytis* y los costos asociados al manejo de la enfermedad, sin embargo se ha estimado que este patógeno causa pérdidas anuales que oscilan entre los 10 y 100 billones de dólares (Boddy, 2016).

1.2.5 Estrategias empleadas en el control de *Botrytis*

El control de *Botrytis* se realiza mediante estrategias que consigan la interrupción del ciclo de vida del hongo en todas sus fases. La epidemiología de *Botrytis* comprende una secuencia de procesos (latencia e infección, colonización, germinación de conidias y dispersión) en donde cada uno está influenciado por factores tales como la temperatura, lluvia, humedad, viento, prácticas culturales, fertilización, uso de fungicidas y por factores del hospedero tales como tolerancia y fenología (Odile, 2016).

La supervivencia de *Botrytis* spp entre los ciclos de cultivo y la dispersión de conidias a plantas sanas son fases críticas para el desarrollo de la enfermedad por lo que si cualquiera de esas fases logra prevenirse, el comienzo de la enfermedad puede atrasarse o inclusive no producirse (Odile, 2016).

Con el objeto de lograr un manejo integral, dentro de las estrategias para el control de *Botrytis* se encuentran: el control químico, el control cultural y el control biológico (Restrepo, 2010).

1.2.5.1 Control químico

El control químico basado en la aplicación de fungicidas constituye el medio más confiable para un control eficiente del moho gris en campo (Fillinger & Walker, 2016).

Los diferentes modos de acción de los fungicidas incluyen: daño en el citoesqueleto (producido por benzimidazoles), afección en el sistema de transducción de señales (como los producidos por las dicarboximidas), inhibición de la síntesis de aminoácidos (efectuado por ciprodinil), inhibición de la síntesis del ergosterol (por acción de fenexamid), aquellos que afectan los procesos de respiración celular (producidos por fluazinam), entre otros (Fillinger & Walker, 2016).

Sin embargo, durante las últimas décadas, la restricción en aplicación de fungicidas ha sido necesaria para reducir el impacto en el ambiente, siendo inaplazable optimizar las estrategias de protección (Fenner *et al*., 2013).

Botrytis cinerea es un hongo con un alto riesgo de adquirir resistencia a diferentes grupos químicos tales como piraclostrobin, en donde se comprobó la presencia de la mutación G143A en un gen relacionado con inhibidores externos de la quinona y que bajo

condiciones de sensibilidad al fungicida actúa como supresor del hongo (Fernández-Ortuño *et al*., 2012).

De otro lado, Grabke *et al*., (2014) reportaron resistencia al iprodione por presencia de mutaciones en el gen *BosI* el cual codifica para una histidin quinasa clase III, que esta involucrada en procesos de formación de macroconidias y procesos de adaptación del hongo a condiciones ambientales adversas.

En Alemania, análisis genéticos de cepas multiresistentes de *B.cinerea* revelaron mutaciones de resistencia en los genes blanco de ingredientes activos como el fenexamid, ciprodinil y boscalid, sumado al hecho de que estas cepas multiresistentes parecen ser más tolerantes al estrés oxidativo (Rupp *et al*., 2017).

El Comité de Acción de Resistencia a los fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés), lidera las medidas que se deben tomar para prolongar la efectividad de los fungicidas mediante el estudio de los modos de acción de los ingredientes activos y su manejo para evitar la adquisición de resistencia a los mismos. FRAC hizo un análisis de riesgo de los diferentes patógenos en cuanto a la adquisición de resistencia a los fungicidas encontrando que *Botrytis* es el hongo con mayor riesgo (Restrepo, 2010).

Con el fin de obtener un balance entre la eficacia del fungicida, la salud humana, la protección del ambiente y la rentabilidad de los cultivos, se debe propender por optimizar los tiempos de aplicación, seleccionar moléculas con otros mecanismos de acción y promover prácticas agroecológicas como aquellas relacionadas con la implementación de controladores biológicos dentro de los esquemas de manejo de la enfermedad (Fillinger & Walker, 2016).

1.2.5.2 Control cultural

Las prácticas más relevantes para el manejo cultural de *Botrytis* de acuerdo a Restrepo, 2010 incluyen:

Monitoreo: revisión semanal de las flores y los tallos para la detección del patógeno en cultivo con el fin de controlar la diseminación del patógeno y proceder a su control químico.

Aspersiones: evitar aspersiones con agua en áreas afectadas por *Botrytis* debido a que el agua libre es necesaria para la germinación del hongo.

Remoción de tejidos: eliminación de flores, follaje y tallos afectados así como residuos vegetales que caigan al piso puesto que los residuos pueden contener esclerocios, que son estructuras de resistencia que aparecen ante condiciones ambientales adversas.

Limpieza: limpiar las cubiertas del invernadero para que entre la mayor cantidad de luz posible incrementando de esta manera la intensidad lumínica, ya que la luz incide negativamente en la producción de conidios del hongo.

1.2.5.3 Control biológico

Debido a las dificultades asociadas al uso de control químico, así como la creciente presión para reducir el uso de fungicidas, el biocontrol ofrece una alternativa atractiva y complementaria al uso de métodos convencionales para el control de moho gris. Los agentes microbiológicos de control BCAs (Biological Control Agents por sus siglas en inglés) son percibidos como menos perjudiciales para el ambiente y su modo de acción reduce el riesgo de desarrollo de resistencia (Nicot *et al*., 2016).

Los productos para control de *Botrytis* comprenden un amplio rango de microorganismos como ingrediente activo dentro de los que se incluyen: hongos (*Trichoderma, Gliocladium, Chlonostachys, Ulocladium*), levaduras (*Aureobasidium, Candida*), actinomicetes (*Streptomyces*) y bacterias *(Bacillus, Pseudomonas*) (Nicot *et al*., 2016).

En el ámbito local, un estudio realizado por Zapata *et al*., (2016) evaluó el uso de cepas de levaduras para reducir la incidencia y severidad de moho gris en pétalos de rosa, encontrando porcentajes sobresalientes de control con las especies *Debaryomices hansenii* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

De la misma manera, un estudio realizado por Davila (2015) evaluó el uso de diferentes especies de levaduras para el control de *Botrytis* en rosa, destacando el desempeño de las especies *Pseudozyma tsukubaensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Criptococcus sp* al disminuir los porcentajes de incidencia e índices de severidad de la enfermedad así como establecer que otros mecanismos de control incluían la producción de compuestos orgánicos volátiles y la competencia por nutrientes.

1.3 *Bacillus* en control biológico de *Botrytis*

La clase Bacilli, comprende microorganismos que han sido suficientemente estudiados, lo cual facilita su uso. La administración Norte americana de drogas y alimentos (USFDA por sus siglas en inglés) les ha concedido el estatus de "generalmente considerados como seguros" (GRA por sus siglas en inglés), reconocidos de esta manera como no patogénicos (para el caso de *Bacillus subtilis*) (Harwood & Wipat, 1996).

Otra característica importante radica en la capacidad de producción de esporas de estos microorganismos, ante limitaciones de algunos elementos en el medio como carbono, nitrógeno o fuentes de fósforo (Piggot & Hilbert, 2004).

Las esporas son estructuras de dormancia extremadamente resistentes, capaces de soportar altas temperaturas, pH poco favorables, carencia de nutrientes o agua etc. Este fenómeno puede ser explotado en producción a escala industrial, dado que la esporulación puede ser inducida hacia la fase final de cultivo de estos microorganismos (Monteiro *et al*., 2005).

Esto facilita en gran medida que en condiciones pos-cultivo, las suspensiones bacterianas puedan ser convertidas a formulaciones hechas a base de polvo sin que se presenten los inconvenientes de altas tasas de mortalidad observadas con bacterias no esporulantes (Lalloo *et al.*, 2010).

Una razón adicional para el alto interés en *Bacillus* es la diversidad en su modo de acción. Este puede mostrar casi todos los mecanismos de biocontrol y bio-estimulación/fertilización: competencia por nicho y/o sustrato, producción de compuestos inhibitorios tales como aleloquímicos o inducción de resistencia sistémica en la planta. Además, una cepa puede a menudo actuar a través de varios mecanismos. Esto hace que esta bacteria sea efectiva en muchas condiciones (diferentes patógenos, plantas y condiciones ambientales) (Cawoy, Bettiol, Fickers, & Ongena, 2011).

1.3.1 Mecanismos de control de *Bacillus*

Los mecanismos de control por los cuales las bacterias antagonistas actúan contra patógenos de plantas han sido el foco de estudio, debido a su importancia en el desarrollo e implementación de estos microorganismos como estrategia de control en campo (Haidar *et al*., 2016).

Por otro lado, estos mecanismos deben estar entre los parámetros claves para el desarrollo de productos y deben ser relevantes para propósitos de mercadeo (Köhl *et al.,* 2010).

A continuación se describen varios mecanismos de acción descritos para *Bacillus* en el control de *Botrytis.*

1.3.1.1 Antibiosis

Dentro de la gran colección de moléculas biológicamente activas sintetizadas por *Bacillus*, algunas han sido reportadas por su actividad inhibitoria contra fitopatógenos. La actividad antagonista o de antibiosis es probablemente el mecanismo más conocido y más importante usado para limitar la invasión del patógeno en los tejidos de la planta hospedera (Cawoy *et al*., 2011).

En varias especies de *Bacillus*, las tres principales familias de lipopeptidos comprenden surfactinas, iturinas y fengicinas. Cawoy *et al*., (2015) confirmaron disminución en crecimiento de *Botrytis* gracias a la actividad de iturinas y fengicinas de *Bacillus amyloliquefaciens* en ensayos de antagonismo *in vitro*.

Estudios como el de Toral *et al*., (2018) reportaron tasas de inhibición del 72% en el crecimiento de *B.cinerea* a concentración de 10 mg L^{-1} en ensayos *in vitro* debido a la actividad de lipopeptidos tales como surfactinas, bacilomicinas y fengicinas (A y B). Adicionalmente, reportaron disminución de enfermedad de 100% en bioensayos con inyección de lipopéptidos en uvas, así como disminución de enfermedad del 12% y 50% en bioensayos por aspersión en fresas y tomates respectivamente.

En pruebas *in vitro* Farace *et al*., (2015) demostraron mediante cromatografía por capa delgada que lipopéptidos como la micosubtilina y plipastatina inhibían la germinación de conidias de *B.cinerea.* Reportaron también eficacia de 35% contra esta enfermedad, despues de haber tratado hojas de vid con solución de lipopéptidos 48 horas antes de su inoculación con el patógeno.

En pruebas de control de *B.cinerea* en crisantemos, (Arroyave-Toro *et al*., 2017) evidenciaron disminución de la enfermedad en un 72% por acción de iturina A y fengicina C despues de aspersión de flores con solución de fracción purificada de lipopéptidos.

Además de estas tres (surfactinas, iturinas y fengicinas), otras clases de lipopéptidos bioactivos sintetizados por especies de *Bacillus* han sido identificados como las kurstakinas (Hathout *et al.*,2000) y la bamilocina A (Lee *et al.*, 2007).

1.3.1.2 Producción de enzimas líticas

Además de compuestos antimicrobianos, algunas cepas bacterianas con actividad de biocontrol producen otros metabolitos tales como enzimas, que pueden interferir con la actividad metabólica y/o crecimiento del fitopatógeno (Elad, 1996).

Enzimas líticas tales como quitinasas, glucanasas, celulasas, proteasas y lipasas que degradan los componentes de la pared celular del hongo, contribuyen a la supresión directa del fitopatógeno (Bouizgarne, 2013).

En un estudio realizado en vid por Maachia *et al*., (2015) reportaron disminución en el desarrollo de *B.cinerea* en un 77 y 99% luego de la aplicación de las cepas B27 y B29 de *Bacillus* respectivamente mediante actividad de quitinasas.

De manera similar, un trabajo realizado con *B.thuringiensis* también demostró como el uso de sobrenadantes quitinoliticos en pruebas *in vitro* inhibían el crecimiento micelial de *Botrytis* hasta en un 70% al ser aplicado con 24 horas de antelación a la inoculación del patógeno (Martínez-Absalón *et al*., 2014).

1.3.1.3 Competencia por espacio y nutrientes

La supresión de la infección causada por *B. cinerea* a través de la competencia por nichos y nutrientes ha mostrado efectividad en varios estudios *in vivo* e *in vitro* (Haidar *et al*., 2016).

Un estudio realizado por Huang & Erickson (2005) con semillas de lenteja y su susceptibilidad a infecciones por *Botrytis* durante la etapa de germinación ilustra estas situaciones de competencia. En la investigación, hicieron inmersión de semillas de lenteja en soluciones con *Bacillus subtilis* LRC 1786 y metilcelulosa al 1%. Con este tratamiento obtuvieron un 84% de emergencia de plántula en comparación al 44% obtenido con el control sin microorganismo.

Este incremento en emergencia se atribuyó a la ocupación del nicho de la rizosfera por el agente biocontrolador y la exclusión competitiva del patógeno en ese nicho.

Por otro lado, en una evaluación de *B. amyloliquefaciens* contra *Botrytis*, se observó que el crecimiento de *B.cinerea* disminuyó a medida que aumentó el crecimiento de la bacteria. Se estableció un efecto de competencia por espacio, en donde se redujo el crecimiento micelial del patógeno hasta en un 84% por acción de la *B. amyloliquefaciens* al cabo de 7 días. (Hamdache *et al*., 2018).

1.3.1.4 Producción de compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles pueden ser uno de los mecanismos claves para lograr éxito en el control biológico de fitopatógenos (Effmert *et al*., 2012).

Compuestos volátiles bacterianos identificados por cromatografía de gases combinados con espectrometría de masas pueden variar en número y tipo dependiendo del aislamiento bacteriano (Arrebola *et al*., 2010). Los compuestos orgánicos volátiles bacterianos inhiben o previenen el crecimiento fúngico, debilitan esporas e hifas y promueven el crecimiento de la planta (Weisskopf, 2013).

En un estudio realizado por Chen *et al*., (2008) reportaron que 4 de 14 compuestos orgánicos volátiles producidos por la cepa JA de *B.subtilis* producían retracción del protoplasma en hifas de *B.cinerea*.

1.4 Medios de cultivo para producción de microorganismos

Con el fin de obtener el principio activo de un biocontrolador, el diseño de un medio de cultivo se constituye en una tarea crucial puesto que requiere de un conocimiento adecuado de ciertos aspectos del microorganismo tales como su fisiología y metabolismo (Diaz et al., 2018).

Puesto que se presentan interacciones entre el medio y el microorganismo (bacteria, hongo o levadura), es esperable que el medio sea específico para el microorganismo y no se obtengan resultados similares incluso con cepas que pertenezcan a la misma especie (Diaz et al., 2018).

Varios factores están involucrados en el diseño de un medio tales como fuentes de carbono y nitrógeno, macro y micro elementos, vitaminas, aminoácidos así como otras variables que incluyen pH, temperatura, demanda de oxígeno, que deben ser

consideradas y fijadas en valores adecuados (Diaz et al., 2018). Debido a que debe garantizarse la reproducibilidad del proceso, en pequeña escala deben considerarse medios de cultivo definidos y homogéneos (Singh *et al*., 2017) sin omitir los análisis de factibilidad necesarios para cuando se requiera llevar a una escala superior la producción (Diaz et al., 2018)

Los Bacilos Aerobios Formadores de Endospora (BAFEs) han sido últimamente objeto de gran atención debido a su potencial industrial en el desarrollo de biofertilizantes y bioplaguicidas (Posada-Uribe *et al*., 2015). En la industria agrícola, las esporas son usadas como alternativa a los fungicidas de síntesis química como agentes de control biológico (Soe & De Costa, 2012).

Los biocontroladores con *Bacillus* como ingrediente activo representan cerca del 85% en el mercado, pero para propósitos de comercialización, se requiere que los procesos de producción aseguren alta concentración celular y alta eficiencia de esporulación razón por la cual la producción de esporas es un paso clave en el desarrollo de bioproductos cuando las BAFEs son el ingrediente activo (Rao *et al*., 2007).

Monteiro *et al*., (2014) reportaron un medio optimizado con vitaminas, nitrógeno, carbono y calcio con el fin de maximizar la eficiencia de esporulación de *B.subtillis* amentando significativamente la concentración final, obteniendo $6{,}3x10^9$ esporas mL^{-1} en relación con el medio control utilizado (Difco ^{TM}).

Con respecto a las condiciones de cultivo, un estudio realizado por Tzeng *et al*.,(2008) demostró un incremento de la concentración de esporas de *B.amyloliquefaciens* para control de *Botrytis elliptica* entre 5 y 8 veces en el medio de producción cuando se modificaron las condiciones de aireación de 300 a 200 rev/min debido probablemente a que a tasas mayores de agitación se produce mayor estrés físico sobre los microorganismos que afectan las producción de esporas bajo condiciones aeróbicas.

En relación a las condiciones nutricionales, un estudio que se realizó para incrementar la producción de esporas en *Bacillus subtilis*, evidenció que el uso de licor de maíz, harina de soya y extracto de levadura eran las mejores fuentes de nitrógeno al aumentar la producción de esporas a 1.52×10^{10} esporas mL^{-1} (Chen et al., 2010).

Díaz-García *et al*., (2015) estandarizaron las condiciones de fermentación liquida para *Bacillus amyloliquefaciens* optimizando las concentraciones de microelementos en el

medio, con el fin de obtener una alta concentración de esporas (aprox. $1x10^{10}$ esporas mL^{-1}) en 60 horas, para el desarrollo de un bioplaguicida dirigido al control de *Fusarium oxysporum* en uchuva.

Con respecto a la producción de otros compuestos involucrados en biocontrol como los lipopéptidos, diversos estudios se han enfocado en evaluar diferentes parámetros tales como oxígeno y nutrientes y su relevancia en los medios de cultivo.

Pretorius *et al*., (2015) reportaron un incremento en la producción de lipopéptidos en un medio de crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* para control de *B.cinerea* en uvas al incrementar el suministro de oxígeno del 21 al 30% en el sistema de producción. Así mismo, evidenciaron que el incremento en la producción de estos compuestos también estaba asociado a concentraciones óptimas de nitratos que para el caso del microorganismo evaluado fue de 8g L^{-1} de NH_4NO_3.

Otros trabajos, como el de Liu *et al.*, (2012) en una investigación sobre aminoácidos reportaron la obtención de variantes de surfactinas con cadenas de ácidos grasos pares al adicionar diferentes suplementos de aminoácidos tales como Arg, Gln o Val al medio de cultivo de *B.subtilis* TD7. En contraste, al adicionar otro conjunto de aminoácidos tales como Cys, His, Ile, Leu, Met, Ser y Thr obtenían cadenas de ácidos grasos impares. Esto indicó que la composición de ácidos grasos en las variantes de surfactina estaba altamente influenciada por la adición de ciertos aminoácidos al medio.

En otras investigaciones relacionadas con lipopéptidos, se ha abordado la optimización de composición de medios para su obtención mediante metodologías como la de superficie de respuesta. Mediante el uso de esta metodología Zhao *et al.,* (2014) optimizaron las condiciones de fermentación para producción de lipopéptidos a partir de *Bacillus* sp BH072 y reportaron un incremento de 45,30 mg mL^{-1} a 52,21 mg mL^{-1} en la concentración de Iturina A alcanzada al final del proceso de fermentación.

Con base en lo anterior, se puede establecer que hay diferentes medios y condiciones de cultivo para cada cepa en razón a sus propios requerimientos y condiciones óptimas de crecimiento (Posada-Uribe *et al*., 2015).

1.5 Formulaciones en control biológico

Un bioformulado puede definirse como un producto que comprende un ingrediente activo (microorganismo, extracto vegetal, metabolito, etc) que ejerce la actividad de biocontrol y auxiliares de formulación (excipientes) que son sustancias inertes cuya función es proteger y liberar el ingrediente activo. Estos a su vez, deben asegurar la estabilidad del producto, promover su dispersión y facilitar su aplicación para asegurar su permanencia en el blanco (Burges, 1998; Ravensberg, 2011; Mischra & Arora, 2016).

1.5.1 Tipos de formulación

Actualmente, hay dos tipos de formulaciones disponibles: las sólidas y las líquidas. Las formulaciones sólidas comprenden polvos, gránulos (GR), microgránulos (MG) y polvos humectables y se obtienen mediante la adición de diferentes excipientes de formulación tales como aglutinantes, dispersantes, agentes humectantes, etc (Mischra & Arora, 2016).

Los productos biocontroladores también pueden presentarse en forma de microcápsulas, empleando técnicas de microencapsulación. Esta técnica consiste en realizar un recubrimiento con un polímero en forma de película delgada sobre la superficie de la biomasa. La cubierta colocada sobre el biocontrolador debe garantizar la estabilidad y permitir la liberación del activo para que cumpla la función biocontroladora. (Winder *et al*., 2003)**.**

Por otro lado, las formulaciones líquidas son conocidas como suspensiones acuosas y consisten de suspensiones de biomasa en agua, aceites o combinación de ambos (emulsiones)(Mischra & Arora, 2016).

1.5.1.1 Suspensiones

Este tipo de formulaciones utiliza usualmente agua o aceite como medio de suspensión. Se pueden obtener suspensiones concentradas y ser posteriormente diluidas para su aplicación (Schisler *et al*., 2004). Los sólidos comprenden entre el 10-40%, el ingrediente de suspensión comprende el 1-3%, el dispersante de 1-5%, surfactante de 3-8% y el portador líquido (aceite o agua) 35 – 65 % (Brar *et al*., 2006)**.**

1.5.1.2 Características de las suspensiones concentradas

Las suspensiones concentradas se obtienen al adicionar el (los) ingrediente(s) activo(s) sólido(s) con baja solubilidad en agua y estabilidad satisfactoria a la hidrolisis (Tadros, 2013).

Un producto presentado en forma de suspensión termodinámicamente es inestable y su tendencia es a precipitar, pero su velocidad de precipitación se controla con el uso de un agente viscosante apropiado cuya función es presentar una fuerza de resistencia en el asentamiento de las partículas durante el almacenamiento. (Burges, 1998).

Las suspensiones concentradas se diluyen en agua previo a su almacenamiento y posterior uso, además para mejorar su estabilidad y su aplicación se pueden adicionar tensioactivos y otros aditivos (Mischra & Arora, 2016)**.**

1.5.1.3 Dispersiones en aceite

Consisten de una suspensión estable del ingrediente activo en aceite o en un solvente no miscible en agua (Michereff *et al*.,2009). Algunas iniciativas en años pasados han validado su importancia, como el estudio realizado por Mbarga *et al*., (2014) en donde desarrollaron una formulación con base en *Trichoderma* y aceite de soya. Mediante esta formulación establecieron un gran potencial para el control de la enfermedad de la vaina negra en cacao, evidenciando un incremento en la sobrevivencia de las conidias del hongo en comparación con la suspensión acuosa.

Las formulaciones en aceite han probado ser mejores en aspectos como la aspersión foliar y altamente efectivas al mejorar la actividad de los entomopatógenos, puesto que el aceite se evapora menos, permaneciendo el producto en contacto con el blanco durante más tiempo (Luz & Batagin, 2005).

1.5.1.4 Emulsiones

La emulsión se define como un sistema líquido - líquido, en donde los dos son inmiscibles quedando uno en el seno del otro en forma de gotas donde para lograr su permanencia como emulsión se debe adicionar un sistema emulsificante, generalmente tensioactivos. El activo puede ir incorporando en cualquiera de las fases según su afinidad o quedar suspendida en la emulsión. Las emulsiones deben cumplir con ciertas

características de textura, dureza y extensibilidad, además de ser estables bajo las condiciones de almacenamiento y aplicación (Burges, 1998).

1.5.2 Excipientes utilizados en formulación

Un gran número de excipientes han sido utilizados en formulaciones experimentales y comerciales de *Bacillus* spp y otros agentes de biocontrol. Estos son de diferentes tipos y pueden ser agrupados bien sea como transportadores o excipientes que mejoran las propiedades físicas, químicas o nutricionales de la biomasa formulada. Algunos ejemplos incluyen: transportadores líquidos como los aceites vegetales, sólidos como las arcillas de caolinita y diatomeas y los de origen orgánico como las harinas de diferentes granos.

Otros excipientes incluyen a los estabilizantes (lactosa, benzoato de sodio), nutrientes (molasas, peptona), aglutinantes (goma arábiga, carboximetilcelulosa), desecantes (sílica gel, sales anhidro), espesantes (goma arábiga), tensioactivos (Tween 80), dispersantes (celulosa microcristalina) y protectantes (oxibenzona) (Schisler *et al*., 2004).

1.5.2.1 Uso de excipientes en formulación de *Bacillus*

Algunos trabajos de formulaciones con *Bacillus* para el control de patógenos, reportan el uso de excipientes que ayudan a mejorar la actividad biocontroladora.

Manjula & Podile, (2001) en su trabajo con formulaciones usaron 0.5% de quitina y compost orgánico de *Agaricus bisporus* para mejorar la tasa de crecimiento de la cepa AF1 de *Bacillus subtilis,* observando actividad de biocontrol y de promoción de crecimiento al utilizar turba en la formulación. Esta formulación en turba y suplementada con quitina demostró un mejor control de marchitez en plantas de arveja causada por *Fusarium udum*.

Otro ejemplo menciona una formulación de la cepa B 190 de *B.amyloliquefaciens* que en mezcla con 0.5% de carbonato de sodio, 0.025% de hidróxido de calcio y con la adición de otros excipientes como carboximetilcelulosa y Tween 80 lograron disminuir la afección por moho gris en lirios (Chiou & Wu, 2003).

Un trabajo de formulación en polvo humectable de *Bacillus licheniformis* menciona el uso de medio *Biji* con adición de aceite de maíz y almidón para control de *Botrytis* en tomate. Una dosis de este producto diluido 100 veces fue óptimo para reducir la enfermedad

mediante aspersión, obteniendo 90.5% de control de la enfermedad con el producto formulado en comparación con 77% de control obtenido con la aplicación del control químico que contaba con carbendazim y dietofencarb como ingrediente activo (J. P. Lee *et al*., 2006).

1.6 Proceso de desarrollo de un bioplaguicida

El proceso de desarrollo de un bioplaguicida se sustenta preliminarmente en estudios de vigilancia tecnológica y análisis de pre factibilidad. Con base en este conocimiento, se inicia el proceso de desarrollo de un nuevo producto el cual comprende: diseño conceptual, prueba de concepto, desarrollo, escalamiento piloto y la fase de registro y transferencia (Diaz *et al.*, 2018).

En la etapa intermedia de desarrollo se abordan los estudios de pre formulación y formulación así como las pruebas de viabilidad y los controles de calidad (microbiológicos, fisicoquímicos). Otros aspectos considerados incluyen la estandarización de pruebas de actividad sobre el blanco (eficacia) y la compatibilidad con agroquímicos (Diaz *et al*., 2018).

1.6.1 Etapa de Pre-formulación

En esta etapa se contempla la recopilación de la información relacionada con el ingrediente activo y los auxiliares de formulación (Villarreal Solano, 2013). Adicionalmente, se establecen las características del tipo de propágulo (células vegetativas o esporas en el caso de las bacterias, conidios o clamidosporas para el caso de los mohos, células vegetativas para el caso de las levaduras) y se determina la evaluación de variables como concentración celular (Diaz *et al.*, 2018).

Con respecto a los auxiliares de formulación, se busca conocer sus propiedades químicas y físicas y sus posibles interacciones con el principio activo. De igual manera también se define el sistema de entrega del microorganismo, que puede ser en sólido (polvos o gránulos) o en líquido (emulsiones, suspensiones concentradas) (Diaz *et al.*, 2018).

1.6.1.1 Compatibilidad principio activo – excipientes

Una vez seleccionados el principio activo y los excipientes, es importante determinar la compatibilidad entre ellos. Por tal razón, se deben realizar pruebas en donde se define la concentración de los excipientes, y se realizan evaluaciones de almacenamiento desde 8 días hasta 3 meses a temperaturas mayores a las de refrigeración. Esto con el fin de determinar un potencial efecto deletéreo de los excipientes sobre el principio activo (Diaz *et al.,* 2018)

Debido a que estas pruebas de compatibilidad deben dar resultados confiables en el menor tiempo posible, los diseños estadísticos experimentales pueden ayudar a reducir el tiempo de evaluación, algunos de estos son (Diaz *et al*., 2018):

Mezcla binaria (mezcla de principio activo con un único excipiente evaluando diferentes condiciones: temperatura, luz, humedad).

Diseño factorial 2n-1 (evaluación simultánea del ingrediente activo con n excipientes o mezclas de estos).

Diseño Plackett Burman (evaluación del efecto de varios excipientes sobre viabilidad del ingrediente activo) que contrario a los diseños factoriales no tiene limitación en el número de tratamientos.

1.6.2 Etapa de Formulación

Teniendo como base la información obtenida en la fase de pre-formulación, se definen los posibles componentes de los prototipos, para lo cual es recomendable el uso de diseños estadísticos experimentales (Huynh-Ba, 2008). Así mismo, durante esta etapa se dan las primeras propuestas para la fabricación del producto y las evaluaciones de estabilidad y eficacia (Diaz *et al*., 2018).

En las etapas finales, se busca establecer la compatibilidad del bioplaguicida con agroquímicos, puesto que una de las principales limitantes es la incompatibilidad que estos puedan tener con otros productos de control usados de manera rutinaria en campo (Grijalba *et al*., 2014).

El uso del bioplaguicida dentro de un esquema de control, será eficaz si es compatible con los otros métodos de control de insectos plaga y enfermedades y permitirá incrementar la productividad de los cultivos, disminuyendo los residuos de productos de síntesis química y promoviendo nuevas alternativas para lograr un control ambiental sostenible (Marcus, 2009).

1.6.2.1 Concentración y viabilidad del agente biocontrolador

La concentración está definida por la cantidad de agente biocontrolador presente en el formulado, aunque no necesariamente refleja su viabilidad ni su actividad. En el caso de productos a base de bacterias, es necesario determinar la viabilidad mediante recuento en placa para determinar el número de UFC (unidades formadoras de colonias) (Santos *et al*., 2012).

1.6.2.2 Contenido de contaminantes

La pureza está determinada por el número total o porcentaje de contaminantes microbianos (levaduras, mohos, bacterias) presentes en un lote de bioplaguicida pudiendo afectar la eficacia y la vida útil del producto, además de ser un riesgo potencial para el agricultor o el consumidor (Diaz *et al*., 2018).

Para el caso de Colombia, es de obligatorio cumplimiento que la pureza de cualquier bioproducto sea mayor o igual al 95%, así como debe estar libre de microorganismos patógenos a humanos, animales y plantas (Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2011).

La carga contaminante de bioproductos se puede cuantificar mediante la técnica de recuento en placa, expresando el nivel de contaminantes en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC mL^{-1}) (Diaz *et al*., 2018).

1.6.2.3 Estabilidad del bioformulado en condiciones de almacenamiento

Para su registro y comercialización, la estabilidad de un bioproducto bajo condiciones de almacenamiento es uno de los principales requisitos. Factores como características de la cepa, tipo de formulación, temperatura, entre otros, determinarán el tiempo durante el cual se conservará la actividad biocontroladora del producto (vida útil) (Santos *et al*., 2012). La vida útil se determina a través del tiempo, sometiendo el producto a diferentes

condiciones de almacenamiento pues durante este periodo los microorganismos pueden sufrir alteraciones ocasionadas por factores del proceso de manufactura (Abadias *et al*., 2003).

La temperatura es un factor determinante en la estabilidad de una formulación, puesto que en algunas ocasiones las bajas temperaturas favorecen el mantenimiento de la actividad controladora (Yadav & Chandra, 2014) contrario a las altas temperaturas que pueden inactivar los microorganismos o pueden afectar los aditivos de la formulación (Santos *et al*., 2012).

1.6.2.4 Pruebas de eficacia

En un bioformulado pueden estar presentándose varios modos de acción, ejercidos por el principio activo y que dependen de las condiciones ambientales. Para el caso de *B.subtilis*, el control de enfermedades en plantas se da por la acción combinada de metabolitos antimicrobianos (Arroyave-Toro *et al*., 2017) o competencia por espacio y nutrientes (Haidar *et al*., 2016). Los ensayos preliminares de eficacia son útiles para evaluar prototipos de formulación, así como sus métodos de aplicación y usualmente se llevan a cabo con el producto formulado final, con repeticiones a pequeña escala (Diaz *et al.*, 2018).

1.7 Productos comerciales con *Bacillus* como principio activo

El mercado para los bioplaguicidas está en aumento y se espera que continúe con esta tendencia. Los productos formulados y registrados de *Bacillus* para su uso contra *Botrytis* incluyen los siguientes (Cawoy *et al*., 2011):

Serenade® (Agra Quest Inc, USA). Basado en *Bacillus subtillis* (QST 713) es comercializado para el control de muchos patógenos foliares, del suelo y para enfermedades bacterianas en campo. Los cultivos en los que se emplea incluyen vid, manzana, pera, banano, cereza, nogal, verduras de hoja, tomate, pimiento, cucurbitáceas, mango, frijol, cebolla ajo, papa, brócoli y zanahoria. Este producto es comercializado en Chile, USA, Nueva Zelanda, México, Japón, Israel, Costa Rica, Filipinas, Guatemala, Honduras, Argentina, Italia, Francia, Turquía, Suiza, Korea, Ecuador, Perú entre otros)

Botrybel® (Agricaldes, España). Basado en *Bacillus velezensis*, es comercializado para el control de *Botrytis* en tomate, lechuga, pimiento, vid, fresas y otros vegetales. Este producto es comercializado en España.

Cease® (Bioworks, Inc USA). Basado en *B. subtilis* es comercializado para el control de patógenos de suelo como *Rhizoctonia, Pythium*, *Fusarium* así como para el control de patógenos foliares como *Botrytis* en varios cultivos. Este producto es comercializado en USA y Mexico)

Ecoshot® (Kumiai Chemical Industry – Japón). Basado en *B. subtilis* es comercializado para el control de *B.cinerea* en vid, cítricos, verduras, leguminosas y otros cultivos en Japón.

1.8 Antecedentes del grupo

Estudios previos realizados en el grupo de investigación de Microbiología agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional evaluaron algunas cepas de levaduras, observando un gran potencial biocontrolador contra *Botrytis cinerea* con los géneros *Cryptococcus* sp, *Rhodotorula* sp y *Pseudozyma* sp (López Ortega, 2012).

En trabajos posteriores evaluando prototipos de formulación sólida con *Rhodotorula mucilaginosa,* se obtuvieron niveles de viabilidad con valores del orden de 10^7 células /mL después de 180 días de almacenamiento (Bautista *et al*., 2016). Adicionalmente, se exploró una alternativa de formulación con liofilización como método de estabilización celular con *Pseudozyma tsukubaensis* (Rivera, 2014)

De igual manera un estudio posterior con *Rhodotorula mucilaginosa* estableció que el talco era el mejor vehículo en formulaciones sólidas, al evidenciar que mantenía la viabilidad y sus características de biocontrol por más de 120 días, no así para *Pseudozyma tsukubaensis* en donde se determinó su incompatibilidad con los aditivos empleados así como pérdida en viabilidad y actividad contra *Botrytis* (Davila, 2015).

De otro lado, se estableció que el efecto residual de ciertos componentes presentes en las formulaciones propuestas con levaduras producían inconvenientes de tipo estético, indeseables en el aspecto final de la flor.

Lo anterior condujo a considerar otro tipo de microorganismos como los Bacilos Aerobios Formadores de Endospora (BAFEs) como candidatos potenciales para el desarrollo de un producto con actividad de control sobre *Botrytis.*

En este contexto, doce cepas de BAFEs evaluadas previamente (Gantiva & Uribe, 2014) fueron utilizados en este estudio, considerando actividad *in vitro* y pruebas de actividad de control en pétalo, seleccionando al final uno como principio activo para ser incluido dentro de un prototipo de formulación líquida para el control de *Botrytis cinerea* en rosas de corte.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Diseñar y evaluar un prototipo de formulación a partir de Bacilos Aerobios Formadores de Endosporas (BAFEs) dirigido al control de *Botrytis cinerea* en rosas.

2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar y caracterizar el aislamiento de BAFEs que presente mayor actividad de biocontrol contra *Botrytis cinerea*.
- Seleccionar y evaluar diferentes excipientes y/o aditivos para una formulación con BAFEs como principio activo.
- Evaluar el prototipo de formulación en términos de pureza, actividad y viabilidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS EMPLEADOS

3.1.1 Bacilos Aerobios Formadores de Endospora - BAFEs

Para el presente estudio se seleccionaron 12 cepas de Bacilos Aerobios Formadores de Endospora (BAFES) denominadas IA1C10, IA3C11, IM2C2, IM2C5, IM2C6, IM3C5, IM4C5, IM4C6, IT1C8, MA3C2, 3A06 y 4P03. Dichas cepas se encuentran crioconservadas a -20ºC en la colección de microorganismos del Banco de cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN).

Los aislamientos seleccionados provienen de rizósfera de iraca, maíz, papa y arroz y se seleccionaron con base en estudios anteriores, en donde se evaluó la capacidad antagónica frente a diferentes patógenos *in vitro* e *in vivo,* particularmente por su actividad biocontroladora contra *Botrytis cinerea*, agente fitopatógeno de rosas de corte que es objeto de estudio en este trabajo (Blanco, 2012; Camelo, 2014; Pedraza, 2015 y Uribe Velez - Comunicación personal, 2017)

Las cepas provenientes de la colección criopreservada a -20°C, se emplearon para generar una colección de trabajo a partir de esporas. Estas esporas fueron obtenidas en medio de esporulación líquido (Abarca *et al*., 1992) con agitación constante a 150 rpm, e incubadas a 27ºC por espacio de 5 días al término de los cuales se sometieron a choque térmico (80°C por 10 minutos). Las suspensiones de esporas de las BAFES así obtenidas fueron conservadas en 20 mL de ADE (Agua Destilada Estéril) en frascos ámbar y almacenadas a 4°C hasta su uso.

Debido a que se ha reportado actividad antifúngica de compuestos presentes en los sobrenadantes (Cawoy *et al.*,2015), estos últimos también fueron preservados para su uso posterior. Brevemente, para la obtención de los sobrenadantes, una vez pasados los cinco días de cultivo, la suspensión de sobrenadante más esporas se sometió a

centrifugación 10.000 rpm durante 5 minutos (Centrifuga Hettich 320R, diámetro rotor 14 cm) y filtrado con filtro Swinnex® tamaño de poro de 0.2 µm. Los sobrenadantes obtenidos se alicuotaron en tubos de microcentrífuga en volúmenes de 1 mL y almacenados a 4°C hasta su uso.

3.1.2 Aislamientos de *Botrytis* sp.

El hongo fitopatógeno *Botrytis* sp. se obtuvo a partir de 10 cultivos monospóricos diferentes, provenientes de igual número de fincas productoras de rosa de la zona Sabana Centro y Sabana Occidente suministrados por el departamento técnico de Gestiones y Representaciones Chía S.A.S. Con el fin de preservar y contar con suficiente material para las pruebas, se realizó multiplicación de cada uno de los cultivos monospóricos mediante la técnica de preservación en papel filtro de acuerdo al protocolo del laboratorio de Microbiología Agrícola con algunas modificaciones**.**

Brevemente, en condiciones de esterilidad, cuadrados de papel filtro de aproximadamente 1cm^2 previamente esterilizados, fueron puestos en contacto con esporas del hongo usando pinzas estériles. En total, 15 papeles de este tipo fueron dispuestos en cajas de Petri con agar-agua por espacio de 3 días a 25ºC.

Pasado este tiempo, los papeles fueron retirados y dispuestos en cajas de Petri estériles vacías para el proceso de secado usando incubadora a 25ºC. Tres días después, los papeles filtro fueron dispuestos en sobres de papel pergamino estériles y conservados a 4ºC hasta su uso. Para esporulación del hongo, un papel filtro se dispuso en el centro de una caja con agar YBG (Extracto de levadura 1%, peptona 1%, glicerol 2%, agar 1%) en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente por espacio de 20 días.

3.2 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS BAFEs CONTRA *Botrytis* sp.

3.2.1 Evaluación de la actividad antagonista de las BAFES en condiciones *in vitro*

La evaluación de la actividad biocontroladora de los BAFES contra *Botrytis* sp se realizó empleando la técnica de enfrentamiento dual de acuerdo a la metodología planteada por Medina *et al*., (2009). Brevemente, un cuadrado de agar de 25 mm^2 del hongo fitopatógeno *Botrytis* sp fue puesto en el centro de una caja Petri de 90 mm de diámetro previamente preparada con medio PDA (Potato Dextrose Agar - OXOID®). En este medio se habían sembrado con 48 horas de anticipación e incubación a 27°C en oscuridad dos estrías de la misma cepa de BAFEs, cada una colocada a 1 cm del borde de los extremos de la caja.

El montaje así preparado se dejó en incubación por 4 días a temperatura ambiente (21 ± 2 ºC) y posteriormente se determinó el área de antagonismo, así como el área de crecimiento del hongo por medio del programa Rhinoceros® versión 5.0. Para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se empleó la siguiente fórmula de acuerdo a (Ahlem *et al*.,2012):

$$\textbf{\% de Inhibición} = \frac{\text{Área cm}^2 \text{ hongo testigo} - \text{Área cm}^2 \text{ hongo de tratamiento}}{\text{Área cm}^2 \text{ hongo testigo}}$$

Estas mediciones se hicieron con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria de crecimiento de cada cepa de BAFE por la presencia de sustancias difusibles en el medio.

3.2.2 Experimentos de biocontrol en condiciones *in vivo* en pétalos de rosa variedad Vendela.

Con el fin de determinar el potencial biocontrolador de las cepas de BAFEs bajo condiciones *in vivo*, se llevó a cabo la evaluación para establecer incidencia y severidad de la enfermedad sobre pétalos infectados con *Botrytis* sp. La metodología se desarrolló de acuerdo a los protocolos establecidos en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y la reportada por Medina *et al,* (2009) con modificaciones.

3.2.2.1 Material vegetal

La variedad de rosas seleccionada para las pruebas *in vivo* fue Vendela, por la facilidad en observación de avance de infección debido a la respuesta hipersensible generada una vez los pétalos son atacados por el hongo fitopatógeno. Este material vegetal fue suministrado por el departamento técnico de Gestiones y Representaciones Chía S.A.S, donde los tallos para los ensayos correspondían a flor nacional sin proceso de inmersión en productos para control de *Botrytis* en poscosecha.

Para propósitos del ensayo, a cada una de las flores se les removieron los cuatro pétalos exteriores (despetale) con el objeto de evitar usar material con signos de maltrato o lesiones. Se utilizaron los pétalos subsiguientes (mínimo 4 - máximo 6) una vez se había realizado el despetale inicial, con el fin de usar el tejido idóneo para lograr infección de acuerdo a recomendación del departamento técnico de Gestiones y Representaciones Chía.

3.2.2.2 Evaluación de actividad antagonista en pétalos de rosa

Para la evaluación de la actividad biocontroladora de cada cepa de BAFEs contra *Botrytis cinerea* empleando como sustrato pétalos de flor se siguió la metodología de pre-inóculo (primero la BAFE y luego el hongo fitopatógeno).

3.2.2.3 Pruebas con suspensión de esporas

Se realizaron pruebas preliminares con la cepa referencia AP 188 (*Bacillus velezensis*) (Liu *et al*., 2017) usando suspensión de esporas ajustada a una concentración de $1x10^8$ UFC mL^{-1}. Se aplicaron 5 µL de esta suspensión en la superficie abaxial del pétalo, disponiendo 9 pétalos en cámaras húmedas preparadas con 2 toallas de papel estéril humedecidas con 40 mL de ADE en recipientes plásticos de 4L de capacidad. Una vez transcurridas 24 horas, se inocularon en el mismo punto de siembra de las BAFEs 5µL de una suspensión de *Botrytis* sp ajustada a $3x10^4$ conidias mL^{-1}, todo esto con tres réplicas. Para el control de enfermedad se aplicaron 5µL de ADE y transcurridas 24 horas, se inoculó una suspensión del hongo fitopatógeno. Para el control absoluto se aplicaron 5 µL de ADE. Al cabo de 5 días a temperatura ambiente (21 ± 2°C), con fotoperiodos de 12 horas, se determinó el porcentaje de incidencia y el índice de

severidad de la enfermedad que fue calculado mediante la fórmula desarrollada por Dik & Webben (2007) y reportada por Garcia (2008):

$$IS = \frac{0(n0)+1(n1)+2(n2)+3(n3)+4(n4)}{n0+n1+n2+n3+n4}$$

En donde,

IS = Índice de Severidad

n0 = número de pétalos afectados en nivel 0 de severidad

n1 = número de pétalos afectados en nivel 1 de severidad

n2 = número de pétalos afectados en nivel 2 de severidad

n3 = número de pétalos afectados en nivel 3 de severidad

n4 = número de pétalos afectados en nivel 4 de severidad

3.2.2.4 Pruebas con suspensión de esporas más sobrenadante

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas preliminares con esporas, se decidió adicionar a la suspensión de esporas el sobrenadante obtenido despues del proceso de fermentación. Teniendo en cuenta lo anterior, se utilizó una mezcla de suspensión de esporas (concentración final: $5x10^6$ UFC mL^{-1}) más sobrenadante (quedando este diluido al 50%) con las 12 BAFEs, aplicando 5 µL a los pétalos y siguiendo la metodología descrita anteriormente.

3.2.3 Identificación molecular de cepa de BAFE y aislamiento de *Botrytis* utilizado en prototipo de formulación

3.2.3.1 Extracción de ADN de las BAFEs

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de actividad antagonista en pétalos de rosa, fueron preseleccionadas tres cepas de BAFEs (IM2C2, IM2C6 e IT1C8) las cuales fueron identificadas utilizando secuencias del gen 16S ADNr y la subunidad A que codifica para la girasa (*gyrA*). La extracción de ADN de las bacterias se realizó a partir de cultivos puros de cada una de las tres cepas preseleccionadas previamente, crecidas en

medio sólido TSA (Tryptone Soya Agar-OXOID®) durante 16 horas aproximadamente (*overnight*), siguiendo el procedimiento del método de lisis alcalina (Tejera *et al*., 2005).

Brevemente, a partir del cultivo puro, se tomó una asada que se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril en donde se habían dispuesto previamente 50µL de buffer de lisis (NaOH 0.05M y SDS 0.25%). Esta suspensión fue posteriormente calentada a 95°C durante 15 minutos, tiempo después del cual fueron adicionados 200 µL de agua HPLC estéril. Por último, se realizó centrifugación a 12,000 rpm durante 5 minutos. El ADN obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.2.3.2 Extracción de ADN del hongo fitopatógeno

De los diez aislamientos de hongos utilizados en la fase *in vitro*, fue seleccionado un aislamiento para ser utilizado en las fases posteriores del estudio. Este fue previamente caracterizado como *Botrytis cinerea* mediante la observación de sus características macroscópicas y microscópicas. Con el objeto de reconfirmar su especie, se realizó su identificación molecular.

El hongo fue reactivado en agar YBG a temperatura ambiente a partir de banco de papel filtro hasta obtener esporulación (15 días aproximadamente). Para realizar la extracción del ADN, se empleó la biomasa obtenida a partir de un cultivo puro y se siguió la metodología de Stirling (2003) con modificaciones.

El micelio con abundante esporulación retirado con aguja micológica, fue colocado en un mortero estéril y macerado adicionando Nitrógeno líquido hasta obtener suficiente biomasa en forma de polvo. La biomasa fue dispuesta en tubos de microcentrífuga de 2mL a los cuales se les adicionó 800 µL de buffer de lisis CTAB (Tris HCl 0.1M pH 8.0, CTAB 1%, NaCl 0.7M, 10mM EDTA, 1% de 2 mercaptoetanol) con proteinasa K (Bioline®) previamente calentado a 57°C.

Después de una hora de incubación, se adicionó un volumen de cloroformo:isoamil alcohol agitando por inversión durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 20 minutos y la fase acuosa fue transferida a un tubo de 1.5 mL. Se adicionó acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol mezclando por inversión para precipitar el DNA dejándolo toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó a 13000g por 20 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados con etanol al 70%, dejando

secar a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 100 µL de agua HPLC estéril para diluir el DNA y este fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.2.3.3 Amplificación de genes de BAFEs por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular se realizó amplificación y secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S ADNr y la subunidad A del gen que codifica para la girasa (*gyrA*). El gen 16S fue amplificado mediante técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) usando los cebadores universales 27F (5´- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3´) y 1492R (5´TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T – 3´) (Lane, 1991) en un termociclador S1000™ Thermal Cycler Bio Rad. El volumen final de mezcla de reacción fue de 50 µL usando las siguientes concentraciones finales de cada componente en la mezcla: buffer de reacción 1X, $MgCl_2$ 1.5mM dNTP´s 0.2mM, cebadores 0.4µM y Biolase DNA pol 1 U.

Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por un minuto y 72°C por 3 minutos con un ciclo final de elongación de 72°C por 15 minutos. Las amplificaciones se realizaron bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio de Microbiología Agrícola – IBUN.

El gen que codifica para la subunidad A de la girasa (*gyrA*) fue amplificado mediante técnica de PCR usando los cebadores universales gyrAF (5´- CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT – 3´) y gyrAR (5´- CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT – 3´) (Chun & Sook, 2000) en un termociclador S1000™ Thermal Cycler Bio Rad. El volumen final de mezcla de reacción fue de 50 µL usando las siguientes concentraciones finales de cada componente en la mezcla: buffer de reacción 1X, $MgCl_2$ 1.5mM dNTP´s 0.2mM, cebadores 0.4µM y Biolase DNA pol 1 U.

Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 50°C por un minuto y 72°C por 2 minutos con un ciclo final de elongación de 72°C por 10 minutos. Las amplificaciones se realizaron bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio de Microbiología Agrícola – IBUN.

Los productos de PCR obtenidos (aproximadamente 1500 bp para 16S y 1000 bp para *gyrA*) fueron visualizados mediante gel de agarosa al 1.2%. Adicionalmente fueron purificados y secuenciados en el servicio de Secuenciación y Análisis Molecular SSiGMol del Instituto de Genética de la Universidad Nacional (IGUN).

La identificación taxonómica de las cepas se llevó a cabo seleccionando el mejor "*match*" empleando el programa de alineamiento BLAST de la base de datos del NCBI *("Basic Local Alignment Search Tool*," 2018).

Para la elaboración de los árboles filogenéticos se usaron secuencias génicas de las especies de bacterias filogenéticamente más próximas a cada una de las cepas preseleccionadas obtenidas de las bases de datos del NCBI. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rDNA y *gyrA* con el software Clustal W (Thompson *et al*., 1997) y se utilizó el algoritmo *Neighboor Joining* (Saitou & Nei, 1987) haciendo validación mediante 1000 réplicas de análisis "*bootstrap".* Para la construcción de los árboles se usó el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

3.2.3.4 Amplificación de genes de *Botrytis* por PCR

Para la identificación molecular se realizó amplificación y secuenciación del gen que codifica para la región espaciadora interna ITS1-5.8s-ITS4. Para este propósito se utilizaron 3µL de muestra de ADN del hongo obtenido como se describió antes, para llevar a cabo el procedimiento de amplificación mediante PCR usando los cebadores universales ITS1 (5´- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3´) e ITS4 (5´- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3´) (White *et al*.,1990) en un termociclador S1000™ Thermal Cycler Bio Rad. El volumen final de mezcla de reacción fue de 50 µL usando: buffer de reacción 1X, $MgCl_2$ 1.5mM dNTP´s 0.2mM, cebadores 0.4µM y Biolase DNA pol 1 U.

Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C por un minuto, 58°C por un minuto y 72°C por dos minutos con un ciclo final de elongación de 72°C por 10 minutos. Las amplificaciones se realizaron bajo las condiciones estandarizadas en el laboratorio de Microbiología Agrícola – IBUN de acuerdo a White *et al.*, (1990).

Los productos de PCR obtenidos (de un tamaño aproximado de 800 bp) fueron visualizados mediante gel de agarosa al 1.2%. Adicionalmente fueron purificados y

secuenciados en el servicio de Secuenciación y Análisis Molecular SSiGMol del Instituto de Genética de la Universidad Nacional (IGUN).

Para la identificación taxonómica se utilizó el programa de alineamientos locales BLAST de la base de datos del NCBI (Basic Local Alignment Search Tool, 2018) con el objeto de seleccionar las secuencias homologas más cercanas.

3.3 DISEÑO Y EVALUACION DE PROTOTIPOS DE FORMULACION LÍQUIDA

3.3.1 Selección de medio para producción de ingrediente activo (BAFEs)

Con el objeto de producir el ingrediente activo para el prototipo de formulación (representado en esporas y sobrenadante) y obtenerlo en el menor tiempo posible, se probaron tres medios reportados en la literatura: medio de esporulación (Abarca *et al*., 1992), medio MOLP (Ahimou *et al*., 2000) y medio TSB (Tryptone Soya Broth - OXOID®).

Los medios se prepararon por triplicado y cada uno fue inoculado con 100µL de suspensión de esporas (concentración $1.0x10^7$ UFC mL^{-1}) de la cepa de BAFEs seleccionado para ser utilizado en el prototipo. El cultivo así preparado se dejó en agitación a 27°C, 150 rpm hasta observar un porcentaje de esporulación superior al 95%, corroborado mediante tinción con cristal violeta. A continuación, se realizaron pruebas de dilución con el fin de establecer la concentración celular final obtenida con cada medio mediante la técnica de microgota. Brevemente, se sembraron tres microgotas (20µL c/u) de tres diluciones (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}) en agar TSA que fueron incubadas a 27ºC por 24 horas y posteriormente se realizó conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}).

3.3.2 Curva de crecimiento en medio seleccionado para producción de ingrediente activo (BAFEs)

Después de la selección del medio, se procedió a realizar una curva de crecimiento del microorganismo para establecer su cinética de crecimiento y de esta forma determinar

el tiempo que tomaba en iniciar el proceso de esporulación así como la concentración celular final obtenida despues del proceso de fermentación. La elaboración de la curva se describe a continuación:

Se hizo reactivación de la cepa seleccionada como ingrediente activo en medio TSA a las 24 h de incubación se tomó una asada para la preparación de los pre-inóculos (15mL) en medio de esporulación los cuales fueron dejados en agitación durante 16 horas a 27°C y 150 rpm. Al día siguiente, estos fueron utilizados para inocular erlenmeyers de 1L de capacidad que contenían 135 mL de medio de esporulación completando así un volumen de 150 mL. Se dejaron en agitación a 150 rpm y 27°C, tomando muestra cada 3 horas para lectura en espectrofotómetro (Thermo Scientific 20 Genesis) a una absorbancia de 600nm. Este procedimiento se llevó a cabo durante las primeras 12 h de la curva y después de este tiempo, se tomó muestra cada 12 horas hasta completar las 96 horas (equivalentes a cuatro días).

Con el fin de establecer el momento de la esporulación, se determinaron las concentraciones celulares mediante diluciones seriadas a partir de las 24 h realizando dos tipos de conteos: uno en donde se realizaron diluciones a la muestra sin choque térmico (para tener el conteo de células totales: vegetativas y esporas) y otro en donde se sometió la muestra a choque térmico (80°C durante 10 min) para establecer el conteo de esporas únicamente.

3.3.3 Selección de componentes mediante evaluación de viabilidad celular

Para encontrar el prototipo de formulación adecuado, fueron evaluados diferentes componentes como auxiliares de formulación. Esto con el fin de garantizar la viabilidad del biocontrolador, así como la estabilidad del mismo durante el tiempo de uso y almacenamiento. Se realizaron pruebas a diferentes concentraciones con 4 polímeros seleccionados y demás componentes como preservantes y tensoactivos los cuales fueron escogidos de acuerdo a la revisión de literatura y la recomendación de un experto. (Barbosa, H. Comunicación personal 2018) (Tabla 3-1):

Tabla 3-1. Componentes y concentraciones utilizadas en pruebas de viabilidad celular.

Componente	Codificación y concentración	Referencias de su uso con microorganismos
Polímero	Pol-1: derivado celulósico (1%)	(Gotor-Vila *et al*., 2017)
	Pol-2: derivado sintético (10%)	(Ramyabharathi & Rajendran, 2016)
	Pol-3: poliol (1%)	(Solanki *et al*., 2012)
	Pol-4: derivado biotecnológico (0,5%)	(Barbosa, 2017-Comunicación personal)
Preservante	Pb 1 (0,05%)	(Barbosa, 2017-Comunicación personal)
	Pb 2 (0,15%)	
	Mezcla Pb 1 (0,05%) + Pb 2 (0,15%)	
	SK (0,5%, 0,05%)	(Ceballos, 2016)
Agente suspensor	S-1 (0,25%, 0,125%, 0,05%)	(Kanjanamaneesathian *et al.*, 2014)
Tensoactivo	T-20 (0,5%)	(Lim & Kim, 2010)

El primer paso para la elección de los excipientes de formulación consistió en determinar el efecto de cada uno de los componentes sobre la viabilidad celular del microorganismo seleccionado. Para este propósito se dispuso en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL de capacidad en volumen final de 1mL, una mezcla en proporción 50:50 que consistió de: polímero a diferentes concentraciones (Tabla 3-1) y suspensión de esporas y sobrenadante de la cepa seleccionada para el prototipo evaluando cada polímero por separado. Una vez realizada la mezcla de polímero y cepa, los tubos de microcentrifuga fueron sellados con papel Parafilm “M”® y dispuestos en agitador orbital Thermo Scientific MAX Q 4000 por espacio de cinco días para los polímeros, agente suspensor y tensoactivo y 48 horas para los preservantes. En cada prueba con cada componente se utilizaron tres réplicas.

Pasado este tiempo se realizaron 6 diluciones seriadas por cada repetición con el fin de establecer la presencia/ausencia de cambios en la viabilidad celular mediante medición de la concentración celular final después de la mezcla con cada componente. Se sembraron tres gotas de las últimas tres diluciones (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}) en agar TSA que fueron incubadas a 27ºC por 24 horas y posteriormente se realizó conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}).

3.3.4 Pruebas de adherencia con polímeros

Con el fin de establecer diferencias con respecto a la adherencia entre los polímeros seleccionados para el prototipo, se realizaron pruebas utilizando suspensión de esporas más sobrenadante en mezcla con cada uno de los polímeros. Brevemente, en tubos de microcentrifuga se dispusieron 2 mL de mezcla de principio activo y polímero en la siguiente proporción: 75% de solución de esporas-sobrenadante (ajustada a concentración final de $1x10^7$ UFC mL^{-1}) y 25% de cada polímero (cada uno con tres réplicas). Se utilizó esta proporción con el fin de privilegiar la concentración de ingrediente activo y diluirlo lo menos posible en la mezcla con el polímero cuyas concentraciones se detallan a continuación:

Pol-2: 5% y 0.05%

Pol-3: 0.5% y 0.005%

Las dos concentraciones evaluadas se eligieron con el objeto de comparar la adherencia en dos concentraciones: una concentración inicial y otra al diluir 100 veces esa concentración inicial.

Tres secciones rectangulares de tejido de hoja de rosa con un área equivalente a 1 cm^2 (0.5 cm x 2 cm) se sumergieron en un mismo tubo con la mezcla por espacio de 5 minutos y posteriormente fueron dejadas sobre una caja de Petri con base de palillos de madera durante 1 hora en cabina de flujo laminar para secado.

Pasado este tiempo, cada una de las secciones fue puesta en un tubo de microcentrifuga que contenía 2 mL de Tween 80 al 0.03% y fue sometida a vortex por 1 minuto para propiciar el desprendimiento de las esporas que se hubieran quedado adheridas al tejido por acción del polímero.

A partir de esta solución de Tween, se realizaron 3 diluciones seriadas por cada sección de tejido con el fin de establecer la concentración celular presente en la muestra después del contacto con polímero. Se sembraron tres gotas de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} en agar TSA que fueron incubadas a 27ºC por 24 horas y posteriormente se realizó conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}).

3.3.5 Diseño del prototipo de formulación

Una vez seleccionados los componentes de acuerdo a los resultados de viabilidad celular después de 5 días de prueba, se definieron combinaciones de componentes basados en el rol desempeñado por cada uno (polímero, agente de suspensión, tensioactivo y preservante) obteniendo 5 prototipos de formulación. Con el objeto de evitar procesos de contaminación en los prototipos se decidió mezclar los componentes de cada uno de los prototipos en frascos de 100 mL de capacidad empleando un volumen de 6 mL de agua destilada con el objeto de llevarlos a esterilización a 15 psi durante 20 minutos. Esto se llevó a cabo luego de verificar que la temperatura de esterilización no sobrepasara la temperatura de estabilidad térmica de los compuestos empleados (Rowe *et al*., 2009).

El ingrediente activo del prototipo (esporas y medio con presencia de metabolitos secundarios de la cepa seleccionada de acuerdo a los resultados de pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo*) se obtuvo de la siguiente manera:

Se usaron 6 erlenmeyers de 125 mL de capacidad y en cada uno se dispusieron 15 mL de medio de esporulación estéril. Cada uno de los erlenmeyers fue inoculado con una colonia de la cepa seleccionada y fueron dejados aproximadamente 16 horas (*overnight*) en agitación a 150 rpm y 27°C.

A la mañana siguiente, se unió el contenido de todos los erlenmeyers como preinóculo en un solo recipiente con el objeto de asegurar que las tres replicas estuvieran sincronizadas en términos de concentración de inóculo y fase de desarrollo celular, obteniendo un volumen total de 90 mL.

Posteriormente se tomaron 30 mL de este medio para inocular un erlenmeyer de 1L que contenía 270 mL de medio de esporulación estéril, completando así un volumen de 300 mL. Esto se realizó por triplicado teniendo en cuenta que con este volumen en cada erlenmeyer se produciría el ingrediente activo necesario para cinco prototipos.

Posteriormente, los erlenmeyers fueron puestos en agitador orbital Thermo Scientific MAX Q 4000 a 27°C y 150 rpm por espacio de 5 días. Finalizado este tiempo, se tomó un volumen de 54 mL del ingrediente activo obtenido después del proceso de fermentación y se mezcló con los 6 mL de solución de cada prototipo previamente preparado, obteniendo un volumen final de 60 mL de producto formulado. El producto formulado posteriormente se dividió en alicuotas de 10 mL que fueron dispensados en tubos

cónicos de microcentrifuga tipo Falcon® de 15 mL de capacidad distribuyéndolos de la siguiente manera: 2 tubos que fueron almacenados a 4°C y 2 tubos que fueron almacenados a 25°C. Los 20 mL sobrantes fueron conservados en tubos Falcon® de 15 mL a 25°C como soporte y reemplazo en caso de algún contratiempo. De los almacenamientos a cada temperatura un tubo fue utilizado para probar viabilidad y pureza y el otro tubo fue utilizado para pruebas de actividad en tejido vegetal en dos tiempos: T0, utilizando pétalos una vez el prototipo fue obtenido y T2, utilizando flor completa cumplidos 120 días de almacenamiento (Figura 3-1).

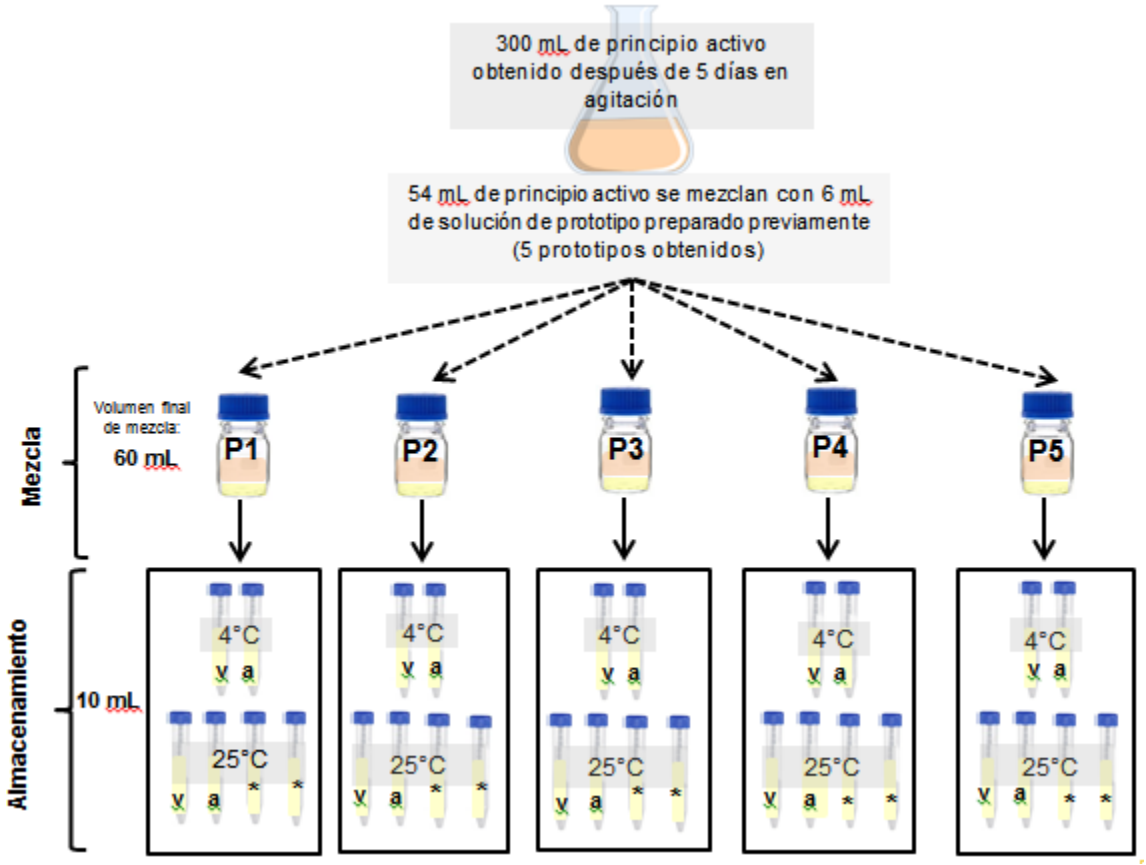


Figura 3-1. Esquema del proceso de formulación una vez obtenido el principio activo hasta dosificación del producto para almacenamiento. **P**: Prototipo. **v**: tubo destinado para pruebas de viabilidad. **a**: tubo destinado para pruebas de actividad en pétalos y en flor completa. ***Tubos repuesto. Procedimiento se realizó por triplicado.

Del procedimiento descrito anteriormente se realizaron 3 repeticiones en el tiempo. Los tiempos de determinación de viabilidad para cada formulación fueron:

Formulación 1: Día 1, Día 30, Día 60, Día 90 y Día 120.

Formulación 2: Día 1, Día 30, Día 60 y Día 90

Formulación 3: Día 1, Día 30, Día 60.

Las pruebas de actividad (tanto en pétalo como en flor completa) fueron llevadas a cabo con la formulación que contaba con más tiempo de almacenamiento (Formulación 1)

3.3.6 Pruebas de viabilidad y pureza de prototipos

Con el fin de determinar la viabilidad y pureza de cada uno de los prototipos definidos se realizaron lecturas en el tiempo empleando la técnica de microgota de la siguiente manera: tiempo cero (0) (una vez fue realizada la formulación), tiempo 1 (30 días después de formulación), tiempo 2 (60 días después de formulación), tiempo 3 (90 días después de formulación) y tiempo 4 (120 días después de formulación).

Para tal fin, se realizaron 6 diluciones seriadas por cada prototipo y temperatura de almacenamiento (4°C y 25°C) con el fin de establecer la concentración celular final después de cada uno de los tiempos establecidos. Se sembraron tres diluciones (10^{-4}, 10^{5}, 10^{-6}) y tres gotas por dilución en agar TSA empleando la técnica de microgota, las cuales fueron incubadas a 27ºC por 24 horas y posteriormente se realizó conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL $^{-1}$). Adicionalmente se tomaron 100 µL de la última dilución (10^{-6}) y se sembraron en agar TSA con asa de Digralsky. Fueron incubadas a 27ºC por 24 horas y posteriormente se realizó observación de colonias para determinación de pureza.

3.3.7 Pruebas de actividad de prototipos

3.3.7.1 Pruebas de actividad en pétalo

Con el fin de determinar el potencial biocontrolador de los diferentes prototipos propuestos (almacenados a 4°C y 25°C) bajo condiciones *in vivo*, se llevó a cabo la evaluación para establecer porcentaje de eficacia de estos sobre pétalos infectados con *Botrytis cinerea*. La metodología se desarrolló de acuerdo a los protocolos establecidos por el departamento técnico de Gestiones y Representaciones Chía S.A.S con modificaciones.

Brevemente, las pruebas se realizaron con flor nacional variedad Vendela, sin proceso de inmersión en productos para control de *Botrytis* en poscosecha. Para propósitos del ensayo, a cada una de las flores se les removieron los cuatro pétalos exteriores (despetale) para evitar usar material con signos de maltrato o lesiones. Posteriormente se utilizaron los pétalos subsiguientes (mínimo 4 - máximo 6) una vez realizado el despetale inicial con el fin de usar el tejido idóneo para lograr infección.

Recipientes plásticos de 1kg de capacidad fueron preparados previamente poniendo en su interior una servilleta y una malla encima de esta que sirviera de soporte de los pétalos. Se tomaron los pétalos por su superficie abaxial y se sacaron con ayuda de un sacabocados discos de pétalo de 18.7 mm de diámetro. A cada uno de los discos se les realizó inmersión por cinco segundos en cada uno de los prototipos preparados en dilución 1:10 y fueron puestos a secar en los recipientes plásticos sobre la malla, disponiendo 16 discos de pétalos por caja.

Pasadas dos horas y después de confirmar que los discos de pétalos estuvieran secos, se aplicó en el centro de cada uno de ellos, 2 µL de una suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* ajustada a $7x10^4$ conidias mL^{-1} todo esto con tres réplicas por prototipo. Para el testigo comercial (Sanystar®, Ingrediente Activo- I.A -Iminoctadine Tris) se siguió el mismo procedimiento, usando dosis comercial de 0,75 cc L^{-1}. De igual manera, para el control de enfermedad se aplicaron 2 µL de la suspensión de conidias de *Botrytis* sin hacer inmersión en ningún producto y para el testigo absoluto se aplicaron 2 µL de agua destilada estéril.

Al cabo de tres días a temperatura ambiente, con fotoperiodos de 12 horas, se determinó el área de infección causada por el hongo en el disco de pétalo con ayuda de un calibrador digital y posteriormente se determinó el porcentaje de eficacia de los prototipos evaluados mediante la siguiente fórmula:

$$\textbf{(\%) Porcentaje de eficacia =} 1-(PIT/PITe)*100$$

En donde:

PIT corresponde a Promedio de Infección Tratamiento

PITe corresponde a Promedio de Infección Testigo enfermedad

3.3.7.2 Pruebas de actividad en flor completa

Con el fin de determinar el potencial biocontrolador, se seleccionaron para esta prueba los prototipos que presentaron el mejor desempeño en la prueba de pétalo. La metodología se desarrolló de acuerdo a los procedimientos descritos por Medina *et al*., (2009), López Ortega, (2012) y Dávila, (2015)

El material vegetal fue suministrado por el departamento técnico de Gestiones y Representaciones Chía S.A.S realizando las pruebas con flor nacional, variedad Vendela sin proceso de inmersión en productos para control de *Botrytis* en poscosecha. Para propósitos del ensayo, a cada una de las flores se les removieron los cuatro pétalos exteriores (despetale) para evitar usar material con signos de maltrato o lesiones y los tallos fueron cortados a una longitud de 35 cm para facilitar su manejo durante el montaje de la prueba.

Los prototipos seleccionados (contando con tres réplicas por prototipo) fueron preparados en dilución 1:10 con agua estéril y se aplicaron 3 mL de preparación a todo el perímetro de la cabeza floral con ayuda de un atomizador.

Los tallos (5 por cada florero) fueron dispuestos en recipientes plásticos de 1L de capacidad los cuales contenían 900 mL de agua clorada al 0.1%. Al día siguiente, con ayuda de un atomizador se asperjaron sobre las cabezas florales 3 mL de una suspensión de *Botrytis* ajustada a $1{,}0x10^4$ conidias mL^{-1}, cubriéndolas posteriormente con una bolsa plástica y asegurando con un caucho, esto con el fin de generar condiciones de alta humedad relativa.

Para el testigo comercial (Sanystar®) se siguió el mismo procedimiento, aplicando 3 mL por cabeza floral y usando dosis comercial de 0,75 cc L^{-1} de producto. Para el testigo absoluto se asperjaron 3 mL de ADE y para el control de enfermedad se aplicó el mismo volumen de inóculo de *Botrytis* sin aplicación previa de ningún producto.

Los floreros fueron ubicados en un cuarto a temperatura ambiente con fotoperiodos de 12:12 horas luz:oscuridad. Al cabo de cuatro días, se realizó lectura de incidencia y severidad en flor según la escala utilizada en el laboratorio de microbiología agrícola (Bautista *et al*, 2016). Posteriormente se realizó muestreo destructivo para la determinación de incidencia y severidad de la enfermedad tomando 10 pétalos por cada

flor de cada réplica, teniendo en total 150 pétalos evaluados por tratamiento. Para la lectura de la prueba, se empleó la escala de severidad de Medina *et al*., (2009).

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de datos se realizó una valoración de supuestos (normalidad, homocedasticidad) mediante las pruebas de Shapiro Wilk, Anderson Darling, Cramer Von Mises y Kolmogorov-Smirnov para prueba de normalidad y prueba de Levene para el caso de homocedasticidad. Se realizó análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% usando la prueba de Tukey para la separación de medias en los casos donde se presentaron diferencias significativas usando el programa estadístico S.A.S versión 9.4.

3.5 ESQUEMA DE TRABAJO

El siguiente esquema muestra un resumen de la metodología que se siguió durante el desarrollo de la investigación (Figura 3-2):

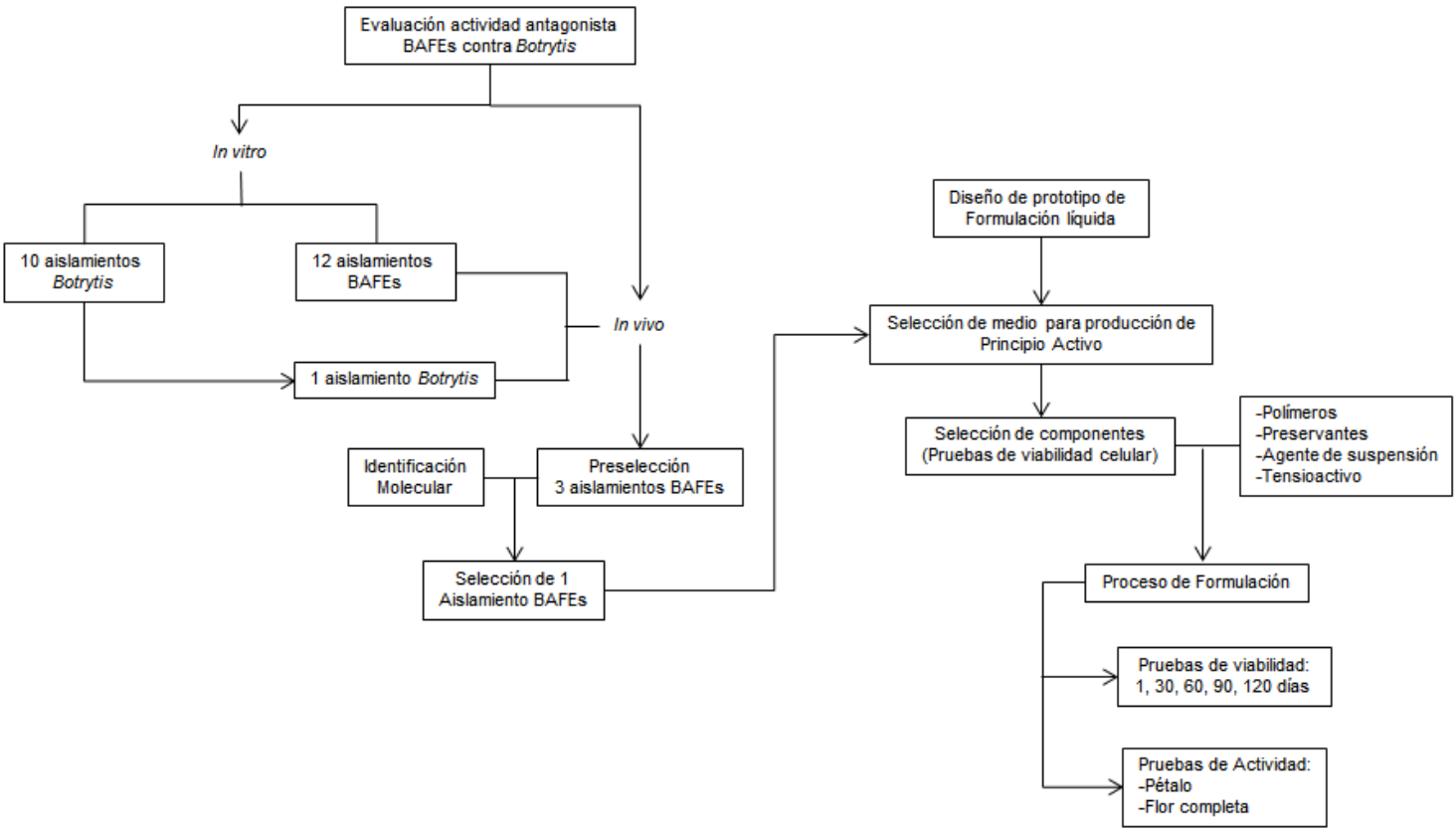


Figura 3-2. Esquema de trabajo para obtención de prototipo de formulación líquida**.**

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS BAFES CONTRA *Botrytis* sp.

4.1.1 Evaluación de la actividad antagonista de las BAFES en condiciones *in vitro*

En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, se evaluó la capacidad antagonista de diferentes cepas de BAFEs contra varios patógenos como *Burkholderia glumae* (Pedraza, 2015)*, Rhizoctonia solani* (Blanco, 2012) y *Botrytis cinerea* (Camelo, 2014) (Gantiva & Uribe, 2014) obteniendo resultados sobresalientes con doce cepas que fueron utilizadas como punto de partida en este estudio.

Por otra parte, se ha reportado una alta variabilidad genética para *Botrytis cinerea* en cultivos de rosa de la Sabana de Bogotá (Gómez, 2013) por lo que las doce cepas de BAFEs seleccionadas fueron evaluadas contra diez aislamientos monospóricos de *Botrytis* provenientes de igual número de fincas productoras de flores.

Para esta primera fase *in vitro* se evaluó la capacidad inhibitoria de las BAFEs por sustancias difusibles en el medio en función del área de antagonismo obtenida. Esto con el objeto de seleccionar una cepa de BAFEs para usar como principio activo en el prototipo. Adicionalmente se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo con el fin de seleccionar un aislamiento fúngico para utilizar en las pruebas posteriores.

Con respecto al área de antagonismo, todos las cepas de BAFEs seleccionadas mostraron capacidad antagonista medida en función de los halos de inhibición *in vitro,* contra todos los aislamientos de *Botrytis cinerea* evaluados y se destacaron por mostrar un área de antagonismo promedio de 24.68 cm^2. Teniendo en cuenta que en trabajos anteriores (Blanco, 2012 y Camelo, 2015) la medida base para calificar la interacción como antagonista se definió a partir de 9.51 cm^2, en este trabajo se pudo determinar el gran potencial antagónico de estas cepas contra *B. cinerea* dado que el área promedio obtenida fue 2.58 veces mayor a la establecida en dichos estudios.

Las cepas IA1C10, IM4C5 e IM4C6 presentaron los mayores valores de antagonismo al ser evaluados contra los aislamientos de *Botrytis cinerea* procedentes de las fincas Hato (HT), Melody (ML) y Santana (SN) respectivamente (Figura 4-1).

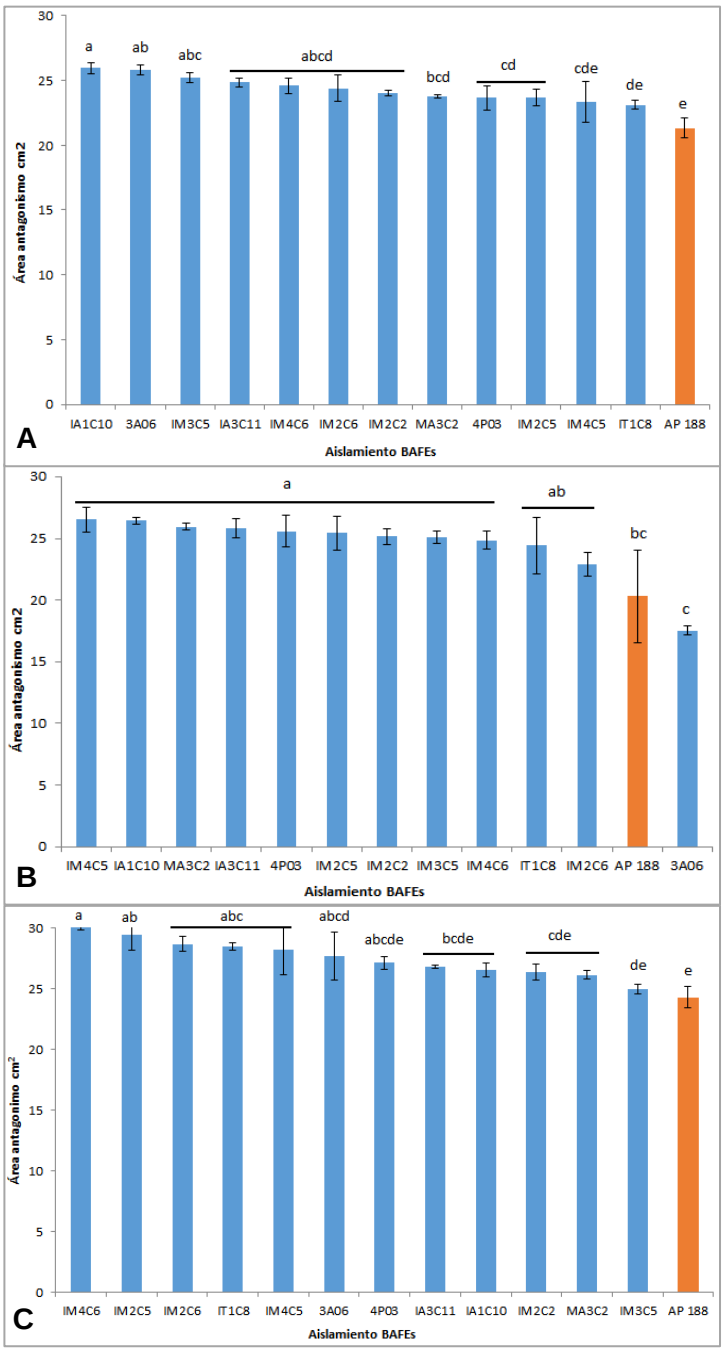


Figura 4-1. Área de antagonismo obtenida en evaluación *in vitro* de 12 cepas de BAFEs contra aislamientos de *Botrytis cinerea* provenientes de las fincas: A. Hato (HT) B. Melody (ML) y C. Santana (SN)**.** Datos corresponden a la media de 3 réplicas. AP 188: Cepa referencia. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Por su parte, la cepa 4PO3 presentó las mayores áreas de antagonismo en 6 de los 10 aislamientos de *Botrytis* evaluados: (Ciprés (CP), Mountain (MO), Aljibe (AL), Jayvana (JV), Tandil (TN) y Flores Bojacá (FL)) (Anexo B).

De igual manera, al analizar los valores del área de antagonismo de todas las cepas de BAFEs contra todos los aislamientos de hongos, tres de las cuatro cepas mencionadas anteriormente presentaron los mayores valores de área de antagonismo aunque estadísticamente fueron similares al resto de cepas evaluadas. La cepa 3AO6 se caracterizó por presentar la menor área de antagonismo (22.15 cm^2) y 10 de las 12 cepas evaluadas tuvieron área de antagonismo mayor a la mostrada por la cepa referencia AP 188 (Figura 4-2).

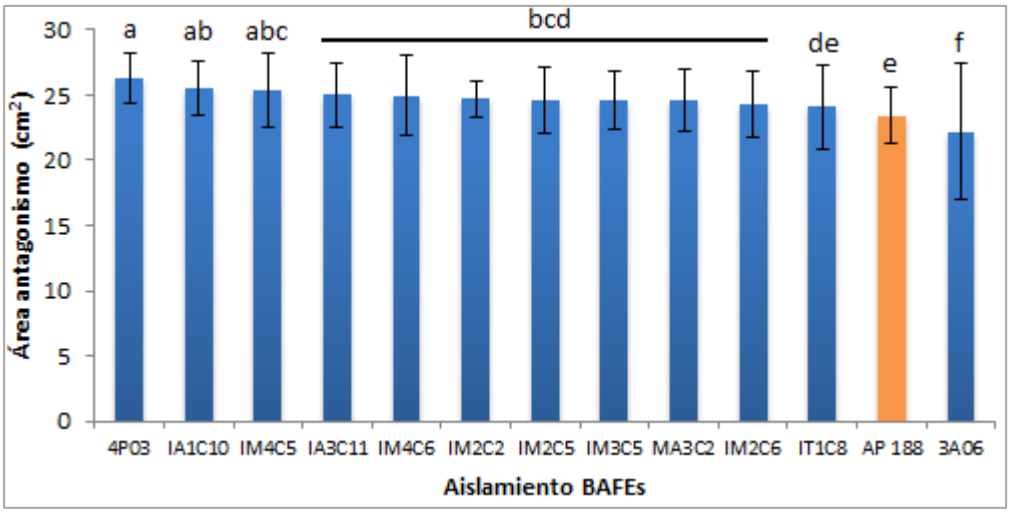


Figura 4-2. Área de antagonismo obtenida en evaluación *in vitro* de 12 cepas de BAFEs contra 10 aislamientos de *Botrytis cinerea***.** AP 188: Cepa referencia. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Los resultados anteriormente descritos ratifican los resultados obtenidos previamente con estas cepas en pruebas de similares características (Gantiva & Uribe, 2014).

Así mismo, concuerdan con los hallazgos de Cawoy *et al*., (2015) quienes observaron antagonismo directo de cepas de bacterias de las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* contra hongos fitopatógenos tales como *Fusarium, Cladosporium, Pythium* y *Botrytis* atribuido a la secreción de compuestos antimicrobianos altamente activos.

De igual manera, Abdelmoteleb *et al*.,(2017) mostraron reducciones considerables en el crecimiento de hongos fitopatogenos tales como *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* presentándose el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento en *Botrytis* al ser enfrentado contra *B. subtilis* cepa "ALICA". Este estudio sugiere que antibióticos producidos por esta cepa de *Bacillus* pueden ser los responsables de la inhibición del crecimiento del patógeno, siendo la antibiosis el modo de acción prevalente, dado por la expresión de genes que codifican para los lipopéptidos subtilosina y subtilisina.

Por otro lado, Lim *et al*., (2017) evidenciaron que la cepa G341 identificada posteriormente como *B. velezenzis* inhibía significativamente el crecimiento micelial de diferentes patógenos fúngicos tales como *Alternaria panax, Colletotrichum coccodes, Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea.*

Dado que en esta instancia se observó un desempeño sobresaliente de todos las cepas de BAFEs en cuanto al área de antagonismo, las similitudes entre estos desde el punto de vista estadístico no permitieron seleccionar en esta instancia una sola cepa. Probablemente el carácter artificial de las condiciones bajo las cuales se probaron las cepas de BAFEs en antagonismo *in vitro*, no permitieron que se diferenciara con claridad una cepa (o grupo de cepas) que pudiera ser seleccionada para su uso en el prototipo.

Referente a los diferentes aislamientos de hongos evaluados, se analizó el porcentaje de inhibición de crecimiento con el fin de escoger el aislamiento fúngico que fuera más resistente a los compuestos antimicrobianos de las BAFEs para que pudiera ser usado en las pruebas posteriores.

De manera general, todos los aislamientos de hongo excepto Ciprés (CP), presentaron porcentajes de disminución de crecimiento superiores al 95% siendo los aislamientos de *Botrytis* provenientes de las fincas Tandil (TN) y Melody (ML) los que mostraron la mayor reducción de crecimiento (98.73% y 97.87% respectivamente), presentando diferencias estadísticas con los demás aislamientos (Figura 4-3).

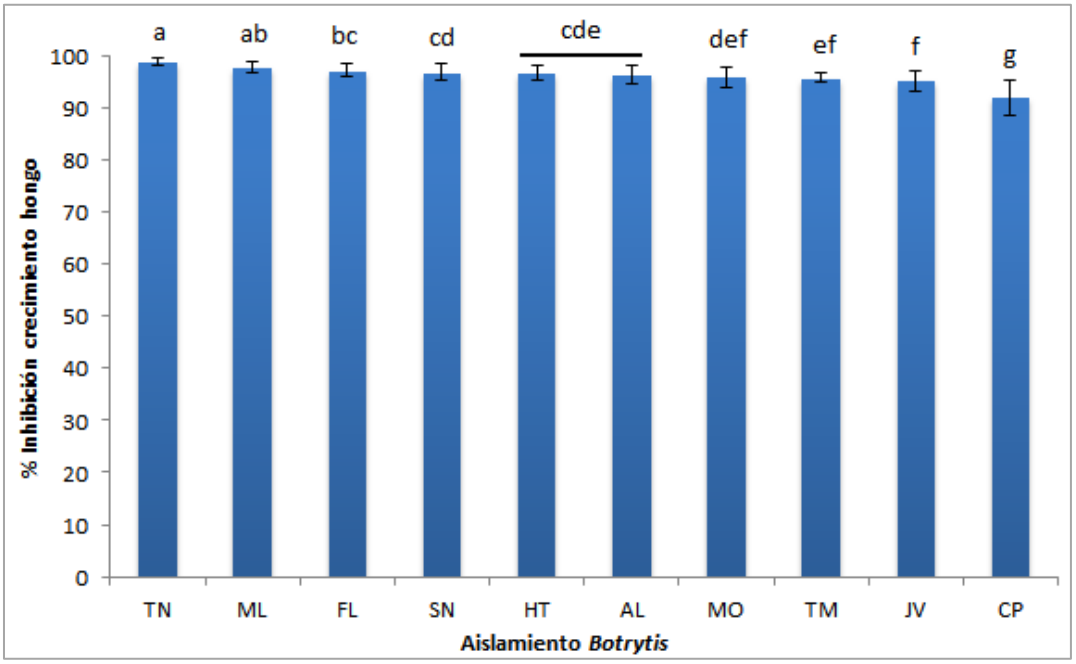


Figura 4-3. Porcentaje de inhibición de crecimiento de hongo obtenido en evaluación in vitro de 10 aislamientos de *Botrytis cinerea* (TN:Tandil, ML:Melody, FL: Flores Bojacá, SN: Santana, HT: Hato, AL: Alijibe, MO: Mountain, TM: Torremolinos, JV:Jayvana y CP:Ciprés) enfrentados contra 12 cepas de BAFEs. Diferentes letras minúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Lo anterior podría sugerir entre otras cosas, un amplio espectro de actividad de las cepas de BAFEs, ante una alta variabilidad de aislamientos de hongos. Este hecho podría aumentar los mecanismos de control por explotar ante los fenómenos de resistencia que se están generando en campo. En razón a esto, se ha hecho necesario elaborar planes de manejo diferenciales para cada finca según la resistencia o susceptibilidad del hongo a los diferentes ingredientes activos utilizados (Aponte, 2017 – Comunicación personal).

La variabilidad genética en poblaciones de *Botrytis* (confirmada en cultivos de rosa en la Sabana de Bogotá) ha sido reportada ampliamente en otros estudios. En cultivos de fresas en Lituania por ejemplo, encontraron que el 16.95% de los aislamientos analizados correspondía al grupo I (*Botrytis pseudocinerea*) y el 83.05% correspondía al grupo II (*Botrytis sensu estricto*) lo cual estaba correlacionado también con la resistencia (grupo I) o sensibilidad (grupo II) al ingrediente activo fenexamid, utilizado en esquemas de control de la enfermedad. (Rasiukevičiūtė *et al*., 2018)

Así mismo, un estudio realizado en Hungria reveló diferenciación genética en la población de *Botrytis* aislada a partir de frutos (frambuesas y fresas) y tallos de plantas de colza para los dos grupos (grupo I: *B. pseudocinerea*; grupo II: *B. sensu stricto*). (Fekete *et al*., 2012)

De modo general todas las cepas de BAFEs mostraron resultados prometedores en cuanto a inhibición de crecimiento del hongo, por lo que todos continuaron siendo considerados como candidatos potenciales para hacer parte del prototipo como ingrediente activo.

En cuanto a los aislamientos de hongos evaluados, se evidenció que el aislamiento proveniente de la finca Ciprés (CP) presentó el menor porcentaje de inhibición de crecimiento contrastando de manera importante al compararse con aislamientos de otras fincas como por ejemplo Tandil (TN) (Figura 4-4).

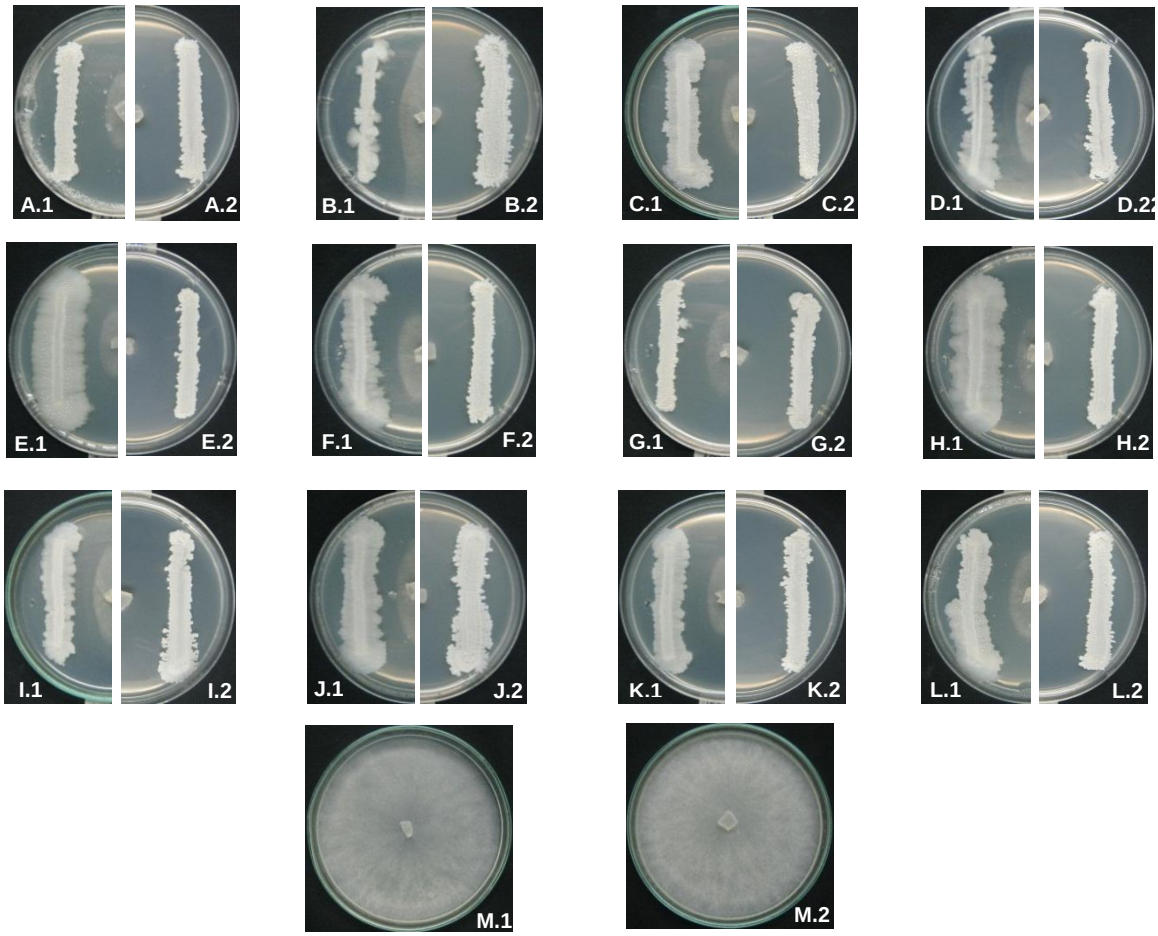


Figura 4-4. Cepas de BAFEs mostrando antagonismo contra aislamiento de *Botrytis cinerea* proveniente de Finca Ciprés (1) y Finca Tandil (2)**.** A. IA1C10 B. IM2C5 C. IM4C5 D. IM3C5 E. 3A06 F. IM4C6 G. 4PO3 H. IM2C6 I.MA3C2 J.IT1C8 K. IA3C11 L. IM2C2 M1. Control *Botrytis* Ciprés M2. Control *Botrytis* Tandil*.* Fotografías tomadas después de 4 días de inoculación con el hongo. Fuente: Autora 2017.

El departamento técnico de la empresa proveedora de los cultivos monospóricos con los cuales se realizó este estudio, manifestó que el comportamiento del hongo proveniente de esta finca en campo era complejo en su manejo, con medidas estrictas en cuanto a control químico y cultural (Aponte, Comunicación personal (2017)).

Por lo tanto, a partir de las pruebas de antagonismo *in vitro* y en concordancia con lo manifestado por el departamento técnico, el aislamiento de hongo que fue seleccionado para trabajar en las fases posteriores de este estudio fue el aislamiento proveniente de la finca Ciprés (CP)

4.1.2 Experimentos de biocontrol en condiciones *in vivo* en pétalos de rosa variedad Vendela

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, no fue posible seleccionar una cepa de BAFEs que se destacara del resto para que pudiera ser utilizada como principio activo para el prototipo de formulación. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de biocontrol de todos las cepas contra el hongo proveniente de la finca Ciprés, en pétalos de rosa variedad Vendela, midiendo el porcentaje de incidencia y el índice de severidad.

4.1.2.1 Pruebas con esporas. Con el fin de evaluar de forma preliminar la actividad biocontroladora de las esporas, se utilizó una suspensión ajustada a $1x10^8$ UFC mL^{-1} de la cepa referencia AP188 (*Bacillus velezensis*) (Liu *et al*., 2017) y se aplicó en modo preventivo (primero la BAFE, 24 horas después el hongo) en pétalos de rosa. Al cabo de 5 días, se obtuvieron valores de 96% para incidencia y 3,9 para índice de severidad, sin presentar diferencias estadísticas con el control de enfermedad (Figura 4-5), indicando que bajo las condiciones experimentales, las esporas no presentan un mecanismo de acción eficiente para disminuir los síntomas de la enfermedad causada por *B.cinerea.*

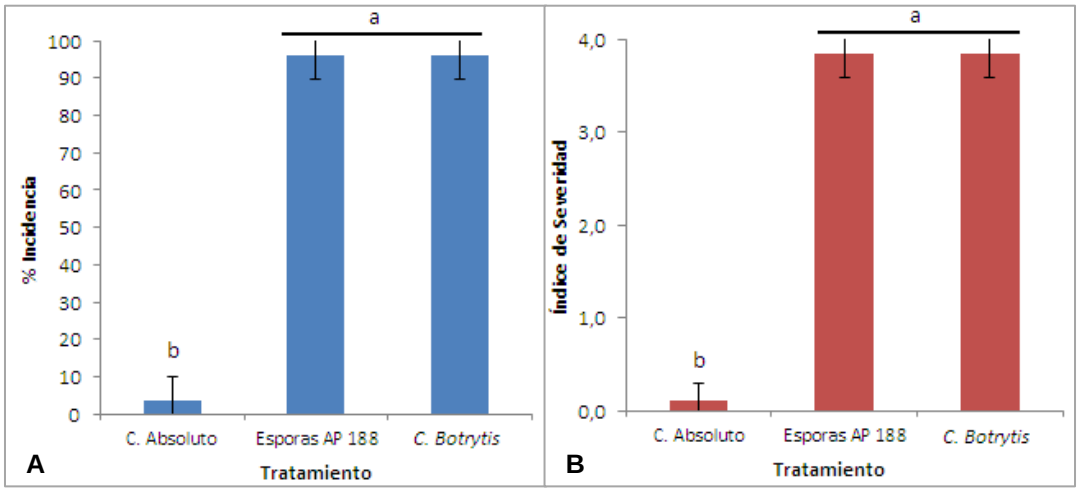


Figura 4-5. Evaluación de actividad de biocontrol usando suspensión de esporas de la cepa referencia AP 188 en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).

4.1.2.2 Pruebas con sobrenadante.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se realizó una prueba adicionando a la suspensión de esporas el sobrenadante obtenido despues del proceso de fermentación. La concentración final de esporas quedo en $5x10^7$ $UFCmL^{-1}$ y el sobrenadante adicionado quedo diluido al 50%. La inoculación se realizó de igual manera al caso anterior y despues de 5 días de incubación, se obtuvieron valores de 4% y 0,1 en porcentajes de incidencia e índice de severidad respectivamente presentando diferencias estadísticas con el control de enfermedad y sin diferencias estadísticas con el control absoluto (Figura 4-6).

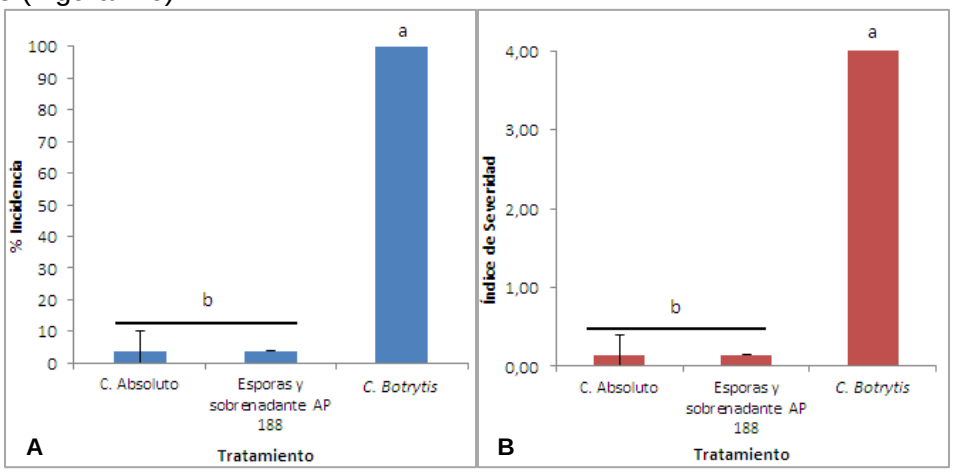


Figura 4-6. Evaluación de actividad de biocontrol usando suspensión de esporas y sobrenadante de la cepa referencia AP 188 en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).

Las pruebas preliminares realizadas con la cepa referencia AP188 mostraron que los resultados de biocontrol con esporas eran bajos en comparación de la actividad ejercida por las esporas más los sobrenadantes. Teniendo en cuenta lo anterior, en todas las pruebas subsiguientes en pétalos se usaron también los sobrenadantes.

Con el fin de evaluar la actividad biocontroladora de las esporas y el sobrenadante obtenido de cada uno de las cepas después de agitación en medio de esporulación durante 5 días, se utilizó como inóculo una mezcla que consistió de suspensión de esporas a concentración final de $5x10^6$ esporas mL^{-1} en mezcla con sobrenadante puro quedando este diluido al 50%.

Para facilidad en el montaje de las pruebas, las BAFES fueron separadas en dos grupos:
Grupo 1: cepas IM4C5, 3A06, IM4C6, IT1C8, IM3C5 e IA3C11.
Grupo 2: cepas IA1C10, 4P03, IM2C6, IM2C2, MA3C2 e IM2C5.

4.1.2.3 Evaluación BAFEs: las cepas IM4C5 e IA3C11 con valores de porcentajes de incidencia e índices de severidad de cero presentaron el mejor desempeño en las cepas probados en este primer grupo, en tanto que la cepa 3A06 presentó los resultados de biocontrol menos favorables, con los valores más altos en porcentaje de incidencia e índice de severidad (96% y 3.74 respectivamente) (Figura 4-7).

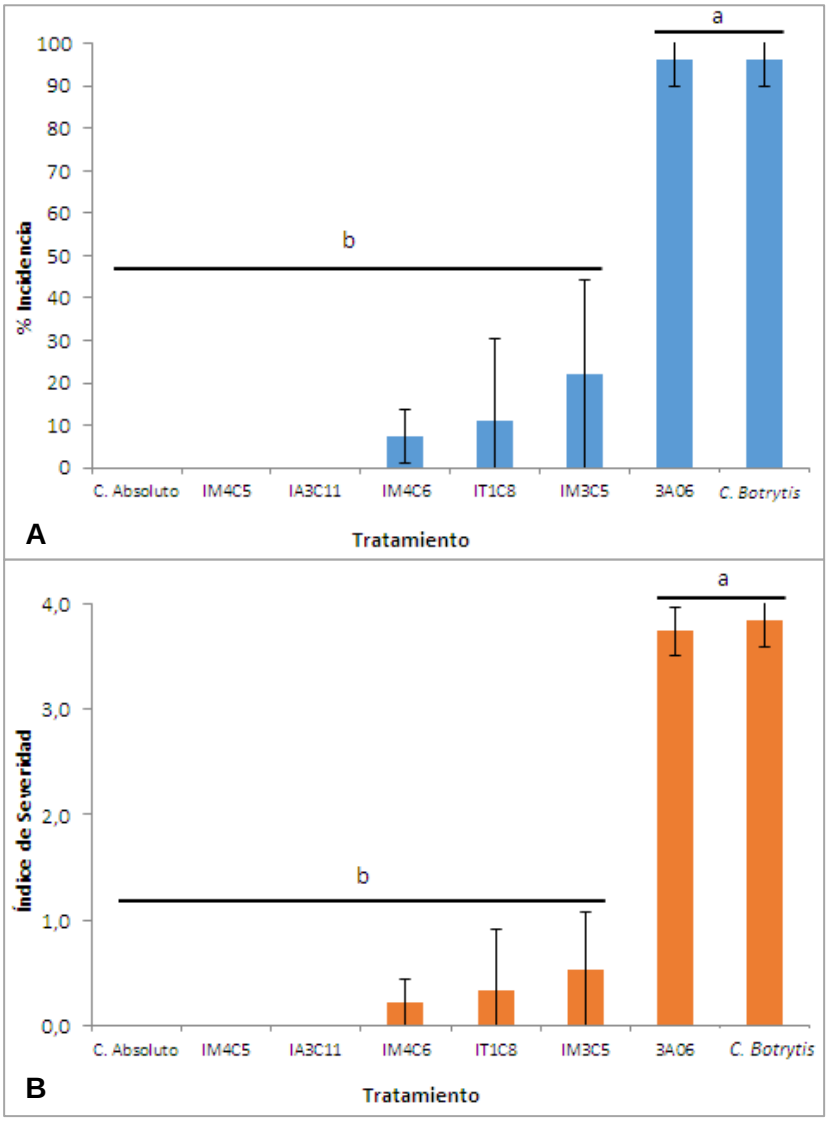


Figura 4-7. Evaluación de actividad de biocontrol BAFEs grupo 1 en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

En el segundo grupo se destacó la cepa IM2C6 con valores de porcentajes de incidencia e índices de severidad de cero aunque para la variable incidencia no presentó diferencias estadísticas con el resto de cepas evaluadas. En cuanto al índice de severidad, la cepa 4PO3 (con un índice de severidad de 0,7) presentó diferencias con respecto a la cepa IM2C6 (Figura 4-8).

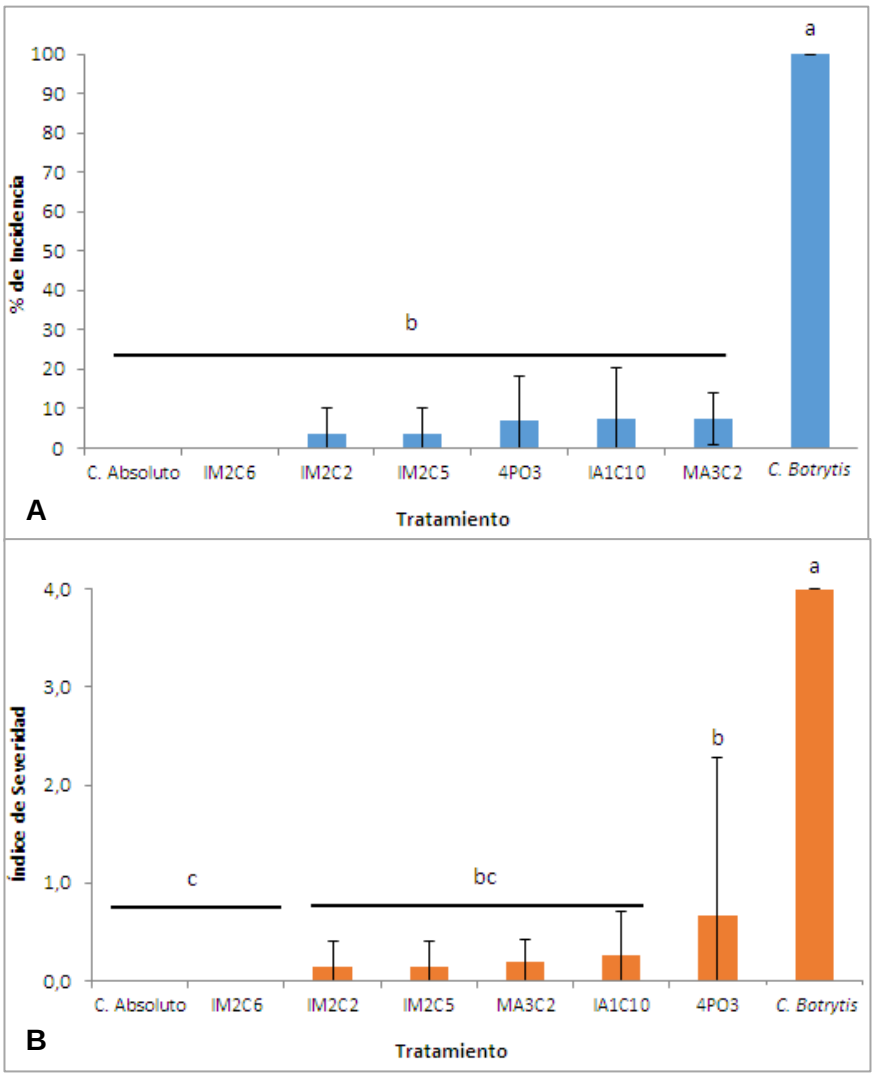


Figura 4-8. Evaluación de actividad de biocontrol BAFEs grupo 2 en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

4.1.2.4 Pruebas con dilución de sobrenadante al 50% y 5%

Los resultados obtenidos permitieron hacer la selección de tres cepas promisorias en términos de la disminución de los síntomas de la enfermedad. En este contexto se tomaron las cepas con mejores resultados en porcentaje de incidencia e índice de severidad de cada grupo: IM4C5 e IA3C11 del grupo 1 y la cepa IM2C6 del grupo 2. Con estos, se probó nuevamente la mezcla de BAFEs y sobrenadante diluido al 50%. Debido a que se logró identificar que los metabolitos secundarios presentaban un peso importante en la actividad biocontroladora de los cepas seleccionadas, se decidió diluir el

sobrenadante de las cepas seleccionadas 10 veces con ADE. De esta manera, se generó una suspensión final de las esporas de las BAFEs y su sobrenadante preparada al 5%.

En esta prueba, las tres cepas probadas con mezcla BAFEs – sobrenadante diluido al 50% no presentaron diferencias en cuanto a incidencia y severidad, ratificando los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, al observar los resultados de la mezcla BAFEs – sobrenadante diluida al 5%, la cepa IM4C5 presentó incrementos en los valores de incidencia e índice de severidad (67%, 1,6 respectivamente) mostrando diferencias con respecto a las cepas IA3C11 e IM2C6 (Figura 4-9).

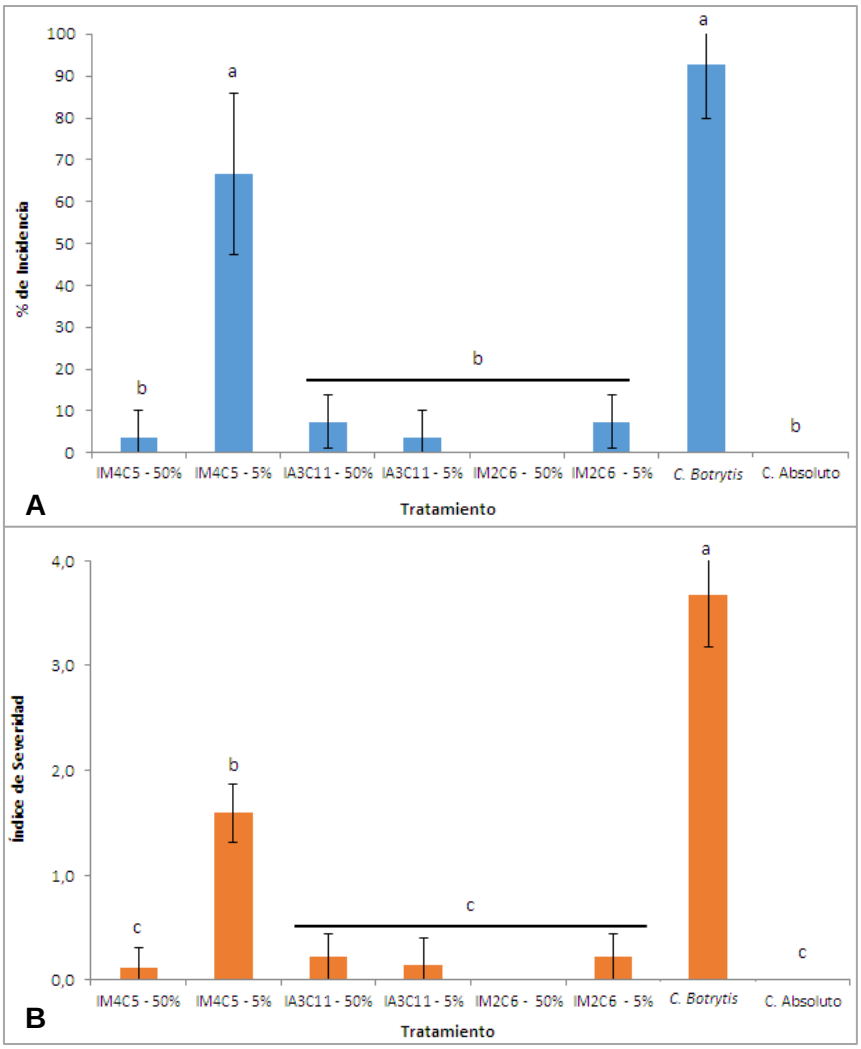


Figura 4-9. Evaluación de actividad de biocontrol de las cepas IM4C5, IA3C11 e IM2C6 en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Adicionalmente, análisis de la identificación molecular determinó que la cepa IA3C11 correspondía a *Bacillus cereus*. Teniendo en cuenta que para esta especie existen reportes en donde se le relaciona con problemas de toxicología por enfermedades en humanos (Stenfors *et al.*, 2008), se decidió incluir la cepa IT1C8 en su reemplazo para una siguiente repetición de esta evaluación. La elección de esta cepa obedeció al hecho haber obtenido buenos resultados en este estudio así como en estudios anteriores (Gantiva & Uribe, 2014).

4.1.2.5 Prueba con dilución de sobrenadante al 50%, 5% y 0,5%

Se realizó una prueba con las cepas preseleccionados IM4C5, IM2C6 e IT1C8 en donde se probaron nuevamente las mezclas de esporas - sobrenadante diluyendo el sobrenadante con ADE al 50% y 5%. Adicionalmente, se incluyó un tercer tratamiento en donde se realizó una dilución adicional para una concentración final del sobrenadante de 0,5%.

En esta prueba los resultados no evidenciaron diferencias estadísticas entre las cepas cuando se empleó sobrenadante diluido al 50%. Esto ratificó los resultados obtenidos en las pruebas anteriores. Con respecto al sobrenadante diluido al 5% se observaron diferencias entre cepas, presentando el valor más alto en cuanto a incidencia y severidad la cepa IM4C5 con valores de 78% de incidencia y 2,4 en índice de severidad respectivamente.

Para el tratamiento de sobrenadante diluido al 0,5% no se observaron diferencias entre cepas en cuanto al porcentaje de incidencia, presentándose en todas valores del 100%. No obstante, la cepa IT1C8 se destacó por presentar mejor resultado para la variable índice de severidad (1,98) presentando diferencias estadísticas con respecto a las otras dos cepas (Figura 9).

Vale la pena resaltar los resultados obtenidos en la dilución de sobrenadante al 0,5%, en donde se presentan los porcentajes de incidencia más altos (100% para las tres cepas) muy superiores a los porcentajes obtenidos con las diluciones del sobrenadante al 50% y 5%. Con esta prueba preliminar se demostró que la actividad de biocontrol de la mezcla BAFEs – sobrenadante se vio afectada por la dilución (Figura 4-10).

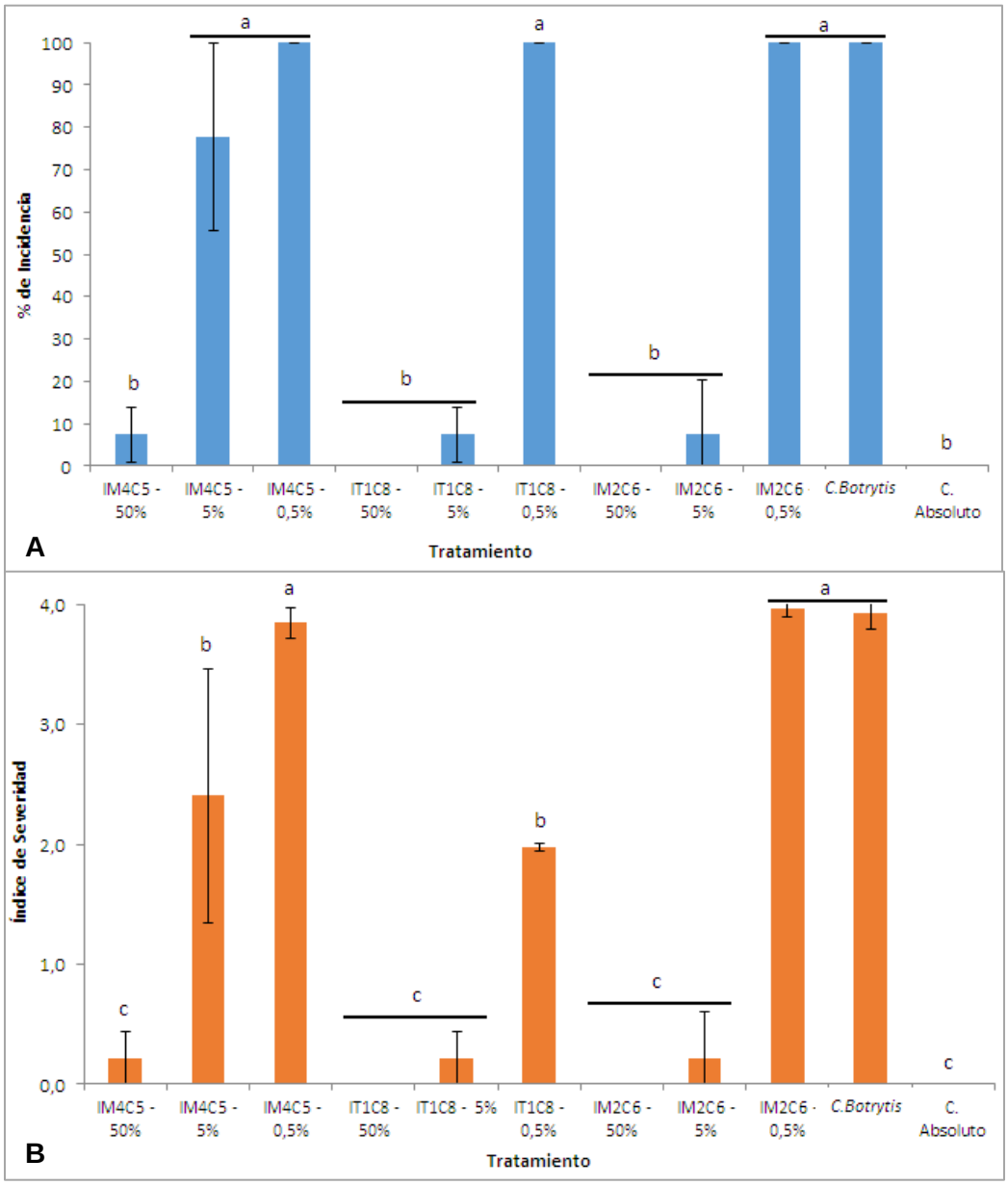


Figura 4-10. Evaluación de actividad de biocontrol de las cepas de IM4C5, IT1C8 e IM2C6 en prueba en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Después de varias pruebas con dilución de los sobrenadantes (50%, 5% y 0,5%) se seleccionaron finalmente tres cepas IM2C2, IT1C8 e IM2C6, teniendo en cuenta los valores de porcentaje de incidencia e índice de severidad a lo largo de todas las pruebas (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Resultados de porcentaje de incidencia e índice de severidad en pruebas de dilución de sobrenadantes para selección de cepas. **IM4C5**: En columnas de dilución 50 % valores corresponden a dato promedio de 3 experimentos. En columnas de dilución 5% valores corresponden a dato promedio de 2 experimentos. **IM2C2, IA3C11 e IT1C8**: En columnas de dilución 50% valores corresponden a dato promedio de 2 experimentos. **IM2C6**: En columnas de dilución 50 % y dilución 5% valores corresponden a dato promedio de 3 experimentos. **Control enfermedad**: Valores promedio de 4 experimentos en dilución 50% y 3 experimentos en dilución 5%. **ND**: No determinado.

Cepas BAFEs	**Dilución del Sobrenadante**					
	50%		**5%**		**0,5%**	
	% Incidencia	**Índice Severidad**	**% Incidencia**	**Índice Severidad**	**% Incidencia**	**Índice Severidad**
IM4C5	4	0,1	72,5	2	100	3,85
IM2C2	2	0,05	4	0,1	100	4
IA3C11	3,5	0,1	4	0,1	ND	ND
IT1C8	5,5	0,2	7	0,2	ND	ND
IM2C6	0	0	6	0,2	100	4
Control enfermedad	96,3	3,8	96,5	3,8	100	3,9

4.1.2.6 BAFEs preseleccionadas con dilución de sobrenadante al 50%, 5% y 0,5% usando réplica biológica (Esporulaciones frescas)

Las tres cepas preseleccionadas (IM2C2, IT1C8 e IM2C6) fueron evaluadas probando diluciones de sobrenadante al 50%, 5% y 0,5% con suspensiones de esporas y sobrenadantes recién procesados. Para tal fin, las tres cepas fueron esporuladas nuevamente. Lo anterior con el fin de corroborar los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, en donde fueron utilizaron sobrenadantes y esporas que habían estado bajo condiciones de almacenamiento (60 días).

En esta prueba no se evidenciaron diferencias entre las cepas cuando se empleó sobrenadante diluido al 50% y al 5%. Para el tratamiento de sobrenadante diluido al 0,5% no se observaron diferencias entre cepas en cuanto al porcentaje de incidencia ni severidad presentándose en todas valores del 100% y 4,0 respectivamente. Vale la pena resaltar que en esta segunda prueba se ratificó que la actividad de biocontrol de la

mezcla espora–sobrenadante se vió nuevamente afectada por efectos de la dilución (Figura 4-11).

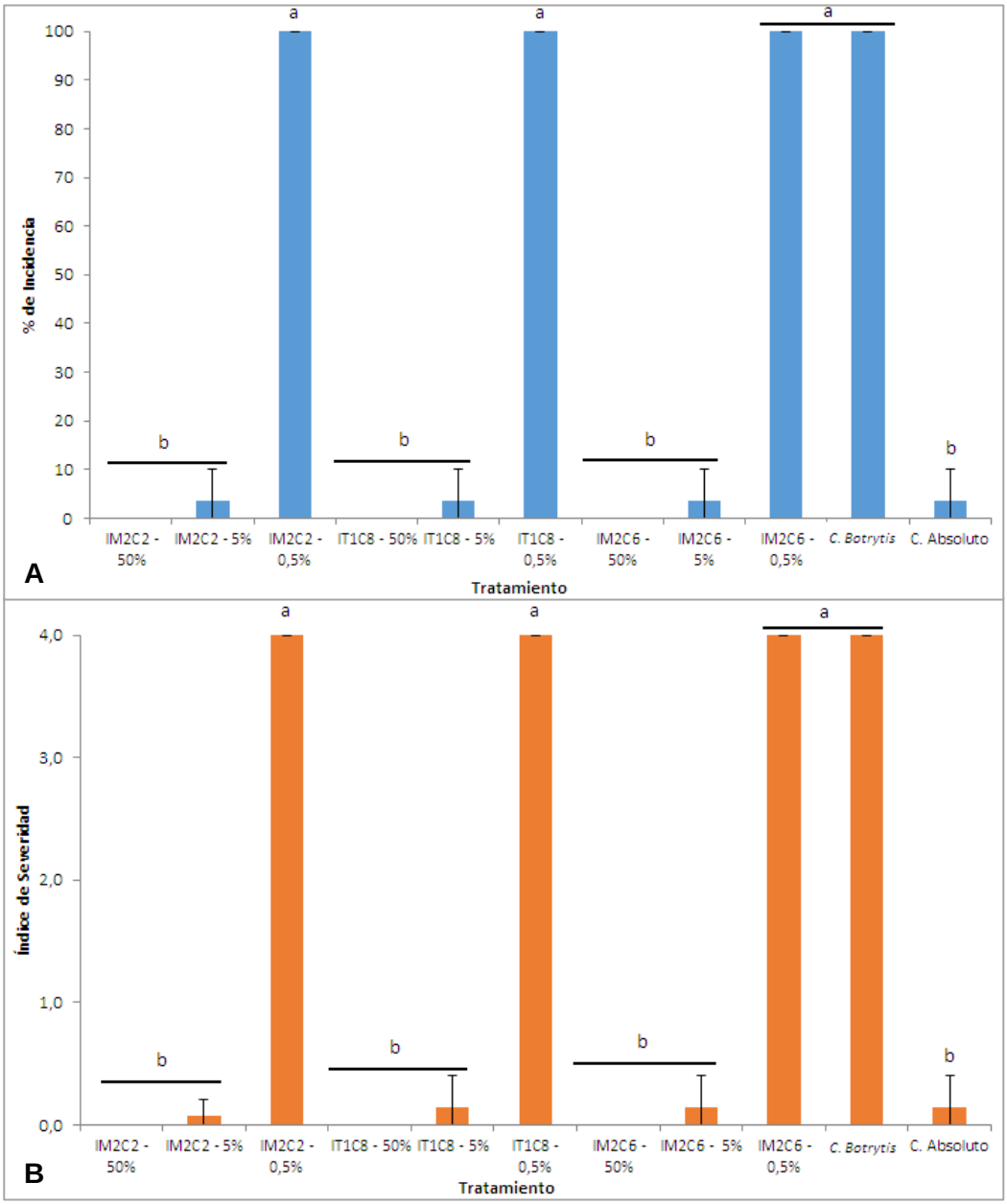


Figura 4-11. Evaluación de actividad de biocontrol de las cepas IM2C2, IT1C8 e IM2C6 en pétalo de rosa variedad Vendela. A. Incidencia de enfermedad B. Índice de severidad. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Estas disminuciones en actividad biocontroladora a medida que se realizaban diluciones concuerdan con los resultados obtenidos por Kim *et al*., (2007) quienes reportaron disminución en porcentaje de control de *Botrytis* en plantas de tomate al diluir entre 25 y

200 veces una formulación líquida teniendo a *Bacillus licheniformes* como ingrediente activo. En este trabajo, al diluir la mezcla espora – sobrenadante 100 veces, se observó un incremento significativo tanto en la incidencia como en la severidad de la enfermedad, comportamiento generalizado en las tres cepas (IM2C2, IT1C8 e IM2C6).

En total se realizaron 4 pruebas de biocontrol en pétalo que permitieron preseleccionar las cepas IM2C2, IT1C8 e IM2C6 como candidatos potenciales para ingrediente activo del prototipo de formulación.

4.1.3 Identificación molecular

4.1.3.1 Identificación molecular del aislamiento de *Botrytis* seleccionado

Los 10 aislamientos de *Botrytis* sp empleados en este estudio fueron evaluados contra las 12 cepas de BAFEs en pruebas *in vitro*. De acuerdo a los resultados, el menor porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se presentó en el correspondiente a la finca Ciprés por lo que fue seleccionado para las pruebas posteriores de este estudio. Por esta razón se decidió hacer la caracterización molecular de este aislamiento.

Mediante la amplificación y posterior secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS4 del rDNA, el análisis de la secuencia obtenida mediante el algoritmo de alineamientos locales BLAST de la base de datos del NCBI (“Basic Local Alignment Search Tool,” 2018) mostró una identidad del 100% (con un porcentaje de cobertura de 100%) con *Botrytis cinerea.*

Esto ratificó la caracterización macro y microscópica realizada al aislamiento seleccionado mediante el uso de claves micológicas (Barnett & Hunter, 1998) y la confirmación de estas características con lo reportado en la literatura confirmando que la identidad del aislamiento seleccionado correspondía a *Botrytis cinerea* (Figura 4-12).

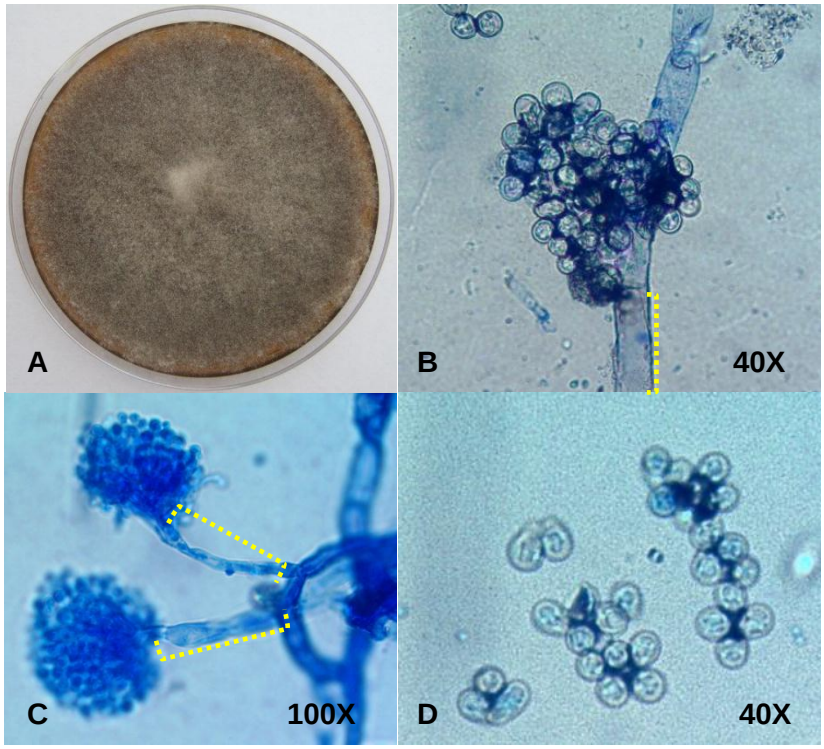


Figura 4-12. Caracterización macro y microscópica de *Botrytis cinerea*. A. *Botrytis cinerea* esporulado en medio YBG durante 20 días B y C. Conidioforo (corchete amarillo punteado) y conidias en forma de racimo D. Conidias. Fuente: Autora 2018.

4.1.3.2 Identificación molecular de cepas de BAFEs preseleccionadas

Con el fin de identificar molecularmente las tres cepas preseleccionadas, se realizó extracción de ADN y posterior amplificación por PCR del gen 16S rDNA y el gen que codifica para la subunidad A de la girasa (*gyrA*). Una vez obtenidas las secuencias, se utilizó el algoritmo de alineamientos locales BLAST como se describió anteriormente, con el fin de seleccionar las secuencias homologas de mayor identidad.

Con respecto a los resultados obtenidos con 16S, se confirmó que las tres cepas preseleccionadas hacen parte del género *Bacillus* obteniendo alta homología con especies tales como: *B.subtilis, B.siamensis, B.pumilus* y *B. amyloliquefaciens*. Con respecto a los resultados obtenidos con *gyrA*, todas las cepas fueron identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus velezensis.* Los porcentajes de identidad se muestran en la tabla 4-2.

Tabla 4-2. Resultados de alineamientos locales BLAST en la base de datos del NCBI**.** Se indican los porcentajes de identidad más altos para cada cepa.

Cepa BAFEs	Región o gen amplificado	Cobertura	Valor E	Identidad	Identificación
IM2C2	16s rDNA	100%	0,0	100%	*Bacillus siamensis*
		100%	0,0	100%	*Bacillus pumilus*
	gyrA	100%	0,0	97%	*Bacillus amyloliquefaciens*
		98%	0,0	97%	*Bacillus velezensis*
IM2C6	16s rDNA	100%	0,0	99.84%	*Bacillus siamensis*
		100%	0,0	99.84%	*Bacillus subtilis*
	gyrA	99%	0,0	98%	*Bacillus amyloliquefaciens*
		99%	0,0	98%	*Bacillus velezensis*
IT1C8	16s rDNA	99%	0,0	100%	*Bacillus siamensis*
		99%	0,0	100%	*Bacillus pumilus*
	gyrA	99%	0,0	99%	*Bacillus amyloliquefaciens*
		98%	0,0	99%	*Bacillus velezensis*

El análisis filogenético obtenido a partir del gen 16s rDNA ubicó a las tres cepas preseleccionadas cercanamente relacionadas con *Bacillus subtilis, Bacillus velezensis y Bacillus amyloliquefaciens*. Otros emparejamientos resultaron con *Bacillus siamensis*, y *Bacillus pumilus* y el clado quedo diferenciado de otras especies como *B.thuringiensis*, *B.cereus* o *B. anthracis* (Figura 4-13 A)

La identificación molecular con base en 16S no permitió definir con certeza la especie para las cepas de BAFEs preseleccionadas, toda vez que en la base de datos del NCBI se presentaron varios emparejamientos con el 100% de similitud para las secuencias obtenidas con 16S.

Por otro lado, el árbol de distancia genética obtenido con *gyrA* ubicó a las tres cepas cercanas a *Bacillus velezensis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Figura 4-13 B).

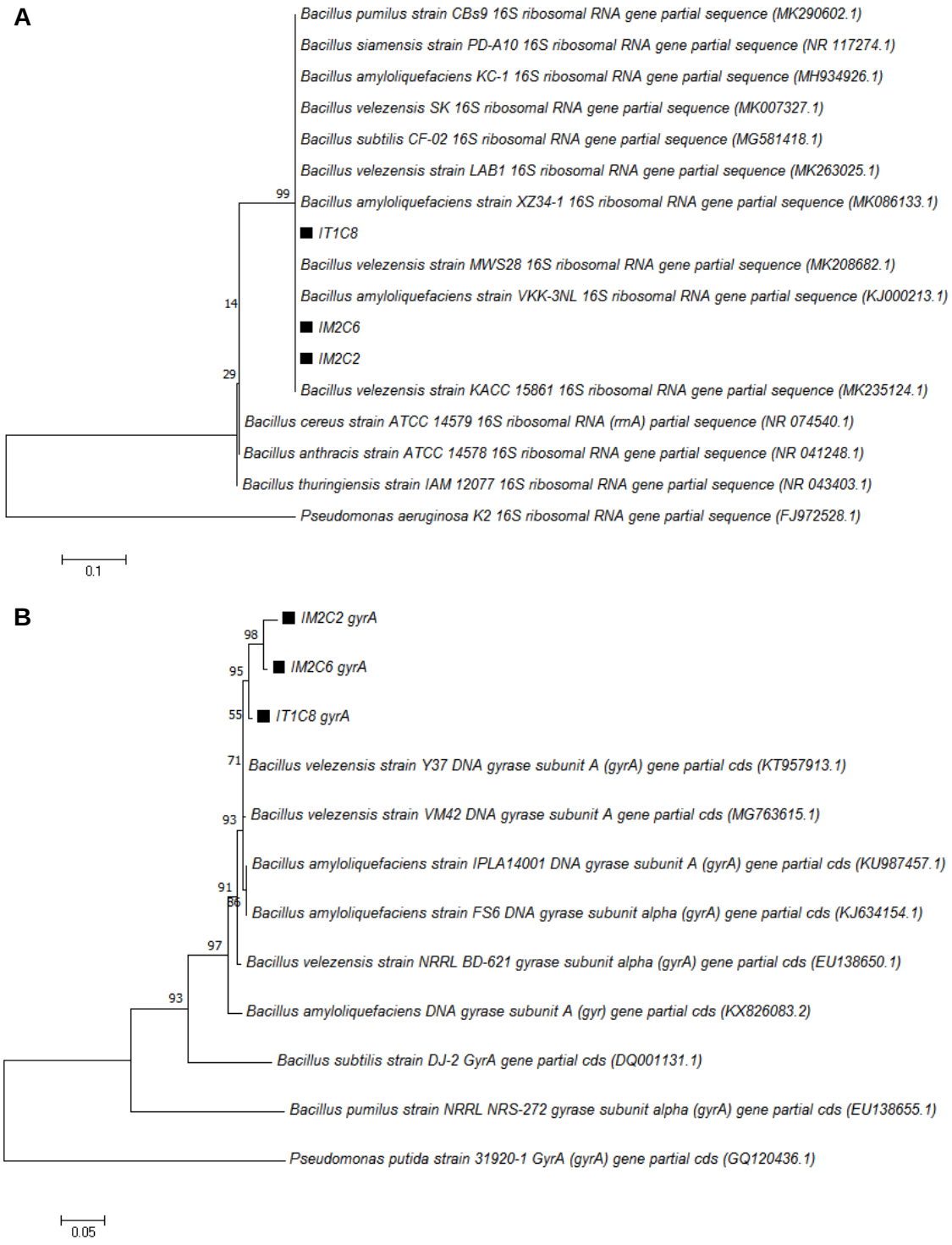


Figura 4-13 Árboles de distancia genética elaborados a partir del análisis Neighboor joining basado en (A) las secuencias de la subunidad 16S y (B) la subunidad A (*gyrA*). ■ Señala a las cepas secuenciadas en este estudio. Las cepas *Pseudomonas aeruginosa K2 y Pseudomonas putida* 31920-1 fueron usadas como grupo externo para el árbol 16S y *gyrA* respectivamente. En paréntesis aparecen los números de acceso del NCBI Gen Bank.

Referente a la identificación taxonómica, estudios recientes mencionan que *B.amyloliquefaciens* subs.*plantarum*, ha sido reconocida recientemente como *Bacillus velezensis* teniendo en cuenta su análisis filogenómico (Dunlap *et al*., 2016).

Sin embargo, un estudio reciente de Fan *et al*., (2017) en donde analizaron dendogramas basados en secuencias de nucleótidos completas del gen *rpo*B, así como las secuencias del core genome de cepas tipo de *B.amyloliquefaciens*, las han agrupado en un clado con tres ramas estrechamente relacionadas: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis* y un grupo con-especifico que contiene las cepas tipo de *Bacillus velezensis*, *Bacillus methylotrophicus* y *Bacillus amyloliquefaciens* subsp *plantarum.*

Teniendo en cuenta los resultados, se propuso que el clado *B. amyloliquefaciens* fuera considerado una unidad taxonómica por encima del nivel de especie, designada como "Grupo operacional *B. amyloliquefaciens*" que comprende el *B.amyloliquefaciens* presente en suelos y los asociados a plantas *B.siamensis* y *B.velezensis* cuyos miembros están estrechamente relacionados (Fan *et al*., 2017)

4.1.4 Cepa de BAFEs seleccionada para prototipo de formulación

La cepa IM2C6 (identificada como *B.velezensis* de acuerdo a la secuencia obtenida con *gyrA*) mostró actividad de biocontrol con porcentajes de incidencia de 0% e índices de severidad de 0 al probarse el sobrenadante diluido al 50% a lo largo de 4 repeticiones en el tiempo mostrando resultados altamente consistentes (Figuras 4-8, 4-9, 4-10 y 4-11). Por otro lado, los resultados de biocontrol de esta cepa cuando se probó el sobrenadante diluido al 5% fueron igual de contundentes, con porcentajes de incidencia entre el 4 y 7% e índices de severidad de 0,1 y 0,2 (Figuras 4-9, 4-10, 4-11).

Teniendo en cuenta las pruebas *in vivo* realizadas, finalmente se seleccionó la cepa IM2C6 como ingrediente activo para la elaboración del prototipo de formulación.

4.2 DISEÑO Y EVALUACION DE LOS PROTOTIPOS DE FORMULACION LIQUIDA

4.2.1 Selección de medio para producción de ingrediente activo

Con el objeto de seleccionar el mejor medio de cultivo en términos de producción de biomasa y el tiempo empleado para lograr la esporulación, se evaluaron tres medios de cultivo sugeridos en la literatura para el crecimiento de *Bacillus* sp: medio de esporulación (Abarca *et al.*, 1992), medio MOLP (Ahimou *et al.*, 2000) y medio TSB. Los resultados de tiempo de obtención y concentración celular final obtenida con cada uno de los medios utilizados para producción de ingrediente activo se relacionan en la tabla 4-3.

Tabla 4-3. Medios evaluados para producción de ingrediente activo - cepa IM2C6 (*Bacillus velezensis*) - para elaboración de prototipo de formulación. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Tiempo para obtener esporulación (>95%)	Medio	UFC mL^{-1}
5 días	Esporulación	$1,4x10^9$ a
17 días	MOLP	$1,5x10^9$ a
17 días	TSB	$1,7x10^9$ a

De acuerdo a los resultados, no se evidenciaron diferencias estadísticas en términos de producción de UFC mL^{-1} con respecto a la concentración celular de esporas obtenida entre los tres medios evaluados. Sin embargo, llama la atención la diferencia en el número de días necesario para obtener una esporulación superior al 95% con cada uno de los medios, siendo menor el del medio de esporulación.

Teniendo en cuenta lo anterior, el medio seleccionado para la producción de ingrediente activo a partir de la cepa IM2C6 dada la rapidez en la obtención de esporas fue el medio de esporulación.

Algunos de los componentes presentes en el medio de esporulación empleado incluyen varias sales inorgánicas ($CaCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$ y $ZnSO_4$) cuyos iones metálicos juegan un papel crucial en la activación de sistemas enzimáticos necesarios para la esporulación (Kolodziej & Slepecky, 1964).

El Manganeso y el Hierro por su parte, son indispensables en este proceso dada su participación en la síntesis de metabolitos secundarios de *Bacillus* tales como antibióticos y péptidos (Granger *et al*., 2011 en Ren *et al*., 2018) en tanto que el Calcio actúa como componente importante de las esporas mediante su quelación con el ácido dipicolínico (Ca-ADP) y ayuda a promover la resistencia al calor (Levinston *et al*., 1961 en Ren *et al*., 2018)

Un estudio realizado por Posada-Uribe *et al*., (2015) evidenció mediante diseños de Placket Burman que componentes como el $MgSO_4$ en el medio de esporulación empleado, tenían un efecto positivo en el incremento de la concentración de esporas, alcanzando valores de $1.58x10^9$ UFC mL^{-1} coincidiendo con los valores finales de concentración celular obtenidos en este trabajo ($1.4x10^9$ UFC mL^{-1}).

De otra parte, en un estudio realizado por Toral *et al*., (2018) reportaron el uso del medio MOLP con el fin de obtener una alta producción de lipopeptidos a partir de *Bacillus methylotrophicus* y describir su actividad antifúngica contra *B. cinerea.*

4.2.2 Curva de crecimiento en medio seleccionado para producción de ingrediente activo (BAFEs)

Se realizó una curva de crecimiento con la cepa IM2C6 en el medio seleccionado para la producción del ingrediente activo (Medio de esporulación). Se realizaron mediciones cada hora hasta la hora 12 y desde la hora 24 hasta la hora 96, cada doce horas. Para la lectura de absorbancia, se realizó dilución de la muestra 1:10 en medio de esporulación estéril a partir de la hora 9.

La elaboración de la curva permitió determinar una fase de latencia corta (0h a 3 horas) (T1) posteriormente desde la hora 3 hasta la hora 48 se presentó la fase exponencial (T2).

Para la hora 36 se evidenció incremento en la concentración celular hasta la hora 60 y desde este tiempo hasta la hora 96 no se establecieron cambios ni en la densidad óptica registrada ni en la concentración celular (Fase estacionaria). Para la hora 96 se calculó una concentración final mediante la técnica de microgota en la que se obtuvo un recuento de $2.2x10^9$ UFC mL^{-1} (Figura 4-14, 4-15)

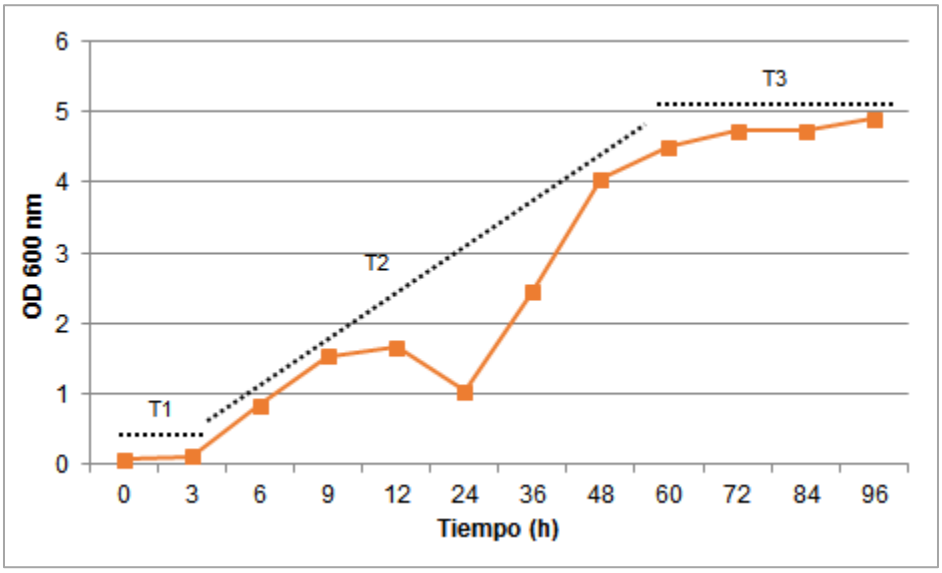


Figura 4-14. Curva de crecimiento de la cepa IM2C6 en medio de esporulación. T1: Fase de latencia. T2: Fase exponencial. T3: Fase estacionaria.

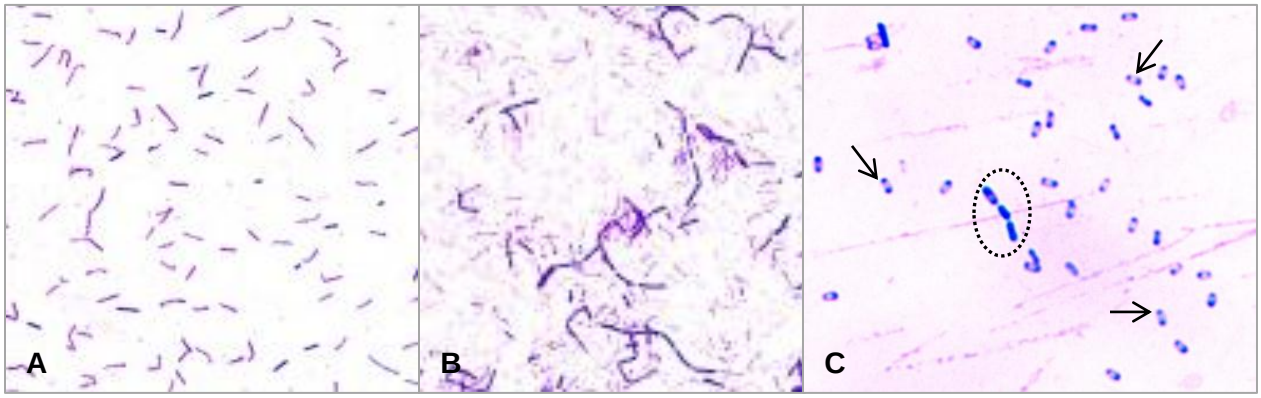


Figura 4-15. Observación al microscopio de diferentes tiempos de la curva: Fase exponencial (T2). A. Bacilos a las 6 horas (100X) B. Bacilos a las 12 horas (100X). Fase estacionaria (T3) C. Células vegetativas (óvalo punteado) y endosporas (fechas) a las 96 horas (100X). Fuente: Autora 2018.

Por otro lado se determinó la concentración celular de esporas a partir de la hora 24, (mediante calentamiento de la muestra a 80°C por 10 minutos) tiempo en el cual se empiezan a obtener conteos de este tipo de células. En la figura 4-16 se observa que hay diferencias estadísticas entre los conteos de células totales y esporas en la hora 24, igualándose en las horas posteriores hasta llegar a un valor muy similar en la hora 96, en donde se logró establecer que todo el conteo que se obtuvo para ese tiempo correspondía en su totalidad a esporas.

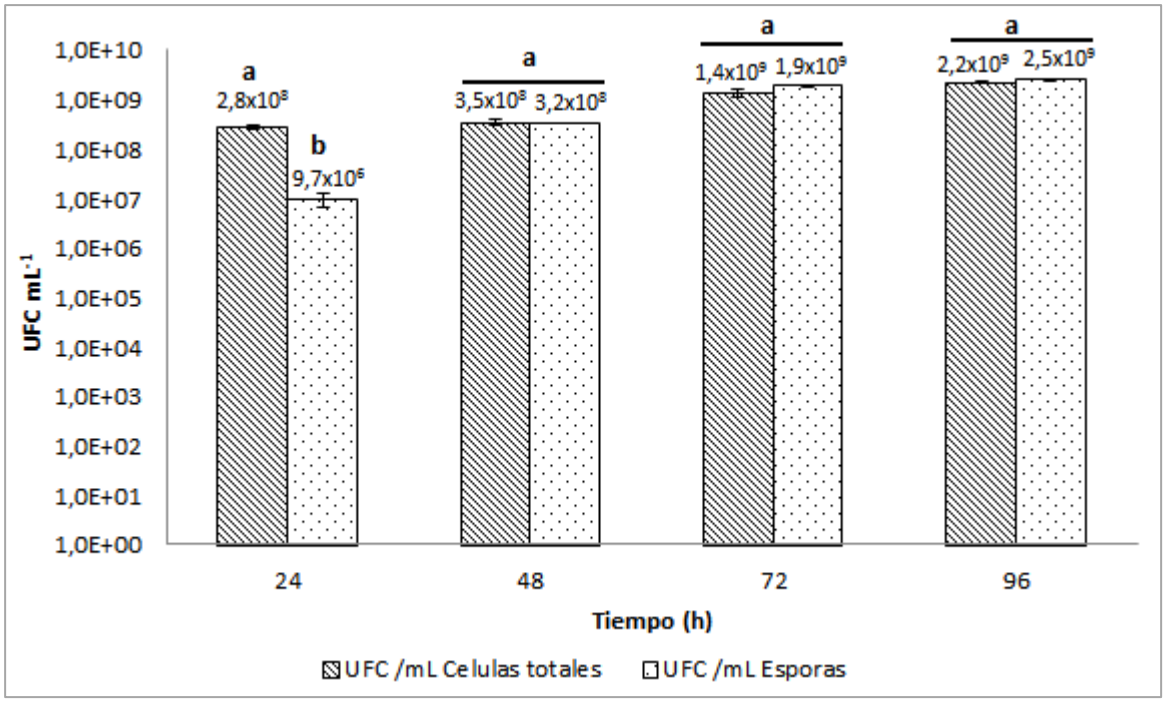


Figura 4-16. Conteo células totales (células vegetativas más esporas) vs Esporas a las 24, 48, 72 y 96 horas**.** Análisis estadístico se realizó entre conteos realizados en el mismo tiempo. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).

De acuerdo a los datos obtenidos, se podría inferir que para propósitos de la formulación y en vista de las concentraciones celulares registradas para cada tiempo, hacia las 48 horas era factible usar el medio e iniciar proceso de formulación. Sin embargo, adicional a la característica de obtener esporas, el objetivo era tener la concentración celular más alta posible, razón por la cual el ingrediente activo se dejó en agitación durante más días (4-5 días).

4.2.3 Selección de componentes mediante evaluación de viabilidad celular

Para la selección de los compuestos que harían parte de la formulación líquida, se realizó un tamizaje evaluando distintos componentes a diferentes concentraciones. Los componentes seleccionados así como el papel que cumplirían dentro de la formulación se muestran en la tabla 4-4:

Tabla 4-4. Componentes y sus concentraciones evaluados para diseño del prototipo de formulación.

Aditivo	Producto	Función
Polímero	Pol-1 HPMC (1%)	Facilitar la dispersión del principio activo y su adherencia a la superficie del tejido vegetal
	Pol-2 PVP (10%)	
	Pol-3 PEG (1%)	
	Pol-4 Pullulan (0,5%)	
Agente de suspensión	S-1 Goma xanthana (0,25 – 0,125 – 0,05%)	Facilitar la dispersión y controlar la velocidad de sedimentación
Preservante	Pb 1 Propilparabeno (0,05%) Pb 2 Metilparabeno (0,15%) Mezcla Pb 1 + Pb 2 SK Sorbato de potasio (0,5 – 0,25%)	Prevenir la contaminación del producto de las condiciones ambientales
Tensioactivo	T -20 Tween 20 (0,5%)	Contribuir con la estabilidad del producto y facilitar su aplicación

4.2.3.1 Pruebas con polímeros: Pol-1, Pol-2, Pol-3 y Pol-4

Varios tipos de polímeros tales como alginato de sodio, PVP (Polivinil pirrolodona), PVA (Polivinil Alcohol) o PEG (Polietilenglicol) han sido usados para formulaciones líquidas (Rivera *et al*.,2014) debido a su habilidad para limitar la transferencia de calor, sus buenas propiedades reológicas y su alta actividad de agua (Amalraj *et al.*, 2013)

En este trabajo se realizaron pruebas de mezcla de polímeros con células del ingrediente activo (cepa IM2C6) con el fin de confirmar que los polímeros no produjeran efectos deletéreos sobre la viabilidad celular despues de 5 días en agitación.

Las evaluaciones fueron realizadas probando Pol-1, Pol-2 y control (que consistió de mezcla de esporas y sobrenadante suspendida en Agua Destilada Estéril - ADE) en un primer grupo y Pol-3, Pol-4 y control en el segundo grupo teniendo un conteo inicial de la cepa IM2C6 (para ambos grupos) en $5.0x10^8$ UFC mL^{-1}.

Al establecer nuevamente la concentración celular después de cinco días en agitación (150 rpm, 27°C), los resultados no mostraron disminución en la viabilidad celular, puesto que las concentraciones finales estuvieron en el rango de $4.0x10^8$ a $5.0x10^8$ UFC mL^{-1}. De acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no se evidenciaron

diferencias estadísticas entre tratamientos con respecto al control en ninguno de los dos grupos (Tabla 4-5**).**

Tabla 4-5. Evaluación de viabilidad celular de cepa IM2C6 después de 5 días en agitación con 4 polímeros. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la Prueba de Tukey ($p<0.05$)

Concentración celular UFC mL^{-1}					
Grupo 1			**Grupo 2**		
Pol-1 (1%)	Pol-2 (10%)	Control ADE	Pol-3 (1%)	Pol-4 (0,5%)	Control ADE
$4,4x10^8$ a	$4,1x10^8$ a	$4,3x10^8$ a	$5,6x10^8$ a	$4,5x10^8$ a	$5,2x10^8$ a

Con base en esta primera evaluación con polímeros y dado que ninguno afectó la viabilidad celular durante el tiempo evaluado, era posible seleccionar cualquiera de estos para el prototipo. Sin embargo, se optó por seleccionar el Pol-2 y Pol-3 basados en criterios como su alta miscibilidad, fácil consecución en el mercado además de contar con precios competitivos que harían favorable el escenario de un proceso de escalamiento a mediano o largo plazo.

En este sentido, merece mencionar que el PVP es un polímero sintético del grupo de los vinilos con un anillo pirrol, de alto peso molecular, altamente soluble en agua y con propiedades adherentes (Singleton *et al*., 2002). Su uso en bioformulados líquidos es deseable debido a su habilidad de limitar la transferencia de calor, sus buenas propiedades reológicas y la alta actividad de agua (Amalraj et al., 2013)

Por otra parte, el PEG es un compuesto de bajo peso molecular, hidrosoluble y con propiedades adherentes cuyo uso se ha documentado en formulaciones líquidas de *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae* para ser utilizadas como inoculantes microbianos dirigidos a la promoción de crecimiento vegetal en plantas de trigo destacándose por los buenos efectos protectantes conferidos a las células (Nita *et al*., 2012)

El uso de PVP (PoliVinil Pirrolidona) y PEG (Polietilenglicol) (llamado en este estudio Pol-2 y Pol-3 respectivamente) ha sido documentado en otros trabajos de formulación con bacterias, como el de Ramyabharathi & Rajendran, (2016) en donde evaluaron el efecto de PVP en la formulación líquida de una especie endófita de *Bacillus subtilis* para el

control de marchitez causada por *Fusarium* en tomate sin observar efectos deletéreos sobre la concentración celular del microorganismo hasta un año después de producida la formulación.

Otro trabajo que referencia el uso de PVP es el de Manikandan *et al*., (2010) quienes utilizaron este compuesto para probar la viabilidad de *Pseudomonas fluorescens* en formulaciones liquidas preparadas en dos medios diferentes (NB y KB) con el fin de probar su eficacia en el control de marchitez causada por *Fusarium* en tomate, obteniendo datos de viabilidad hasta 120 días después de formulación.

Así mismo, Srinivasan & Mathivanan, (2009) emplearon PVP y PEG en el proceso de formulación liquida de consorcios microbianos compuestos por cepas de *Bacillus licheniformes*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptomyces fradie* para el control de la enfermedad causada por el virus de la necrosis del girasol (SNVD por sus siglas en inglés)

4.2.3.2 Prueba de adherencia con polímeros

Los polímeros se conciben como aquellos materiales que sirven de soporte al ingrediente activo (células) asegurando su establecimiento en la planta, aumentando de este modo la probabilidad de controlar al agente fitopatógeno (Mischra & Arora, 2016). Por tal razón se realizaron pruebas preliminares de adherencia en tejido de hoja de rosa con los pólimeros seleccionados de acuerdo a la metodología descrita en materiales y métodos. Con los polímeros seleccionados (PVP y PEG), no se presentaron diferencias estadísticas en cuanto a adherencia de esporas al tejido vegetal cuantificada como UFC mL^{-1} de acuerdo a los recuentos en placa mediante técnica de microgota (Tabla 4-6).

Tabla 4-6. Prueba de adherencia de polímeros en tejido de hoja de rosa. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la Prueba de Tukey ($p<0.05$)

Prueba de adherencia de esporas en tejido de hoja de rosa			
Pol-2 PVP		**Pol-3 PEG**	
Concentración	**UFC mL^{-1}**	**Concentración**	**UFC mL^{-1}**
5%	$1,2x10^6$ a	0.5%	$9,3x10^4$ a
0.05%	$1,2x10^6$ a	0.005%	$8,9x10^4$ a
Control ADE	$1,1x10^6$ a	Control ADE	$8,6x10^4$ a

4.2.3.3 Pruebas con preservantes

Por el hecho de tratarse de un formulado líquido que podría ser más susceptible a contaminación por fuentes microbianas externas durante el proceso, se consideró pertinente incluir dentro de los prototipos un preservante.

En este contexto con el objeto de verificar que los agentes preservantes no interferían con la viabilidad del principio activo del prototipo de formulación, se decidió evaluar la viabilidad celular de la cepa IM2C6 luego de 48 horas de exposición a estos compuestos. Durante las pruebas se utilizaron dos tipos de preservantes: compuestos de la familia de los parabenos y un compuesto de tipo orgánico como la sal de ácido sórbico.

Con respecto a los parabenos, se tuvo como punto de partida un conteo inicial de $1.0x10^7$ UFC mL^{-1} de la cepa IM2C6 y al establecer la concentración celular después de 48 horas no se evidenció disminución de la viabilidad celular en los tratamientos con Pb 1 ni con Pb 2.

Con respecto al tratamiento de mezcla (Pb 1 + Pb 2) se observó disminución en la viabilidad celular, presentando diferencias estadísticas en comparación con los otros dos tratamientos (Tabla 4-7).

Tabla 4-7. Viabilidad celular de cepa IM2C6 después de 48 horas en agitación con preservantes Pb 1, Pb 2 y Mezcla (Pb 1 + Pb 2). Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Tratamiento	**UFC mL^{-1}**
Pb 1 0,05%	$1,1x10^7$ a
Pb 2 0,15%	$1,1x10^7$ a
Mezcla (Pb 1 0,05% + Pb 2 0,15%)	$4,2x10^5$ b
Control ME (1/10)	$1,1x10^7$ a

Teniendo en cuenta lo anterior, se determinó la factibilidad de usar Pb 1 o Pb 2 en el prototipo de formulación, pero no su mezcla debido a que las células no toleraron la combinación de los dos compuestos, evidenciado esto en la disminución de la viabilidad celular.

Con el fin de incluir dentro del prototipo compuestos de tipo orgánico, se decidió incluir como preservante la sal de ácido sórbico, que de acuerdo a los reportado en la literatura es usada en formulaciones líquidas para suprimir la germinación de esporas de hongos (Burges, 1998)

El conteo inicial la cepa IM2C6 para la prueba con este preservante fue de $1.0x10^7$ UFC mL^{-1}. Al establecer nuevamente la concentración celular después del periodo de evaluación (48h) no se establecieron diferencias estadísticas entre tratamientos (Tabla 4-8).

Tabla 4-8. Viabilidad celular de la cepa IM2C6 después de 48 horas en agitación con preservante SK evaluado a dos concentraciones**.** Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras en indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Tratamiento	**Concentración celular UFC mL^{-1}**
SK 0,5%	$7,3x10^6$ a
SK 0,05%	$4,9x10^6$ a
Control ME (1/10)	$6,5x10^6$ a

Para elaboración de bioformulados la literatura reporta algunas opciones tales como el ácido propiónico, el ácido sórbico y sus sales de sodio o potasio (sorbato de potasio, preservante utilizado en este trabajo), acido benzoico y sus sales de sodio, acido p-hidroxibenzoico y benzoato hidroxi-metil entre otros (Knowles, 1998)

Actualmente existen pocos trabajos publicados en donde se evalúe el uso de preservantes en bioformulados cuyo ingrediente activo sean *Bacillus*. Sin embargo estudios como el de Nita *et al*., (2012) reportan el uso de productos como el ácido ascórbico en la formulación líquida de *Acetobacter* y *Herbaspirillum* indicando que este puede potenciar el efecto protectante de las sustancias presentes en la formulación dada su propiedad antioxidante, previniendo el daño celular debido al estrés oxidativo.

Otros trabajos como el descrito en la patente WO2014/178032 A1 (2014) referencian la adición de sorbato de potasio o ácido propiónico como agentes antimicrobianos. Esto con el fin de prevenir la degradación por contaminación de un bioformulado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. El producto en mención está dirigido al tratamiento de ciertas enfermedades causadas por microorganismos tales como *Micosphaerella fijiensis* (causante de sigatoka negra en banano), *Colletotrichum* sp en tomate o *Botrytris cinerea* (causante de moho gris en crisantemos).

4.2.3.4 Prueba con agente de suspensión

Las pruebas fueron realizadas con un agente de suspensión evaluado a tres concentraciones y partiendo de una concentración inicial de la cepa IM2C6 de $1.1x10^9$ UFC mL^{-1}. Después de cinco días en agitación, no se evidenció disminución en la viabilidad celular de la cepa IM2C6 en comparación con el control (mezcla de esporas y sobrenadante con ADE) (Tabla 4-9):

Tabla 4-9. Viabilidad celular de cepa IM2C6 después de 5 días en agitación con Agente suspensor S-1 evaluado a tres concentraciones. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Tratamiento	Concentración celular UFC mL^{-1}
S-1 0,25%	$1,2x10^9$ a
S-1 0,125%	$1,6x10^9$ a
S-1 0,05%	$1,2x10^9$ a
Control ADE	$1,3x10^9$ a

De acuerdo a los resultados, el uso de un agente se suspensión era factible en cualquiera de las tres concentraciones evaluadas.

- **Prueba con excipientes para confirmar suspendibilidad del principio activo**

Tal como su nombre lo indica el uso de un agente de suspensión en los prototipos tenía como objetivo mantener en suspensión el ingrediente activo (esporas) en el líquido. Sin embargo, se evaluó la posibilidad de usar los polímeros seleccionados cumpliendo la función del agente de suspensión dentro del producto con el fin de obviar su adición en las mezclas finales. Esto con el fin de simplificar la composición de la formulación hecho que podría también incidir de manera positiva en los costos contemplados de fabricación en el producto final.

Por tal razón, se realizaron pruebas de sedimentación evaluando el efecto del agente de suspensión y/o polímeros en la suspensión celular de la cepa IM2C6 mediante el siguiente experimento:

En tubos de ensayo de vidrio que contaban con una longitud de columna de 12 cm, se dispusieron 17mL de mezcla de suspensión de esporas y sobrenadante del aislamiento IM2C6 en combinación con el agente de suspensión probado a dos concentraciones: 0,25% y 0,125%. Esta mezcla se agitó bien y se dejó en reposo por espacio de 48 h.

Cumplido este tiempo, se tomaron muestras mediante la introducción de un pipeta Pasteur de vidrio estéril (procurando no disturbar mucho la muestra) a dos profundidades: a la mitad de la columna de líquido y al fondo del tubo y se estableció la

concentración celular presente en cada una de las profundidades mediante prueba de dilución y recuento en placa, sembrando las diluciones 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6}. En la figura 4-17 se observa la apariencia de las mezclas después de 48 h.

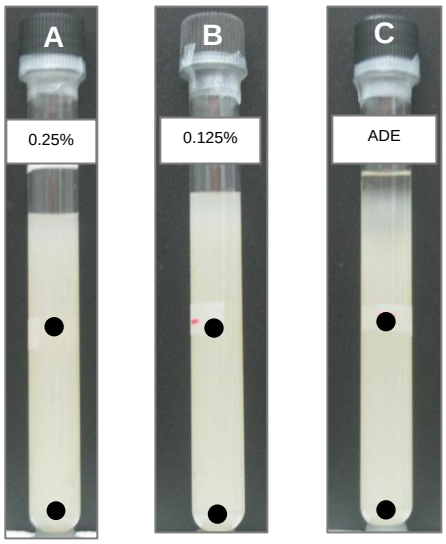


Figura 4-17. Pruebas de suspensión celular de cepa IM2C6 en mezcla con agente suspensor a dos concentraciones: A. 0.25% B.0.125% C. Control ADE. Los círculos negros en los tubos indican los sitios en donde se tomó muestra para conteo celular a las 48h.

Cuando se analizaron los conteos de concentración celular obtenido en cada punto de muestreo por cada tratamiento, se encontraron diferencias estadísticas del tratamiento control con ADE a las 48 h en el fondo siendo el de mayor valor ($4.9x10^9$ UFC mL^{-1}) comparado con los demás tratamientos (Tabla 4-10 A).

Con esta prueba quedó confirmada la función de suspensión de este excipiente en el bioformulado dadas las diferencias observadas con respecto al control.

Posteriormente se realizó otra prueba siguiendo la metodología anteriormente descrita. Se probaron los polímeros Pol-2 al 10% y Pol-3 al 1% con el fin de establecer si estos también presentaban acción de suspensión sobre las células (esporas) presentes en el ingrediente activo. Al igual que en la prueba realizada con el agente suspensor, se observaron diferencias estadísticas de los tratamientos con respecto al control con ADE en el conteo del fondo a las 48 horas (Tabla 4-10 B).

Tabla 4-10. Pruebas de suspendibilidad celular de cepa IM2C6. A. Agente se suspensión a dos concentraciones y cuantificación después de 48 h. B. Pol-2 y Pol-3 a dos concentraciones y cuantificación después de 48 h**.** Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Pruebas suspendibilidad				
A. Prueba con agente de suspensión				
Tratamiento	**Conteo UFC mL^{-1}**			
	48h mitad columna de suspensión		**48h fondo columna de suspensión**	
S- 1 0,25%	$5,6x10^8$	b	$5,1x10^8$	b
S- 1 0,125%	$4,7x10^8$	b	$7,6x10^8$	b
Control ADE	$6,3x10^8$	b	$4,9x10^9$	a
B. Prueba con Polímeros				
POL-2 10%	$4,3x10^8$	b	$4,9x10^8$	b
POL-3 1%	$5,9x10^8$	b	$5,0x10^8$	b
Control ADE	$5,4x10^8$	b	$1,2x10^9$	a

Ciertos compuestos como la goma xanthana son productos que permiten mantener las partículas de un producto formulado en suspensión, ayudando a evitar el agrupamiento de partículas y asegurando la resuspensión de las mismas después de tiempos prolongados de almacenamiento (Burges, 1998)

Dentro de los compuestos tipo suspensor se encuentran otros materiales hidrosolubles tales como: almidón, goma de acacia, glucosa, dextrina, gelatina, molasas, polivinilpirrolidona, goma guar, metilcelulosa, sodio carboximetilcelulosa, acetato de celulosa y gomas sintéticas (Burges, 1998).

De acuerdo a la tabla 4-10, los conteos obtenidos después de 48 horas en el fondo de la columna de suspensión con los polímeros Pol-2 y Pol-3 ($4,9x10^8$ y $5,0x10^8$ UFC mL^{-1} respectivamente) presentaron diferencias estadísticas con el control de ADE. Se evidenció de esta manera que los polímeros también ejercían acción de suspensión en las esporas presentes en el ingrediente activo y podrían desempeñar este rol dentro del prototipo de formulación. Por tal razón, se prescindió de la adición del agente suspensor contemplado en la fase inicial de este trabajo dejando que los polímeros seleccionados asumieran esa función.

4.2.3.5 Prueba con tensioactivo

Los tensioactivos son probablemente uno de los aditivos más empleados en formulación. Usualmente son considerados como esenciales para asegurar la distribución relativamente uniforme del producto sobre la superficie blanco (cutícula, hoja, pétalo), especialmente si su superficie es hidrofóbica. (Burges, 1998). En este contexto se realizaron pruebas con tensioactivo (T-20) evaluando una sola concentración de este compuesto (0,5%) y partiendo de una concentración inicial de la cepa IM2C6 de $1.1x10^9$ UFC mL^{-1}. Después de cinco días en agitación, no se evidenció disminución en la viabilidad celular en comparación con el control (mezcla de esporas y sobrenadante con ADE) y no se presentaron diferencias estadísticas (Tabla 4-11).

Tabla 4-11. Pruebas de viabilidad celular de la cepa IM2C6 en mezcla con Tensioactivo al 0.5%. Datos corresponden a la media de 3 réplicas. Prueba t. Valor P= 0.3589 (alfa = 0.05)

Tratamiento	**Concentración celular UFC mL^{-1}**
T-20 0,5%	$9,1x10^8$
Control ADE	$1,0x10^9$

4.3 PROCESO DE FORMULACIÓN

Basados en los resultados de viabilidad celular y atributos funcionales obtenidos con los diferentes excipientes de formulación, fueron seleccionados: 2 polímeros, un preservante y un tensioactivo como ingredientes de los prototipos de formulación, resultando 5 prototipos de formulación con la composición y concentración que se especifica en la tabla 4-12.

Tabla 4-12. Prototipos de formulación y su composición**.** +: Denota la presencia del componente en el prototipo

PROTOTIPO	COMPONENTE		
	POLIMERO	**PRESERVANTE SK (0.5%)**	**TENSOACTIVO T-20 (0,5%)**
1	POL-3 (1%)	+	+
2	POL-2 (10%)	+	+
3	POL-3 (1%)		+
4	POL-2 (10%)		+
5	Solo ingrediente activo - Sin adición de componentes de formulación		

Una vez definidos los diferentes prototipos, se realizó el proceso de formulación, según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Cuando se cumplió el tiempo de fermentación y obtención del ingrediente activo, se realizó la mezcla con los diferentes componentes previamente preparados, obteniendo al final los cinco prototipos en un volumen de 60 mL que posteriormente fue dosificado en volúmenes de 10 mL en tubos Falcon® (Figura 4-18).

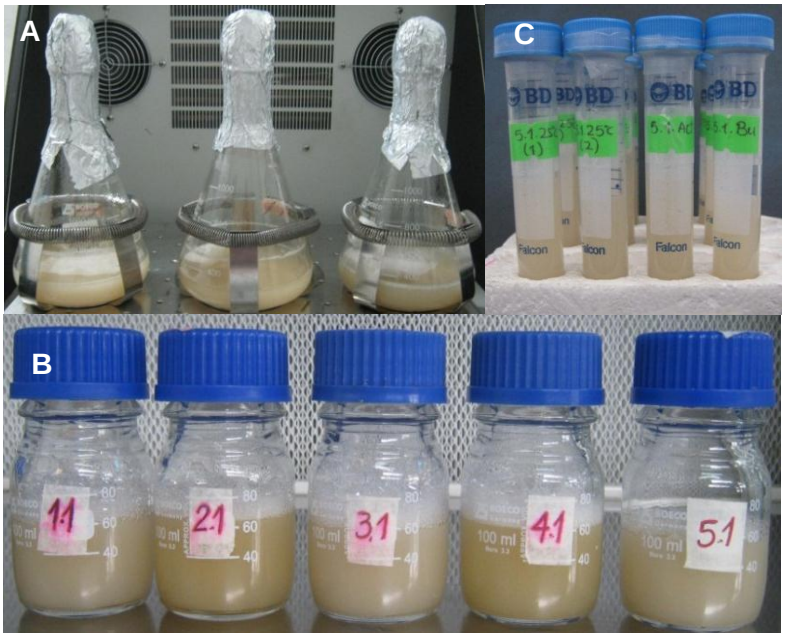


Figura 4-18. Fases del proceso de formulación. A. Ingrediente activo producido después de 5 días de agitación en erlenmeyers de 1L de capacidad. B. Mezcla de ingrediente activo con componentes de cada prototipo en volumen final de 60 mL. C. Dosificación de prototipos (10 mL) en tubos Falcon®.

4.3.1 Pruebas de viabilidad y pureza de prototipos

Después del proceso de formulación se determinó la viabilidad celular y pureza de cada prototipo a diferentes tiempos (1, 30, 60, 90 y 120 días).

Inicialmente se estableció la concentración celular para determinar el punto de inicio de cada uno de los prototipos realizando diluciones seriadas. El rango de concentraciones celulares estuvo entre $6{,}7x10^8$ UFC mL^{-1} y $7{,}7x10^8$ UFC mL^{-1} (Tabla 4-13**).**

Tabla 4-13. Concentración inicial de prototipos 1 a 5 después de procedimiento de formulación equivalente al tiempo inicial.

Concentración inicial (UFC mL^{-1})				
Prototipo				
1	**2**	**3**	**4**	**5**
$6{,}8x10^8$	$6{,}7x10^8$	$7{,}2x10^8$	$7{,}7x10^8$	$6{,}9x10^8$

Sin embargo, al observar al estereomicroscopio las siembras de la última dilución realizada para verificar la pureza de los prototipos, se observaron 2 tipos de colonia cuyas características macroscópicas se detallan a continuación (Figura 4-19**)**.

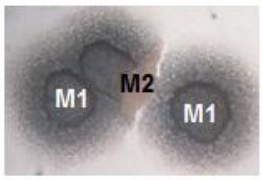
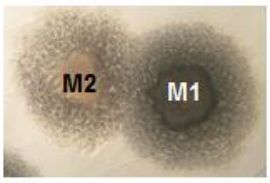
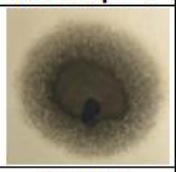
Morfotipos observados		
		
Caracteristicas	**Morfotipo 1**	**Morfotipo 2**
		
Tamaño	Grande	Grande
Forma	Irregular	Irregular
Consistencia	Seca	Viscosa
Superficie	Rugosa	Lisa
Borde	Irregular	Irregular
Elevación	Acuminada	Plana

Figura 4-19. Características macroscópicas de los dos morfotipos observados en prueba de pureza de los prototipos de formulación. M1. Morfotipo 1: IM2C6 (WT) M2. Morfotipo 2. Presunta contaminante

En primera instancia, la aparición de este morfotipo adicional fue atribuida a un problema de contaminación (pese a la adición del preservante seleccionado), que podría haberse presentado en alguna fase del proceso de formulación ocasionando la presencia de la colonia con características diferentes a la de la cepa IM2C6. No obstante, esta formulación (Formulación 1) fue almacenada a las dos temperaturas definidas desde el inicio de este trabajo (4°C y 25°C) pese a presentar el problema de la presencia del morfotipo 2, dado que en un proceso de formulación previo (resultados no mostrados), se evidenció la presencia de este morfotipo por primera vez, conduciendo al descarte de todo el producto formulado.

Igualmente se tomó la decisión de volver a realizar proceso de formulación (Lote de Formulación 2), tomando esta vez la cepa IM2C6 necesaria para los pre-inóculos a partir del congelador de -80°C. Después del proceso y luego de realizar las pruebas de viabilidad y pureza, nuevamente apareció la colonia correspondiente al morfotipo 2 que ya se había presentado en las formulaciones anteriores. Al igual que en el proceso anterior y pese a la presencia de este segundo morfotipo, la formulación fue almacenada a las dos temperaturas y se decidió continuar con el proceso de determinación de viabilidad a lo largo del tiempo.

Nuevamente se realizó otro proceso de formulación (Lote de Formulación 3), esta vez modificando los días que estaría produciéndose el ingrediente activo, pasando de cinco a seis días en agitación constante (150 rpm, 27°C).

De igual manera que en los 3 procedimientos anteriores, apareció el morfotipo 2. Esta formulación, al igual que las dos anteriores, también fue almacenada a las dos temperaturas establecidas, continuando con el proceso para determinar viabilidad a lo largo del tiempo. En total, se realizó proceso de formulación cuatro veces, conservando tres de ellas en almacenamiento para determinación de viabilidad.

Para determinar si la colonia adicional que se había observado en los tres procesos de formulación correspondía a otro microorganismo o se trataba de la misma cepa IM2C6 presentando una morfología alterna, se llevó a cabo el aislamiento y purificación de ambos morfotipos. Tomando como fuente de muestra la formulación 1, se obtuvieron colonias puras en agar TSA (Morfotipo 1: IM2C6 cepa silvestre y Morfotipo 2). Con el

objeto de verificar la identidad genotípica y fenotípica de ambos morfotipos, se procedió a hacer una caracterización que se describe a continuación:

Como primera medida, se realizó tinción de gram, observando bacilos Gram positivos para los dos morfotipos.

A continuación se dejaron siembras de los dos morfotipos en observación por espacio de once días (mantenidas en incubadora a 25°C) evidenciando cambios en la apariencia de ambas colonias, siendo mucho más evidentes en el morfotipo 2 al quinto, octavo y undécimo día (Figura 4-20)

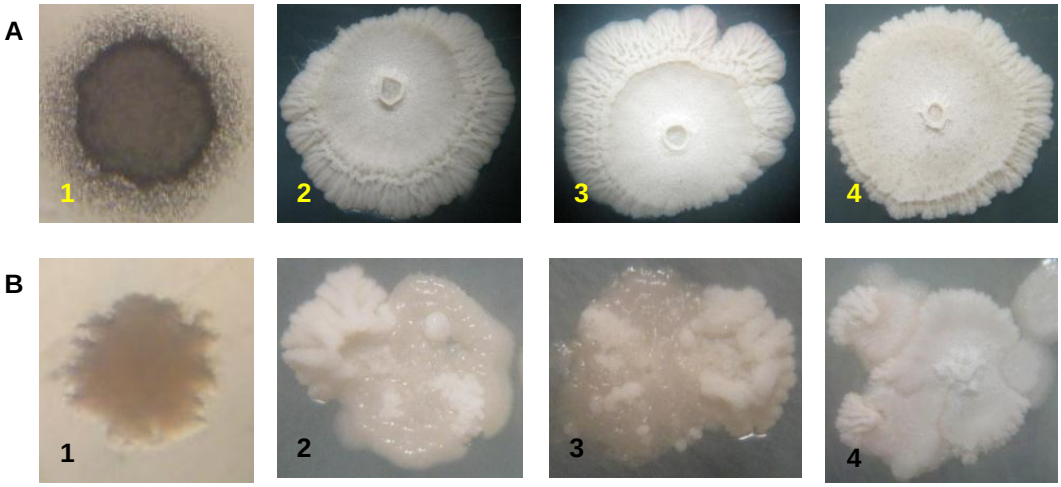


Figura 4-20. Cambios físicos en morfotipos 1 y 2. **A.** Morfotipo 1 (IM2C6 cepa silvestre) 1. Día 0, 2. Día 5, 3. Día 8, 4. Día 11. **B.** Morfotipo 2. 1. Día 0, 2. Día 5, 3. Día 8, 4. Día 11. Fuente: Autora 2018.

Una prueba adicional consistió en repetir con estos dos morfotipos las pruebas de antagonismo *in vitro* realizadas en la primera fase de este estudio bajo las mismas condiciones ya descritas en la sección de materiales y métodos con el fin de determinar si el morfotipo 2 presentaba este tipo de interacción. Después de cuatro días, se confirmó nuevamente antagonismo entre el morfotipo 1 (IM2C6) y el hongo así como se evidenció antagonismo entre el morfotipo 2 y el hongo (Figura 4-21)

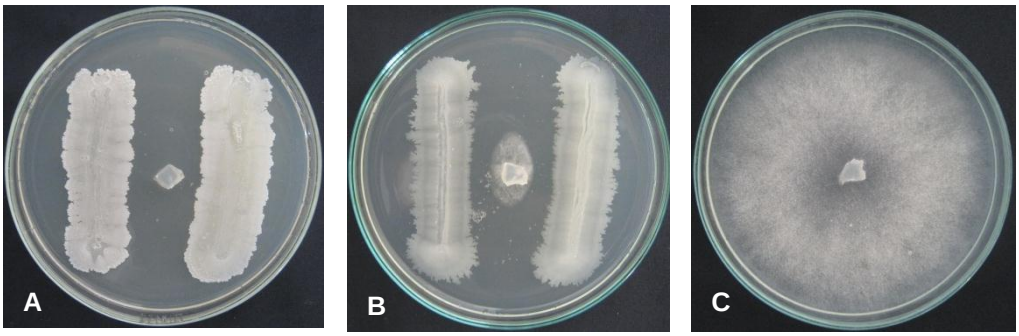


Figura 4-21. Prueba de antagonismo *in vitro* contra el aislamiento de *Botrytis* proveniente de la Finca Ciprés**.** A. Morfotipo 1 (IM2C6) B. Morfotipo 2 C. Testigo *Botrytis.* Fotografías tomadas después de 4 días de inoculación. Fuente: Autora 2017.

En paralelo con las pruebas realizadas (tinción de gram, observación de cambios a lo largo del tiempo, prueba de antagonismo *in vitro*), se tomaron colonias aisladas y purificadas de cada uno de los morfotipos y se extrajo el ADN por el método de lisis alcalina (Tejera *et al*., 2005)

Posteriormente se realizó amplificación y secuenciación del gen que codifica para la subunidad A de la girasa (*gyrA*) con los dos aislamientos en ambos sentidos (forward y reverse). Los productos de PCR obtenidos (aproximadamente 1000 bp) fueron purificados y secuenciados en el servicio de Secuenciación y Análisis Molecular SSiGMol del Instituto de Genética de la Universidad Nacional (IGUN).

Una vez obtenidas las secuencias de cada aislamiento (en los dos sentidos), estas fueron depuradas mediante el programa FinchTV y comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI para establecer su identidad. Para los dos morfotipos, la identidad fue del 99% correspondiente a *Bacillus velezensis* / *Bacillus amyloliquefaciens.*

Al obtener las secuencias consenso (de ambos sentidos) y hacer su alineamiento, se obtuvo un porcentaje de identidad entre la secuencia del morfotipo 1 y morfotipo 2 del 99.56% (Anexo C)

Adicionalmente se tomaron las secuencias (forward y reverse) para cada morfotipo y se alinearon entre ellas, utilizando el programa de alineamiento BLAST de la base de datos del NCBI (“Basic Local Alignment Search Tool,” 2018). Esto con el fin de determinar el

porcentaje de similitud entre ellas (Anexo D y E). La tabla 4-14 indica el porcentaje de similitud entre secuencias en un mismo sentido para cada morfotipo.

Tabla 4-14. Resultados de alineamientos locales BLAST en la base de datos del NCBI (Morfotipos 1 y 2) y alineamiento entre secuencias obtenidas de Morfotipo 1 y Morfotipo 2. Se indican los porcentajes de identidad más altos para cada aislamiento.

Región o gen amplificado	Alineamiento	Cobertura	Valor E	Porcentaje de Identidad	Longitud total fragmento
gyrA	Secuencia forward morfotipo 1/ Secuencia forward morfotipo 2	100%	0	100%	560 nucleótidos
gyrA	Secuencia reverse morfotipo 1/ Secuencia reverse morfotipo 2	100%	0	99,72%	362 nucleótidos

Los resultados de las pruebas encaminadas a resolver el interrogante de la identidad del morfotipo 2 permitieron concluir:

- Tanto el morfotipo 1 (IM2C6 – cepa silvestre) como el morfotipo 2 pertenecen a la misma especie (*Bacillus velezensis* / *B. amyloliquefaciens*).

- En la secuencia reverse se evidenció un problema de calidad de secuencia. Al realizar verificación de la calidad de la misma con el programa FinchTV, se detectó la presencia de un nucleótido adicional (G) que podría explicar el 99,72% en el porcentaje de identidad. Si el nucleótido en mención es editado, el porcentaje de identidad resultante es el 100%.

- De acuerdo a las pruebas de antagonismo *in vitro* realizadas contra *Botrytis*, el morfotipo 2 presenta actividad de antagonismo (Figura 4-21), demostrando que también tiene atributos que están presentes en el principio activo.

- Ante la imposibilidad de eliminar la presencia del morfotipo 2 en cada proceso de formulación realizado y bajo los argumentos anteriormente mencionados se podría sugerir que es probable que el morfotipo 2 corresponda a una variante fenotípica de la cepa IM2C6 y de no ser así, es un “presuntivo contaminante” que es considerado un organismo GRAS con actividad antagonista contra *B.cinerea*.

El fenómeno de variación fenotípica se ha descrito para bacterias gram negativas como *Acidovorax citrulli*, causante de la mancha de la fruta en cucurbitáceas (Shrestha *et al.*, 2013). Igualmente en *Pseudomonas brassicacearum* se ha reportado este fenómeno como estrategia de colonización radicular (Achouak *et al.*,2007)

Debido a la aparición del morfotipo 2, se realizaron importantes ajustes en cuanto a las medidas de esterilidad y asepsia empleadas en cada una de las fases del proceso de formulación. Si bien en todas las formulaciones apareció siempre el morfotipo 2, es importante recalcar que no se observaron morfotipos adicionales.

La pureza está definida por el porcentaje de contaminantes microbianos (bacterias, mohos y levaduras) presentes en un lote de bioplaguicida (Diaz *et al.*, 2018). En Colombia es de obligatorio cumplimiento que cualquier bioproducto que vaya a ser comercializado cuente con una pureza igual o mayor al 95% sin contener microorganismos contaminantes ni patógenos a humanos, animales o plantas (Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2011)

Para efectos de los prototipos desarrollados en este estudio y después de determinar la concentración en UFC mL^{-1} de esta morfología adicional, se determinó que la presencia de este morfotipo correspondía aproximadamente al 24% de los conteos de viabilidad. (Anexos F, G, H).

Si bien durante las pruebas de viabilidad se contabilizaron los dos morfotipos, para el análisis estadístico se consideró únicamente el morfotipo 1. El reporte se realizó como UFC mL^{1} de producto líquido formulado determinándose a los siguientes días después de almacenamiento para cada formulación (Tabla 4-15):

Tabla 4-15. Tiempo de determinación de viabilidad de lotes de formulación preparados.

Formulación	Días de almacenamiento a 4°C y 25°C
Lote 1	1, 30, 60, 90, 120
Lote 2	1, 30, 60, 90
Lote 3	1, 30, 60

Para cada uno de los lotes de formulación (1, 2 y 3) se determinó:

-Viabilidad en función del tiempo por cada prototipo (para cada temperatura).

-Viabilidad de cada uno de los prototipos en cada tiempo evaluado.

-Viabilidad de los prototipos comparando valores de inicio y valores de tiempo final de evaluación. Así, para el lote de formulación 1 se analizó la viabilidad final a los 120 días, para el lote de formulación 2 a los 90 días y para el lote de formulación 3 a los 60 días.

-Comportamiento global entre lotes al tiempo inicial (día 1) y al día 60.

-Viabilidad de prototipos a los 60 días de almacenamiento para cada temperatura en los tres lotes producidos.

4.3.1.1 Viabilidad lote de Formulación 1

Viabilidad en función del tiempo para cada prototipo

Prototipos almacenados a 4°C: De acuerdo a los resultados obtenidos, los prototipos 2, 3, 4 y 5 almacenados a 4°C permanecieron viables y con concentraciones estables desde el día 1 hasta los 120 días después de formulación con valores entre $6,7x10^8$ hasta $9,7x10^8$ UFC mL^{-1}. El prototipo 1 por su parte, empezó con una concentración menor a la de los demás prototipos, evidenciándose un incremento (posiblemente por efecto de la germinación y división celular de las esporas presentes en el producto) hacia el día 120 llegando a una concentración final promedio de $8,8x10^8$ UFC mL^{-1}(Tabla 4-16 A).

Prototipos almacenados a 25°C: los prototipos 1, 2, 3 y 4 almacenados a esta temperatura presentaron viabilidad y estabilidad en su concentración celular desde el día 1 hasta el día 120 con valores de concentración celular entre $6,7x10^8$ hasta $9,7x10^8$ UFC mL^{-1}. Para esta temperatura, el prototipo 5 empezó con una concentración menor, alcanzando un valor promedio de $9.0x10^8$ UFC mL^{-1} a los 120 días (Tabla 4-16 B).

Viabilidad de cada uno de los prototipos en cada tiempo evaluado (1, 30, 60, 90 y 120 días): Se observa que todos los prototipos correspondientes a este lote de formulación fueron estables en cada tiempo evaluado. Sin embargo, llama la atención los conteos obtenidos a los 90 días con los prototipos 1 y 3 en donde se obtuvieron los mayores recuentos a 4°C ($9,3x10^8$ y $9,2x10^8$ para prototipo 1 y 3 respectivamente) comparados con los almacenamientos a 25°C ($5,9x10^8$ y $5,6x10^8$ prototipo 1 y 3

respectivamente). Si bien se presentaron diferencias para este tiempo entre esos prototipos de acuerdo a la temperatura a la que estaban almacenados, la viabilidad en los otros tiempos evaluados (día 1, 30, 60 y 120) fue estadísticamente similar para todos los prototipos (tabla 4-16).

Viabilidad de los prototipos analizando concentración celular al inicio y al final (120 días después): comparando las concentraciones del día de inicio con respecto al final, se obtuvieron incrementos en los datos de concentración celular para los prototipos 1, 2, 3 y 5 almacenados a 4°C. Sin embargo, estas diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente para el prototipo 1. Con respecto a los prototipos almacenados a 25°C, se vieron incrementos en los prototipos 2, 4 y 5 y disminuciones en los prototipos 1 y 3. Sin embargo, ninguno de estos fue estadísticamente significativo. Este evento podría explicarse a la luz de las variaciones intrínsecas que pueden tener lugar en un sistema biológico.

Tabla 4-16. Evaluación en el tiempo de la viabilidad celular lote de Formulación 1**.** A. Temperatura de almacenamiento a 4°C. B. Temperatura de almacenamiento a 25°C. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias a lo largo del tiempo para cada prototipo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre un mismo tiempo incluyendo las dos temperaturas. Datos corresponden a la media de un tratamiento con tres replicas. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).P: Prototipo.

Lote Formulación 1															
A. Viabilidad celular UFC/mL - 4°C															
P	**Día 1**			**Día 30**			**Día 60**			**Día 90**			**Día 120**		
1	$6,8 \times 10^8$	B	a	$8,3 \times 10^8$	AB	a	$8,6 \times 10^8$	A	a	$9,3 \times 10^8$	A	a	$8,8 \times 10^8$	A	a
2	$6,7 \times 10^8$	A	a	$6,8 \times 10^8$	A	a	$8,4 \times 10^8$	A	a	$7,7 \times 10^8$	A	ab	$7,6 \times 10^8$	A	a
3	$7,2 \times 10^8$	A	a	$8,2 \times 10^8$	A	a	$9,7 \times 10^8$	A	a	$9,2 \times 10^8$	A	a	$8,2 \times 10^8$	A	a
4	$7,7 \times 10^8$	A	a	$7,9 \times 10^8$	A	a	$7,9 \times 10^8$	A	a	$7,7 \times 10^8$	A	ab	$7,3 \times 10^8$	A	a
5	$6,9 \times 10^8$	A	a	$9,6 \times 10^8$	A	a	$8,7 \times 10^8$	A	a	$9,7 \times 10^8$	A	a	$7,8 \times 10^8$	A	a
B. Viabilidad celular UFC/mL - 25°C															
P	**Día 1**			**Día 30**			**Día 60**			**Día 90**			**Día 120**		
1	$6,8 \times 10^8$	A	a	$7,7 \times 10^8$	A	a	$6,7 \times 10^8$	A	a	$5,9 \times 10^8$	A	b	$4,9 \times 10^8$	A	a
2	$6,7 \times 10^8$	A	a	$6,3 \times 10^8$	A	a	$9,7 \times 10^8$	A	a	$5,3 \times 10^8$	A	b	$7,2 \times 10^8$	A	a
3	$7,2 \times 10^8$	A	a	$7,4 \times 10^8$	A	a	$7,3 \times 10^8$	A	a	$5,6 \times 10^8$	A	b	$6,3 \times 10^8$	A	a
4	$7,7 \times 10^8$	A	a	$8,3 \times 10^8$	A	a	$8,1 \times 10^8$	A	a	$7,1 \times 10^8$	A	ab	$7,8 \times 10^8$	A	a
5	$6,9 \times 10^8$	A	a	$9,2 \times 10^8$	AB	a	$9,4 \times 10^8$	A	a	$7,9 \times 10^8$	AB	ab	$9,0 \times 10^8$	AB	a

4.3.1.2 Viabilidad lote de Formulación 2

Para este lote de formulación y en razón a los inconvenientes presentados con la aparición del morfotipo 2, se decidió usar para la preparación de los preinóculos la cepa IM2C6 que estaba almacenada a -80°C.

Viabilidad en función del tiempo para cada prototipo

Prototipos almacenados a 4°C: De acuerdo a los resultados obtenidos, los prototipos 1, 4 y 5 almacenados a 4°C permanecieron viables y con concentraciones estables desde el día 1 hasta los 120 días después de formulación con valores entre $9,6x10^8$ y $8,1x10^8$ UFC mL^{-1}. Por otro lado, los prototipos 2 y 3, presentaron diminuciones en viabilidad celular a los 30 y 60 días, incrementando nuevamente su concentración a los 120 días. Pese a estas inflexiones en la concentración celular de estos dos prototipos, se estableció que todas las formulaciones almacenadas a 4°C presentaron estabilidad y viabilidades similares a las del punto de inicio que estuvieron en el rango de $9,6x10^8$ UFC mL^{-1} a $1,2x10^9$ UFC mL^{-1} (Tabla 4-17 A).

Prototipos almacenados a 25°C: el prototipo 1 almacenado a esta temperatura presentó viabilidad y estabilidad en su concentración celular desde el día 1 hasta el día 120 con valores de concentración celular entre $9,6x10^8$ hasta $8,0x10^8$ UFC mL^{-1}. El prototipo 5 por su parte, inicio con una concentración promedio de $1,0x10^9$ UFC mL^{-1} y aunque presentó diferencias estadísticas por un incremento que se evidenció hacia los 30 y 60 días presentó a los 90 días una concentración similar a la del inicio ($1,1x10^9$ UFC mL^{-1}). En los prototipos 2, 3 y 4 se observaron disminuciones en la concentración celular a lo largo del tiempo, siendo más notoria en el prototipo 3 donde se establecieron diferencias estadísticas a los 60 y 90 días. Por su parte los prototipos 2 y 4 permanecieron estables hasta los 60 días, tiempo despues del cual se evidenció disminución en viabilidad siendo estadísticamente significativa para los 90 días (Tabla 4-17 B).

Viabilidad de cada uno de los prototipos en cada tiempo evaluado (1, 30, 60 y 90 días): Respecto a la viabilidad celular obtenida en el día 1, como era de esperarse no se evidenciaron diferencias entre prototipos tomando como punto de inicio una concentración celular promedio de $1,1x10^9$ UFC mL^{-1}.

Para el día 30, se observaron diferencias entre temperaturas, siendo mayores los conteos obtenidos para los prototipos que se encontraban almacenados a 25°C, con promedio de $1,1x10^9$ UFC mL^{-1} en comparación con $7,9x10^8$ UFC mL^{-1} de concentración promedio obtenida en los prototipos almacenados a 4°C.

Al determinar la viabilidad celular a los 60 días, se establecieron diferencias entre los prototipos 1 y 2 almacenados a 4°C, presentando los menores conteos de concentración celular ($6,7x10^8$ UFC mL^{-1} promedio) comparados con el resto de prototipos.

Luego de 90 días de almacenamiento, el prototipo con los mayores conteos de concentración celular fue el prototipo 5 almacenado a 25°C ($1,1x10^9$ UFC mL^{-1}), siendo estadísticamente similar a los prototipos 1, 3 y 5 almacenados a 4°C. Por su parte, los prototipos 2 y 4 almacenados a 4°C fueron similares a los prototipos 1, 2, 3 y 4 almacenados a 25°C, siendo el prototipo 2 (25°C) el que presentó los valores más bajos de viabilidad ($5,3x10^8$ UFC mL^{-1}) (Tabla 4-17).

Viabilidad de los prototipos analizando concentración celular al inicio y al final (90 días después): comparando las concentraciones del día de inicio con respecto al final, todos los prototipos almacenados a 4°C presentaron disminución en viabilidad celular, sin que esta fuera estadísticamente significativa. Para los prototipos almacenados a 25°C se observó disminución en el prototipo 1 e incremento en el prototipo 5 a los 90 días de almacenamiento, sin embargo estas variaciones tampoco fueron estadísticamente significativas. Vale la pena recalcar los valores obtenidos con los prototipos 2, 3 y 4 en dicha temperatura de almacenamiento, en donde se observó un descenso en la viabilidad celular del día 1 al día 90. Esta disminución fue más drástica para los prototipos 2 y 3, donde los valores iniciales que estaban en un valor promedio de $1,1x10^9$ UFC mL^{-1} descendieron de forma significativa a un valor promedio de $5,5x10^8$ UFC mL^{-1}.

Tabla 4-17. Evaluación en el tiempo de la viabilidad celular lote de Formulación 2**.** A. Temperatura de almacenamiento a 4°C. B. Temperatura de almacenamiento a 25°C. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias a lo largo del tiempo para cada prototipo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre un mismo tiempo incluyendo las dos temperaturas. Datos corresponden a la media de un tratamiento con tres replicas. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).

Lote Formulación 2												
A. Viabilidad celular UFC/mL - 4°C												
Prototipo	**Día 1**			**Día 30**			**Día 60**			**Día 90**		
1	$9,6x10^8$	A	a	$7,7x10^8$	A	bcd	$6,9x10^8$	A	b	$8,7x10^8$	A	abc
2	$1,1x10^9$	A	a	$6,9x10^8$	AB	d	$6,4x10^8$	B	b	$8,1x10^8$	AB	bcd
3	$1,2x10^9$	A	a	$9,2x10^8$	B	bcd	$9,6x10^8$	B	ab	$1,0x10^9$	AB	ab
4	$1,1x10^9$	A	a	$7,4x10^8$	A	cd	$9,0x10^8$	A	ab	$8,1x10^8$	A	bcd
5	$1,0x10^9$	A	a	$8,2x10^8$	A	bcd	$9,8x10^8$	A	ab	$9,6x10^8$	A	ab
B. Viabilidad celular UFC/mL - 25°C												
Prototipo	**Día 1**			**Día 30**			**Día 60**			**Día 90**		
1	$9,6x10^8$	A	a	$9,7x10^8$	A	abcd	$1,1x10^9$	A	ab	$8,0x10^8$	A	bcd
2	$1,1x10^9$	A	a	$1,1x10^9$	A	abcd	$9,5x10^8$	AB	ab	$5,3x10^8$	B	d
3	$1,2x10^9$	A	a	$1,1x10^9$	A	ab	$8,5x10^8$	B	ab	$5,8x10^8$	C	cd
4	$1,1x10^9$	A	a	$1,1x10^9$	A	ab	$9,2x10^8$	A	ab	$5,7x10^8$	B	cd
5	$1,0x10^9$	B	a	$1,3x10^9$	A	a	$1,3x10^9$	A	a	$1,1x10^9$	AB	a

4.3.1.3 Viabilidad lote de formulación 3

Viabilidad en función del tiempo para cada prototipo

Para este lote de formulación y con el objeto de superar los inconvenientes presentados con la aparición del morfotipo 2 en las formulaciones anteriores, se tomó nuevamente para el inóculo la cepa IM2C6 obtenida a partir de almacenamiento a -80°C. Por otro lado, se decidió dejar la cepa un día más en incubación para la obtención del ingrediente activo (tiempo total: 6 días). En este lote de formulación no se presentaron diferencias estadísticas en ninguno de los conteos de viabilidad celular de los prototipos a lo largo del tiempo, mostrando estabilidad a lo largo de los 60 días evaluados (Tabla 4-18).

Viabilidad de prototipos en cada tiempo evaluado (1, 30 y 60 días): para este lote de formulación no se presentaron diferencias estadísticas entre los diferentes tiempos. Sin embargo, vale la pena mencionar que los valores de concentración celular del prototipo 5 almacenado a 25°C fueron los más altos para los 30 y 60 días ($1,1x10^9$ UFC mL^{-1} y $1,0x10^9$ UFC mL^{-1} respectivamente) (Tabla 4-18).

Viabilidad de los prototipos analizando concentración celular al inicio y al final (60 días después): En este lote de formulación no se presentaron diferencias estadísticas en ninguno de los conteos de viabilidad celular de los prototipos ni al inicio ni a los 60 días (Tabla 4-18).

Tabla 4-18. Evaluación en el tiempo de la viabilidad celular lote de Formulación 3**.** A. Temperatura de almacenamiento a 4°C. B. Temperatura de almacenamiento a 25°C. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias a lo largo del tiempo para cada prototipo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre un mismo tiempo incluyendo las dos temperaturas. Datos corresponden a la media de un tratamiento con tres replicas. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).

Lote Formulación 3			
A. Viabilidad celular UFC/mL - 4°C			
Prototipo	**Día 1**	**Día 30**	**Día 60**
1	$9,6x10^8$ A a	$8,7x10^8$ A a	$5,7x10^8$ A a
2	$8,4x10^8$ A a	$8,5x10^8$ A a	$7,6x10^8$ A a
3	$9,2x10^8$ A a	$8,6x10^8$ A a	$6,2x10^8$ A a
4	$6,9x10^8$ A a	$8,6x10^8$ A a	$6,8x10^8$ A a
5	$9,1x10^8$ A a	$8,7x10^8$ A a	$9,7x10^8$ A a
B. Viabilidad celular UFC/mL - 25°C			
Prototipo	**Día 1**	**Día 30**	**Día 60**
1	$9,6x10^8$ A a	$9,8x10^8$ A a	$7,9x10^8$ A a
2	$8,4x10^8$ A a	$8,8x10^8$ A a	$9,3x10^8$ A a
3	$9,2x10^8$ A a	$8,2x10^8$ A a	$8,9x10^8$ A a
4	$6,9x10^8$ A a	$8,6x10^8$ A a	$7,9x10^8$ A a
5	$9,1x10^8$ A a	$1,1x10^9$ A a	$1,0x10^9$ A a

Viabilidad de prototipos a los 60 días de almacenamiento a 4°C en los tres lotes de formulación

Prototipo 1: de los tres lotes de formulación se obtuvieron diferencias estadísticas entre el lote 1 ($8,6x10^8$ UFC mL^{-1}) y el lote 3 ($5,5x10^8$ UFC mL^{-1}). Estas diferencias pueden atribuirse probablemente a las concentraciones celulares iniciales para cada lote, que fueron mayores en el lote 3 ($9,6x10^8$ UFC mL^{-1}). Es probable que un mayor valor en concentración celular al inicio del almacenamiento afecte la viabilidad a lo largo del tiempo.

Prototipos 2, 3, 4 y 5: de los tres lotes de formulación para estos prototipos no se presentaron diferencias estadísticas a los 60 días despues de formulación. En los tres

lotes de formulación (considerados como tres repeticiones en el tiempo) se presentaron viabilidades similares para este tiempo.

Viabilidad de prototipos a los 60 días de almacenamiento a 25°C en los tres lotes de formulación

Prototipos 1, 2, 3, 4 y 5: no se presentaron diferencias estadísticas entre los tres lotes de formulación almacenados a esta temperatura. Las tres repeticiones en el tiempo fueron consistentes en la viabilidad celular a los 60 días.

Con respecto a la viabilidad y estabilidad de las 3 formulaciones, se puede concluir lo siguiente:

Lote Formulación 1: de manera general todos los prototipos permanecieron viables y estables durante el tiempo evaluado (1 a 120 días) en cada una de las temperaturas.

Lote Formulación 2: todos los prototipos conservaron su viabilidad y fueron estables en almacenamiento a 4°C a lo largo del tiempo evaluado (1 a 90 días).

A 25°C los valores de concentración celular fueron mayores que a 4°C en el día 30. Sin embargo la estabilidad se vio afectada, reflejándose en un descenso de la viabilidad con el paso del tiempo en los prototipos 2, 3 y 4.

Cabe resaltar las diferencias de este lote en comparación con el lote de formulación 1 en donde no se presentaron diferencias en viabilidad con los prototipos 2, 3 y 4 almacenados a 25°C. Vale la pena mencionar que el lote de formulación 2 empezó con una concentración promedio superior ($1,1x10^9$ UFC mL^-1) a la del lote de formulación 1 ($7,0x10^8$ UFC mL^{-1}). Es probable que una alta concentración inicial afecte negativamente la viabilidad del producto a lo largo del tiempo al producirse eventos como la germinación de las endosporas. Posiblemente al haber mayor cantidad de células al inicio, los nutrientes disponibles se agoten más rápidamente y la viabilidad celular caiga lo que podría reflejarse en una disminución de la concentración celular a medida que pasa el tiempo.

Lote Formulación 3: durante los 60 días de almacenamiento, todos los prototipos fueron viables y se conservaron estables a cada temperatura. Así mismo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas en valores de concentración celular en cada uno de los tiempos evaluados.

De manera general, para todos los lotes de formulación en las dos temperaturas de almacenamiento, las concentraciones celulares se mantuvieron en el rango de $6,7x10^8$ a $1x10^9$ UFC mL^{-1}, concentración adecuada para brindar acciones de control contra *Botrytis*.
Lo anterior, considerando que en la primera fase de este estudio en donde se realizaron las pruebas de tamizaje entre las 12 cepas de BAFEs, la concentración mínima probada fue de 10^6 UFC mL^{-1}, obteniendo porcentajes de incidencia de "0" para el caso de la cepa IM2C6.

Adicionalmente, se puede concluir que la adición de excipientes de formulación no tiene efectos deletéreos sobre la vida de anaquel entre los prototipos, puesto que no se presentaron diferencias entre los prototipos con adición de los excipientes evaluados (prototipos 1, 2, 3 y 4) en comparación con el prototipo sin aditivos (prototipo 5). Sin embargo, la temperatura puede tener efecto en la estabilidad de los productos. Es el caso del lote 2 de formulación, en donde a pesar de contar con mayores valores de concentración celular a 25°C, la estabilidad se vio afectada a lo largo del tiempo en los prototipos 2, 3 y 4 mostrando diferencias estadísticas significativas.
Sería necesario por tanto, seguir con las evaluaciones de viabilidad durante un lapso de tiempo mayor (por ejemplo durante un año) para establecer con certeza hasta que tiempo se mantienen valores de viabilidad aceptables para ejercer acción de control contra la enfermedad.

4.3.2 Pruebas de actividad de prototipos

4.3.2.1 Pruebas de actividad en pétalo

Con el fin de establecer si los prototipos mantenían su actividad biocontroladora y eran eficaces en el control de la enfermedad producida por *Botrytis,* se realizó evaluación en discos de pétalo para los prototipos almacenados a 4°C (con 54 días de almacenamiento) y para los prototipos almacenados a 25°C (con 75 días de almacenamiento) del lote de Formulación 1.

Para llevar a cabo esta prueba, cada uno de los prototipos fue preparado haciendo una dilución 1:10 del producto formulado en agua estéril. La concentración final se calculó con los datos de viabilidad a los 30 días para los prototipos almacenados a 4°C y los

datos de viabilidad a 60 días para los prototipos almacenados a 25°C. Teniendo en cuenta lo anterior, la concentración final para cada prototipo quedo como se indica en la tabla 4-19.

Tabla 4-19. Concentración celular final de cada prototipo del lote de formulación 1 en prueba de eficacia en discos de pétalo**.**

Prueba de Eficacia - Discos de pétalo			
Almacenamiento 4°C (54 ddf*)		**Almacenamiento 25°C (75 ddf)**	
Prototipo	**Concentración final UFC mL^{-1}**	**Prototipo**	**Concentración final UFC mL^{-1}**
1	8,3x10^{7}	**1**	6,7x10^{7}
2	6,8x10^{7}	**2**	9,7x10^{7}
3	8,2x10^{7}	**3**	7,3x10^{7}
4	7,9x10^{7}	**4**	8,1x10^{7}
5	9,6x10^{7}	**5**	9,4x10^{7}

*ddf: días después de formulación

Pasadas 72 horas, se realizaron las lecturas para establecer porcentaje de eficacia de control de los prototipos contra *B.cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela. Los análisis estadísticos se realizaron teniendo en cuenta el desempeño de los prototipos a cada temperatura.

La eficacia de los prototipos también se comparó con un testigo comercial (Sanystar®), producto de carácter preventivo cuya esquema de aplicación se recomienda en condiciones de una incidencia baja de enfermedad en campo.

Los porcentajes de eficacia obtenidos con todos los prototipos almacenados a 4°C fueron superiores al 70% donde el menor porcentaje de eficacia lo presentó el prototipo 3 (71%), aunque sin presentar diferencias estadísticas con los demás prototipos cuyo porcentaje de eficacia estuvo entre el 78 y 90%. A esta temperatura de almacenamiento los prototipos no presentaron diferencias con el testigo comercial (Figura 4-22 A).

Con respecto al porcentaje de eficacia de los prototipos almacenados a 25°C, no se presentaron diferencias significativas entre los prototipos formulados, presentándose el mayor valor para el testigo comercial (73.5%, tratamiento sin almacenamiento) (Figura 4-22 B). Cabe resaltar que el testigo comercial también presentó disminución importante en

porcentaje de eficacia si se observa el resultado obtenido cuando se realizó la prueba de 4°C (96%) en comparación cuando se realizó la prueba de 25°C (73.5%) (Figura 4-22 A)

Estas diferencias en los porcentajes pueden corresponder a cambios inherentes a las pruebas dado que se realizaron en momentos diferentes (condiciones de montaje que pudieron haber variado entre una prueba y otra tales como inoculo de hongo, pétalos utilizados entre otras).

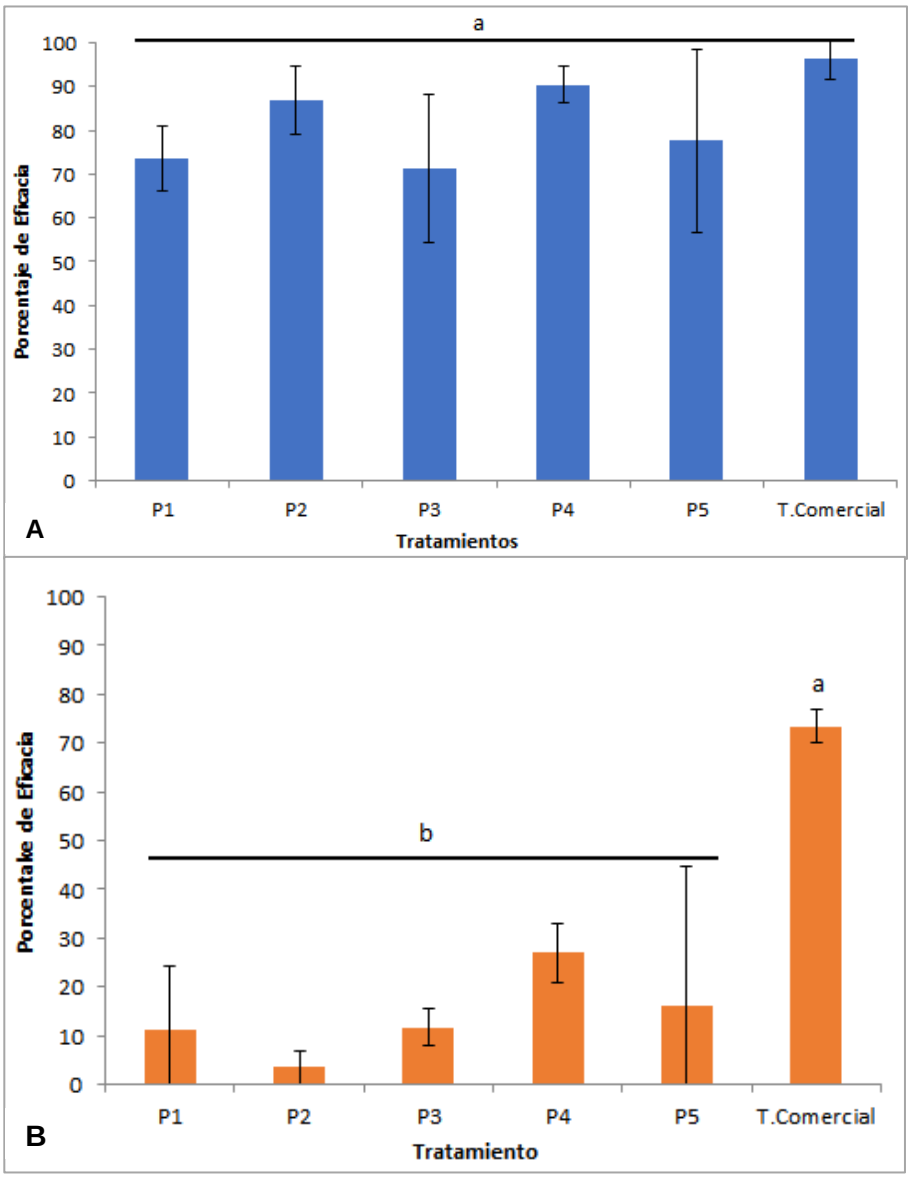


Figura 4-22. Eficacia de prototipos de formulación A. Almacenados a 4°C (54 días de almacenamiento) y B. Almacenados a 25°C (75 días de almacenamiento). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$).

Respecto a la variable incidencia, con los prototipos almacenados a 4°C se obtuvieron los menores valores, siendo los prototipos 3 y 5 (43,8% y 29,2% de incidencia respectivamente) los que presentaron los valores más bajos aunque sin presentar diferencias estadísticas con los demás prototipos ni con el testigo comercial (Figura 4-23 A).

Con respecto a los prototipos almacenados a 25°C, el prototipo 5 presentó el menor valor (77%) y el prototipo 2 se caracterizó por presentar el mayor valor (87.5%), aunque cabe aclarar que entre prototipos no se presentaron diferencias estadísticas (Figura 4-23 B).

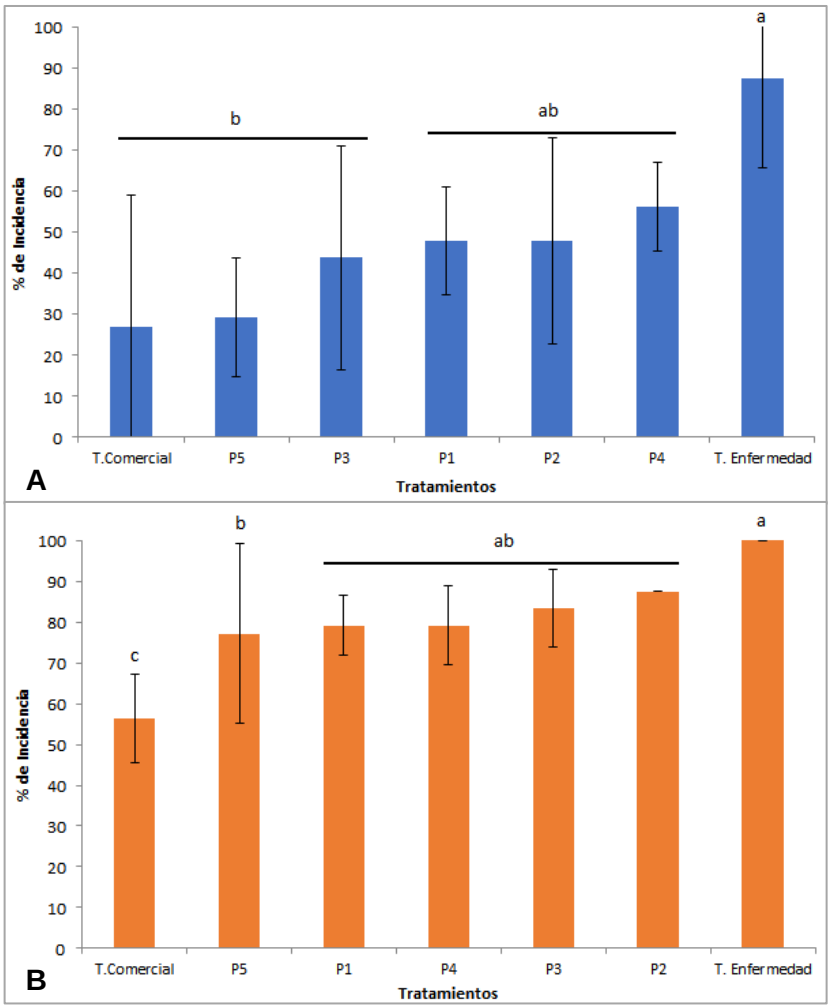


Figura 4-23. Porcentaje de incidencia de prototipos de formulación almacenados a A. 4°C (54 días de almacenamiento) y B. 25°C (75 días de almacenamiento). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$). Testigo comercial estaba

almacenado a temperatura ambiente al momento de la prueba de acuerdo a las recomendaciones del productor.

Al analizar la severidad reportada como diámetro de afección promedio de pétalo obtenidos con cada prototipo, se evidenciaron valores estadísticamente similares entre los prototipos almacenados a 4°C, junto con el testigo comercial (Figura 4-24 A)

Por su parte, todos los prototipos almacenados a 25°C presentaron valores de diámetro de afección estadísticamente similar al testigo de enfermedad. Estos a su vez tuvieron diferencias estadísticas con respecto al testigo comercial (Figura 4-24 B)

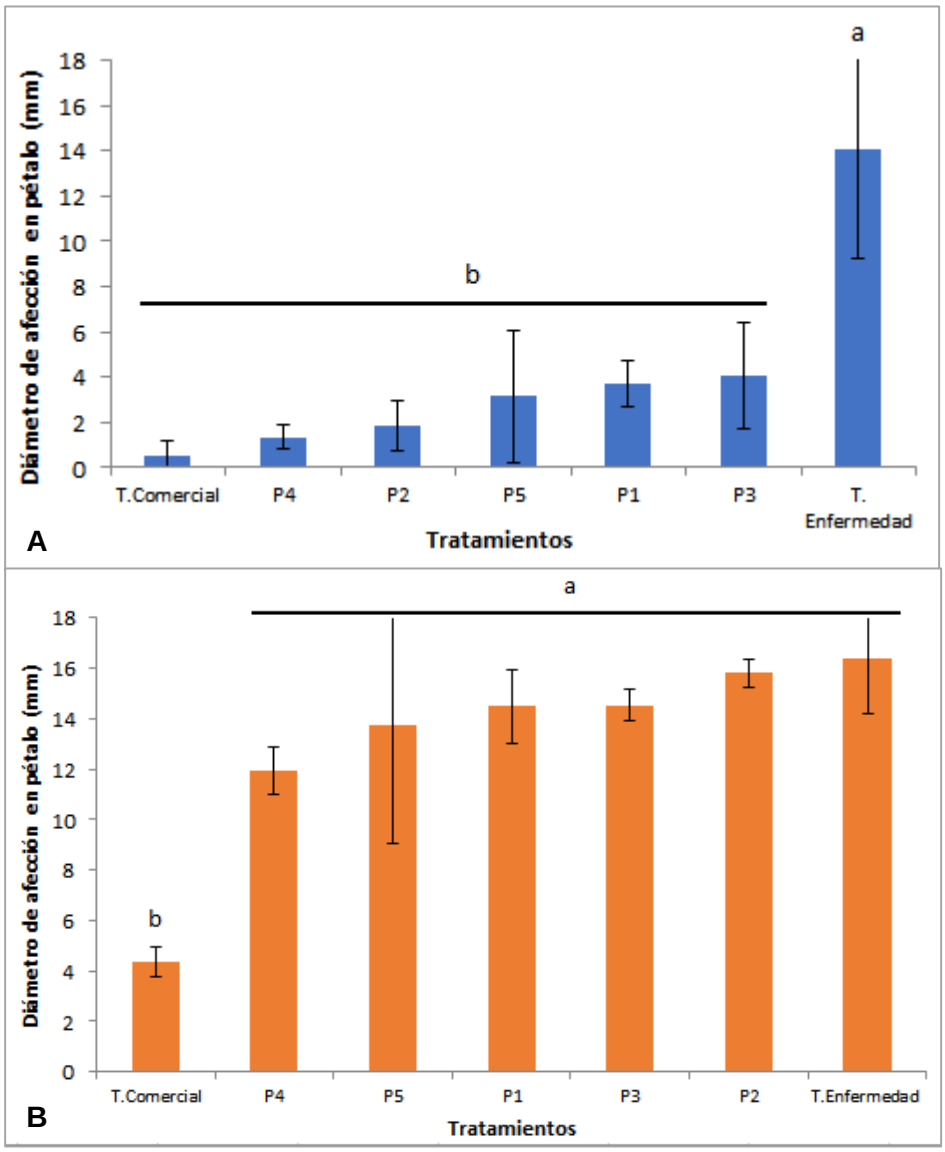


Figura 4-24. Severidad expresada como diámetro de afección promedio en pétalo en prototipos almacenados a A. 4°C (54 días de almacenamiento) y B. 25°C (75 días de almacenamiento).

Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$). Testigo comercial estaba almacenado a temperatura ambiente al momento de la prueba de acuerdo a las recomendaciones del productor.

De acuerdo a los resultados anteriores, la concentración celular final empleada de 10^7 UFC mL fue efectiva para controlar el moho gris en discos de pétalo y los porcentajes de eficacia fueron mejores en los prototipos almacenados a 4°C.

De igual manera, los prototipos 4 (mayor valor en porcentaje de eficacia – 90%) 3 y 5 (menores porcentajes de incidencia 43.8% y 29.2% respectivamente) se destacaron al presentar los mejores porcentajes de control.

Con base en estos resultados, los prototipos 3, 4, y 5 almacenados a 4°C fueron seleccionados para la prueba final en flor completa.

4.3.2.2 Pruebas de actividad en flor completa

En estas pruebas se evaluó el efecto antagonista de los prototipos de formulación P3 (Polietilenglicol 1%, sin preservante), P4 (PVP 10%, sin preservante) y P5 (ingrediente activo – sin adición de componentes de formulación) después de 137 días de almacenamiento a 4°C contra *Botrytis cinerea* en condiciones controladas en tallos de rosa variedad Vendela.

Cada uno de los prototipos fue preparado haciendo una dilución 1:10 del producto formulado en agua estéril, quedando cada prototipo a la concentración final que se indica en la tabla 4-20.

Tabla 4-20. Concentración celular final de cada prototipo en prueba de eficacia en flor completa. *ddf: días después de formulación

Prueba de eficacia - Flor completa	
Almacenamiento 4°C - 137ddf	
Prototipo	**Concentración final (UFC mL^{-1})**
3	$8,2x10^7$
4	$7,3x10^7$
5	$7,8x10^7$

Luego de la aplicación de los prototipos de formulación, se llevó a cabo la evaluación de los parámetros de incidencia y severidad a los 4 días de incubación. En este contexto, si

bien con todos los tratamientos se observó disminución en el porcentaje de incidencia de la enfermedad, el único prototipo que presentó diferencias estadísticas fue el P5 cuyo porcentaje de incidencia fue del 67% (igual que el testigo comercial) con respecto al testigo de enfermedad (que presentó una incidencia del 100%).

Los otros dos prototipos (P3 y P4) mostraron incidencia de la enfermedad con valores del 93% y 87% respectivamente (Figura 4-25).

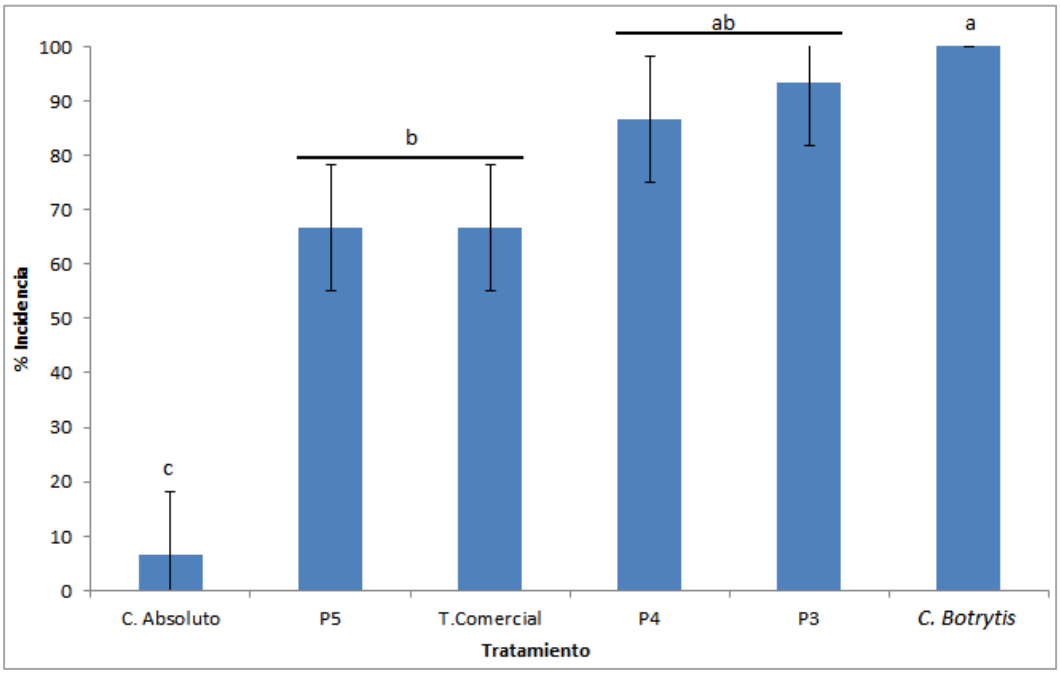


Figura 4-25. Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en flor completa con aplicación de prototipos P3, P4 y P5. Los datos corresponden a la media de 3 réplicas por tratamiento, cada uno con 15 flores. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Desde el inicio de este estudio, la naturaleza de los prototipos a formular se concibió de carácter preventivo, toda vez que las evaluaciones realizadas desde las pruebas de pétalos hasta las pruebas en flor completa se realizaron aplicando primero el biocontrolador y 24 horas después el inóculo de *Botrytis*.

Sin embargo, vale la pena mencionar que las condiciones de evaluación establecidas en este ensayo son bastante conducentes de la enfermedad puesto que el inóculo de *Botrytis* fue relativamente alto y las condiciones de incubación de las flores en términos de humedad y temperatura tendían a favorecer el desarrollo de la enfermedad.

Con respecto al índice de severidad, el dato obtenido en este parámetro para el control de enfermedad fue de 3,1 mostrando diferencias estadísticas con respecto a los prototipos evaluados (Figura 4-26). Todos los prototipos mostraron actividad biocontroladora significativa contra *Botrytis cinerea* evidenciándose un desempeño sobresaliente del prototipo 5 (índice de severidad: 0,7) sin que presentara diferencias estadísticas con los prototipos 3 y 4 o con el testigo comercial.

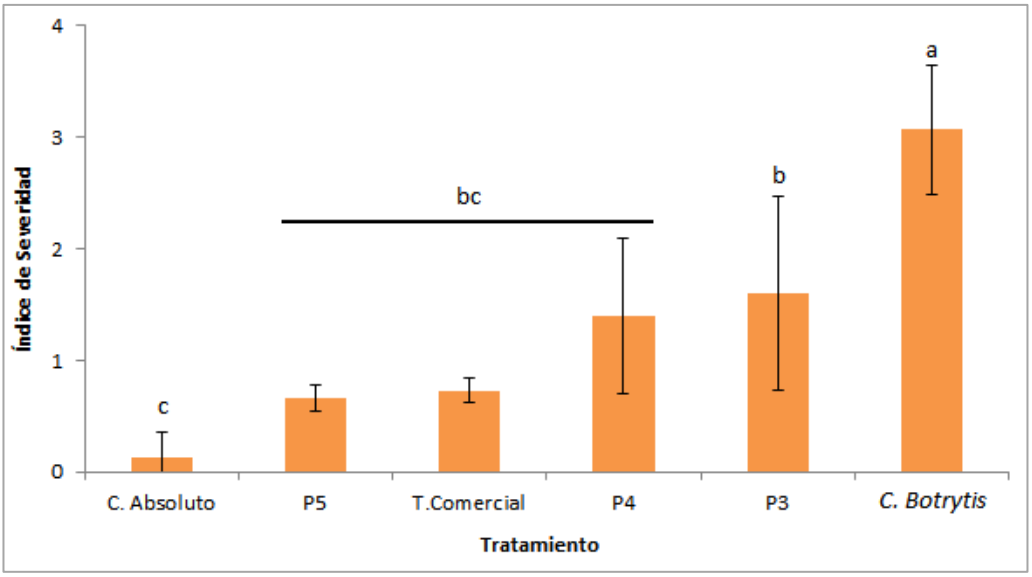


Figura 4-26. Índice de severidad de *Botrytis cinerea* en flor completa con aplicación de prototipos P3, P4 y P5. Los datos corresponden a la media de 3 réplicas por tratamiento, cada uno con 15 flores. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Con relación al porcentaje de pétalos infectados por flor, se presentó un 100% de pétalos afectados en el control de enfermedad y porcentajes de incidencia iguales para los prototipos a los obtenidos con la lectura en flor completa (Figura 4-25)

En cuanto al índice de severidad, el máximo valor alcanzado por el control de enfermedad estuvo en 1,8 presentando diferencias estadísticas con los prototipos evaluados y el testigo comercial, siendo el prototipo 3 el que se caracterizó por presentar el mayor índice de severidad (1,0). El prototipo 5, se destacó por presentar el menor índice de severidad (0,3), disminuyendo en más de un punto la afección en comparación con el testigo de enfermedad y sin tener diferencias con el testigo comercial (Figura 4-27)

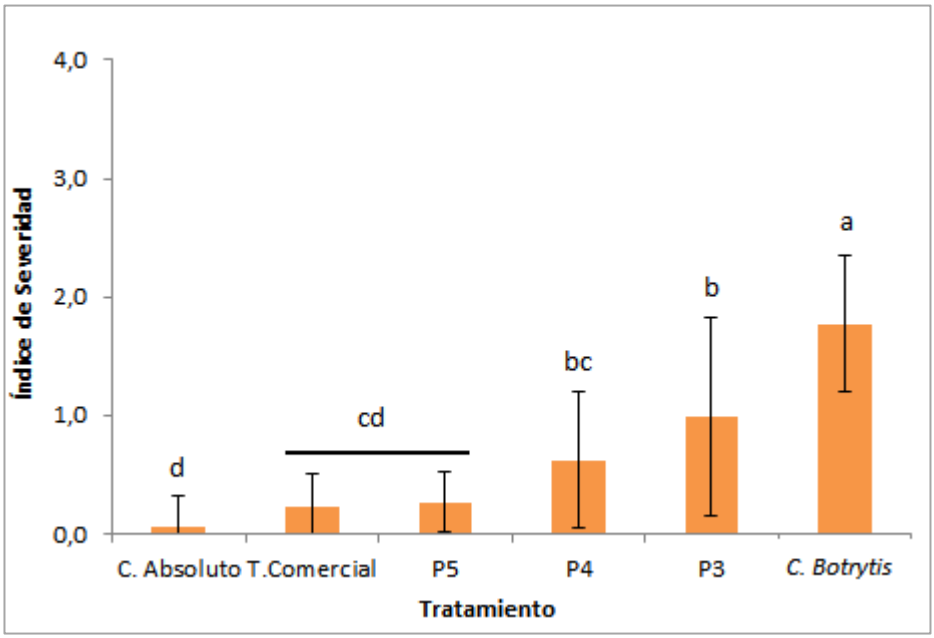


Figura 4-27. Índice de severidad de *Botrytis cinerea* en pétalos con aplicación de prototipos P3, P4 y P5**.** Los datos corresponden a la media de 3 réplicas por tratamiento, cada uno con 15 flores. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0.05$)

Con base en los resultados de porcentaje de incidencia e índice de severidad tanto en flor completa como en pétalos, se destaca la actividad de biocontrol de los prototipos 4 (PVP -10%) y 5 (prototipo sin aditivos de formulación).

Adicional a los prometedores porcentajes de control observados, es importante resaltar que ninguno de los prototipos aquí obtenidos causó problemas adicionales que se pueden presentar posteriores al desarrollo de un producto, como manchado en tejido vegetal por efecto de los excipientes utilizados en las mezclas de formulación.

Por otra parte, al analizar el desempeño de los prototipos 3 y 4 (conteniendo excipientes de formulación) con el del prototipo 5 (sin excipientes) y a la luz de los resultados obtenidos con respecto a severidad, no se evidencia de manera contundente el beneficio de incluir excipientes (como los utilizados en este trabajo) en la formulación.

Serían necesarias pruebas adicionales para establecer con certeza los beneficios de incluir excipientes en la preparación y que logren potenciar aspectos relevantes en una formulación, tales como adhesión, prolongación de vida en anaquel, disminución en porcentajes de incidencia de enfermedad entre otros.

Al ensayar formulaciones de diferente tipo (líquidas, secado en frío – *freeze drying*- y secado por aspersión en lecho fluido – *fluid bed spray drying*) Gotor-Vila *et al*., (2017) reportaron un resultado similar con la formulación líquida de *Bacillus subtilis.* De acuerdo a los resultados que obtuvieron, no hubo alteraciones considerables en la viabilidad celular despues de 4 meses de almacenamiento, así como no evidenciaron efectos con la adición de protectantes en la formulación, escogiendo el prototipo sin aditivos para pruebas finales de eficacia contra *Monilinia fructicola* en duraznos.

Los prototipos obtenidos en este trabajo, concibieron el uso combinado de endosporas, metabolitos secundarios presentes en el medio y aditivos de formulación. En las pruebas de eficacia en pétalo y flor completa, pese a obtener un porcentaje de incidencia alto, se logró disminución en cuanto a severidad de la enfermedad de forma importante.

Lo obtenido en este estudio concuerda con lo reportado por Yánez-Mendizábal *et al*., (2012) quienes mencionan que si bien los mecanismos antifúngicos involucrados con la actividad de control biológico de *Bacillus* están principalmente relacionados con la producción de lipopeptidos (Cawoy *et al*., 2015), es también muy deseable el uso del cultivo en su conjunto puesto que la acción combinada de endosporas y metabolitos secundarios presentes en este otorgan porcentajes altos de control de enfermedad.

Para el control de sigatoka negra en banano Gutierrez-Monsalve *et al.*, (2015) evaluaron la aplicación de un fungicida microbiano con *B.subtilis* EA CB0015 como principio activo reportando un caso similar. Con aplicaciones cada 11 días durante 10 semanas, evidenciaron reducción de la severidad de la enfermedad en 28,1% en pruebas de campo, reportando que todos los componentes presentes en el medio (esporas, células vegetativas y metabolitos secundarios) participaron en la reducción de la severidad de la enfermedad y la germinación de ascosporas del hongo patógeno.

Algunos otros estudios referencian el uso de formulaciones líquidas de *Bacillus* para el control de enfermedades. Dheepa *et al.*, (2016) reportaron disminuciones en porcentaje de enfermedad ocasionada por roya blanca en crisantemos mediante aplicación de formulaciones liquidas de *Bacillus* con adiciones de glicerol, tween 20 y PVP como excipientes. Al realizar aplicaciones quincenales con formulaciones de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, reportaron porcentajes de afección de 30% y 27,82% respectivamente comparado con el 56,09% del testigo de enfermedad.

Asi mismo, un estudio para control de Fusarium en tomate, reportó que la formulación liquida realizada con *B. subtilis* EP CO16 con adición de glicerol, no presentó perdida ni de actividad ni de viabilidad despues de 12 meses de almacenamiento. De otro lado, las pruebas realizadas en campo despues de aplicación de la formulación reportaron porcentajes de incidencia de 4,61% de enfermedad, en comparación con 29,75% del testigo de enfermedad (Ramyabharathi & Rajendran, 2016).

De acuerdo a los resultados obtenidos con los prototipos de formulación líquida, se puede proponer a las BAFEs como candidatos para desarrollo de un producto comercial. Sin embargo se hace necesario optimizar ciertos factores, como la exploración con otros excipientes que confieran ventajas al principio activo (esporas, metabolitos). Esto con el fin de potenciar su actividad despues de estar en almacenamiento a 25°C, aspecto deseable desde el punto de vista comercial y necesario tener en cuenta en estudios posteriores.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se confirmó la capacidad antagonista *in vitro* de las doce cepas de BAFEs evaluadas, evidenciando su amplio espectro de actividad al ser enfrentadas contra 10 aislamientos diferentes de *Botrytis* provenientes de fincas productoras de rosas de la Sabana de Bogotá.
- Después de cuatro pruebas *in vivo*, la cepa IM2C6 (identificada como *Bacillus velezensis*) fue contundente en su desempeño. Los resultados tanto para porcentaje de incidencia como para índice de severidad en pruebas con sobrenadante diluido al 50% y 5% fueron consistentes a lo largo del tiempo, convirtiéndolo en un candidato idóneo para la elaboración del prototipo de formulación líquida.
- De acuerdo a las pruebas realizadas y bajo las condiciones experimentales de este trabajo, se podría sugerir que un mecanismo de acción correspondería al de antagonismo. Lo anterior en razón a la actividad de biocontrol evidenciada al hacer uso de los sobrenadantes en las pruebas en pétalo.
- Los diferentes excipientes y/o aditivos utilizados (polímeros como el PVP y el PEG, preservantes, tensioactivos) no afectaron la viabilidad celular de la cepa IM2C6 en los prototipos desarrollados. Esto se ve reflejado en los resultados de viabilidad, en donde los valores de concentración celular se mantuvieron en un rango de $4x10^8$ a $9x10^8$ UFC mL^{-1} en el lote de formulación 1 que fue el que contó con más tiempo de almacenamiento (120 días).
- La reiterada aparición del morfotipo 2 durante los diferentes procesos de formulación, implica un reto por superar en posteriores iniciativas ya sea mediante

modificaciones en los procedimientos aquí descritos o mediante procesos adicionales que ayuden a esclarecer un probable fenómeno de variación fenotípica.

- Los prototipos de formulación evaluados (correspondientes al lote de formulación 1) que presentaron mejores porcentajes de eficacia fueron los que estuvieron almacenados a 4°C. Respecto a los bajos porcentajes de eficacia obtenidos con prototipos en almacenamiento a 25°C, es probable que ciertos compuestos presentes en el ingrediente activo (específicamente en el sobrenadante) sufran degradación a esta temperatura, provocando que la actividad de biocontrol se vea afectada de manera importante.
- Las pruebas de eficacia, demostraron que los prototipos 4 y 5 tuvieron niveles de control estadísticamente similares al control químico utilizado, sugiriendo un modo de acción preventivo y no curativo.

5.2 Recomendaciones

- Caracterizar los compuestos presentes en el sobrenadante producidos durante la obtención del ingrediente activo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el fin de esclarecer la identidad de los metabolitos secundarios producidos así como su rol en la actividad de biocontrol contra *B. cinerea*.
- Probar medios adicionales para producción del ingrediente activo, con el fin de optimizar la concentración celular final así como el tiempo de obtención.
- Explorar el efecto de otro tipo de excipientes que puedan conferir estabilidad a los componentes del ingrediente activo con el fin de mejorar los porcentajes de eficacia en prototipos almacenados a 25°C.
- Realizar caracterización molecular de la cepa seleccionada como principio activo empleando una estrategia de multilocus con otros genes con el fin de obtener un nivel de resolución mayor en cuanto a la identificación, mediante el uso de genes no constitutivos (por ejemplo usando genes de metabolismo primario).
- Realizar pruebas de compatibilidad de los prototipos con fungicidas utilizados en programas de manejo convencional de moho gris en fincas floricultoras y posteriormente establecer su efectividad en condiciones de campo.

A. Anexo: Composición medios de cultivo

- **Medio YBG**

Componente	Cantidad L^{-1}
Extracto de levadura	10 g
Peptona	10 g
*Glicerol	20 mL
Agar	10 g

*En 980 mL de agua destilada llevar a volumen con glicerol.

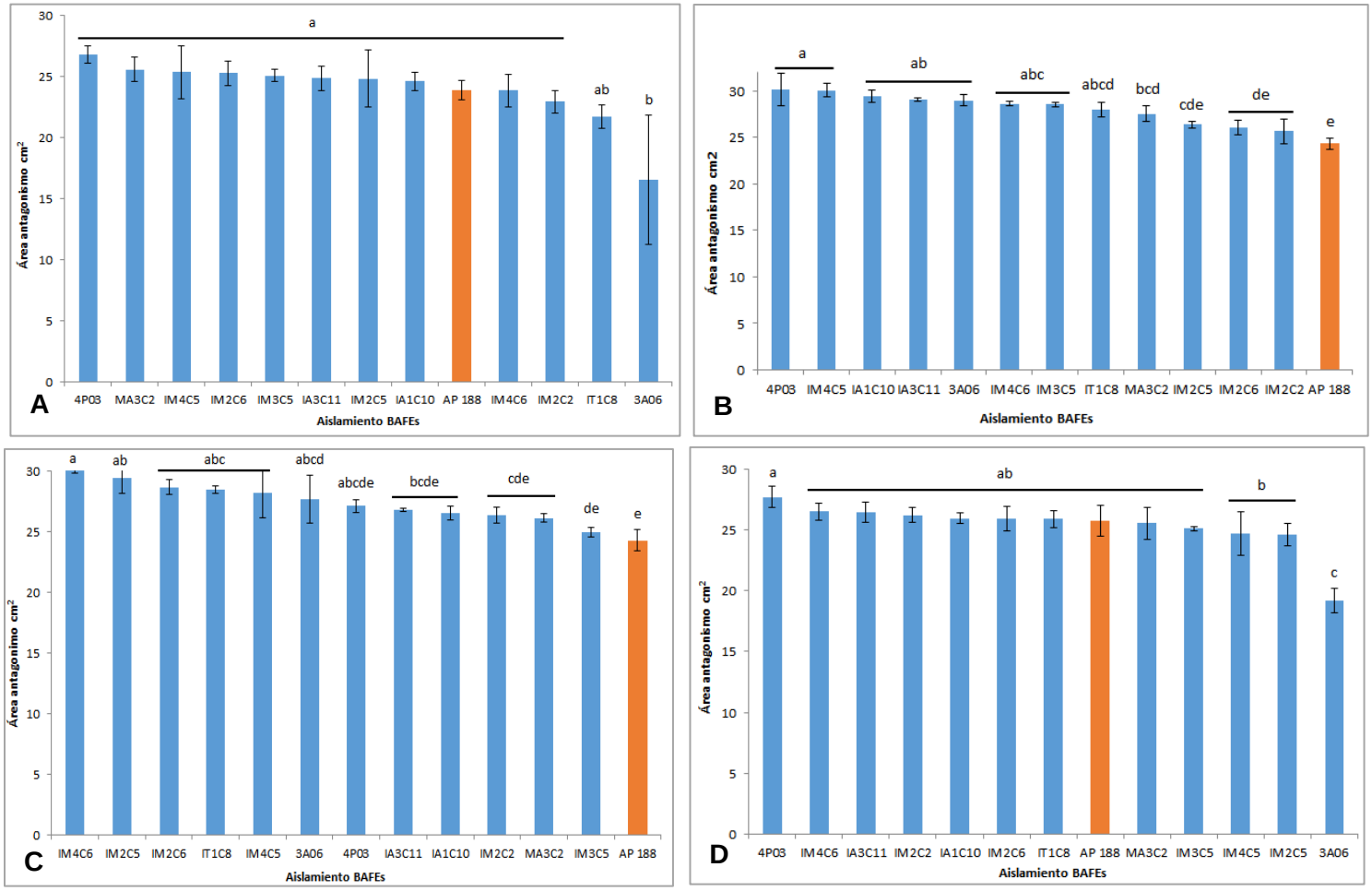
- **Medio de esporulación** (Abarca *et al*., 1992)

Componente	Cantidad L^{-1}
Glucosa	3,0 g
$CaCl . 2H_20$	0,088 g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,028 g
KH_2PO_4	6,8 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,12 g
$MnSO_4 . 4H_2O$	0,02 g
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,014 g
Triptona	7,0 g

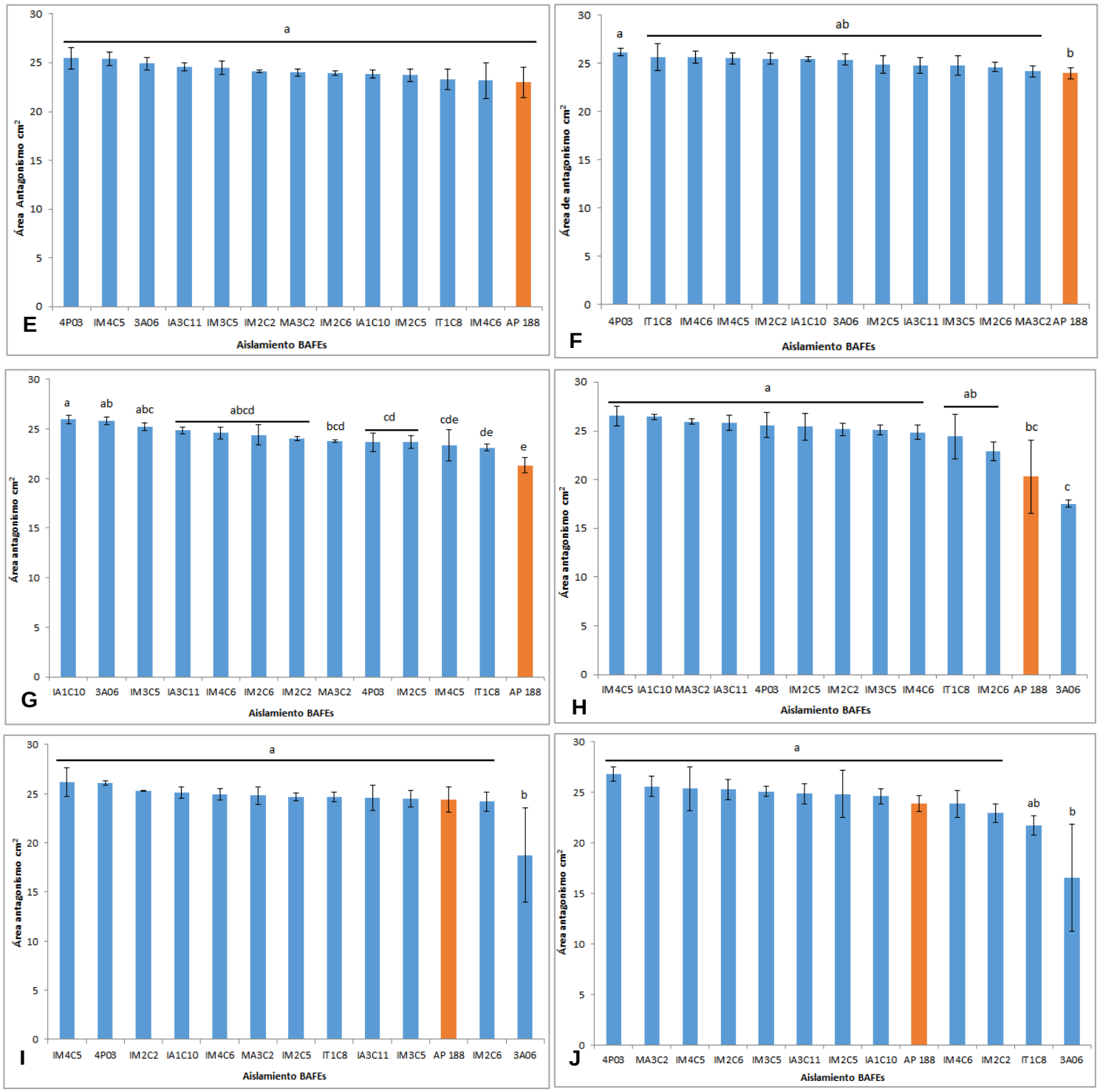
- **Medio MOLP** (Ahimou *et al*., 2000)

Componente	Cantidad L^{-1}
Caseina peptona (especial de Merck®)	30 g
Sacarosa	20 g
Extracto de Levadura	7,0 g
KH_2PO_4	1,9 g
$MgSO_4$	0,45 g
$MnSO_4 . H2O$	3,6 mg
Solución elementos traza	1 mL

B. Anexo: Gráficas de actividad antagonista in vitro de 12 cepas de BAFEs contra 10 aislamientos de *Botrytis* de diferentes fincas



A. Finca Ciprés B. Finca Mountain C. Finca Santana D. Finca Aljibe



E. Finca Jayvana F. Finca Tandil G. Finca Hato H. Finca Melody I. Finca TorreMolinos

J. Finca FL-Bojacá.

C. Anexo: Alineamiento de secuencias consenso obtenidas con *gyrA* de Morfotipo 1 (IM2C6) y Morfotipo 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1659 bits(898)	0.0	907/911(99%)	2/911(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    GGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAAGCCGGTTCACAGGCGGATTTTGTACGCAAT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAAGCCGGTTCACAGGCGGATTTTGTACGCAAT  60

Query  61   GAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGA  120

Query  121  AGTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAAT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  AGTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAAT  180

Query  181  GGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGT  240

Query  241  TGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAAT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAAT  300

Query  301  GGAAATCCTCCGGGACATTACGAAAGATACGATTGATTATCAAGATAACTATGACGGCGC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  GGAAATCCTCCGGGACATTACGAAAGATACGATTGATTATCAAGATAACTATGACGGCGC  360

Query  361  AGAAAGAGAACCTGTCGTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGAGCTGC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  AGAAAGAGAACCTGTCGTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGAGCTGC  420

Query  421  CGGTATTGCGGTCGGAATGGCGACAAATATTCCTCCGCATCAGCTTGGGGAAGTCATTGA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CGGTATTGCGGTCGGAATGGCGACAAATATTCCTCCGCATCAGCTTGGGGAAGTCATTGA  480

Query  481  AGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACAT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  AGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACAT  540

Query  541  CCCGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGTCAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGC  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  CCCGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGTCAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGC  600

Query  601  ATATGAATCCGGACGGGGATCCATTACGATCCGGGCTAAGGCTGAAAATCGAAGAGACAT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  601  ATATGAATCCGGACGGGGATCCATTACGATCCGGGCTAAGGCTG-AAATCGAAGAGACAT  659

Query  661  CATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTCACAGAACTTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGAT  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  660  CATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTCACAGAACTTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGAT  719

Query  721  TAATTGAAAAAATCGCAGATCTTGTCCGGGACaaaaaaaTCGAAGGAATTACCGATCTGC  780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  720  TAATTGAAAAAATCGCAGATCTTGTCCGGGACAAAAAAATCGAAGGAATTACCGATCTGC  779

Query  781  GTGACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAATCGTCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATG  840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  780  GTGACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAATCGTCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATG  839

Query  841  CTCACGTCATTTTGAATAACCTGTACAAACAAACGGCCCTGCAGACGT-CTTTCGGAATC  899
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  840  CTCACGTCATTTTGAATAACCTGTACAAACAAACGGCCCTGCAGACGTCCTTTCGGAATC  899

Query  900  AACCTTGCTGG  910
            ||| ||||||
Sbjct  900  AACTCTGCTGG  910
```

D. Anexo: Alineamiento de secuencias forward Morfotipo 1 (IM2C6) y Morfotipo 2

Sequence ID: Query_225081 **Length:** 560 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1 to 560 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1035 bits(560)	0.0	560/560(100%)	0/560(0%)	Plus/Plus

```
Query  7    GGTCTGAAGCCGGTTCACAGGCGGATTTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAGT  66
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GGTCTGAAGCCGGTTCACAGGCGGATTTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAGT  60

Query  67   GACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCACCCG  126
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCACCCG  120

Query  127  CACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGC  186
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  CACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGC  180

Query  187  TACATGCTTGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCG  246
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TACATGCTTGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCG  240

Query  247  ATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAATGGAAATCCTCCGGGACATTACG  306
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAATGGAAATCCTCCGGGACATTACG  300

Query  307  AAAGATACGATTGATTATCAAGATAACTATGACGGCGCAGAAAGAGAACCTGTCGTCATG  366
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  AAAGATACGATTGATTATCAAGATAACTATGACGGCGCAGAAAGAGAACCTGTCGTCATG  360

Query  367  CCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGAGCTGCCGGTATTGCGGTCGGAATGGCG  426
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  CCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGAGCTGCCGGTATTGCGGTCGGAATGGCG  420

Query  427  ACAAATATTCCTCCGCATCAGCTTGGGGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAG  486
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  ACAAATATTCCTCCGCATCAGCTTGGGGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAG  480

Query  487  AATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACATCCCGGGCCCGGATTTTCCGACT  546
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  AATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACATCCCGGGCCCGGATTTTCCGACT  540

Query  547  GCAGGTCAGATTTTGGGCCG  566
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  541  GCAGGTCAGATTTTGGGCCG  560
```

E. Anexo: Alineamiento de secuencias reverse Morfotipo 1 (IM2C6) y Morfotipo 2

Sequence ID: Query_28101 **Length:** 362 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1 to 362 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
662 bits(358)	0.0	361/362(99%)	1/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    CGAAA-GACGTCTGCAGGGCCGTTTGTTTGTACAGGTTATTCAAAATGACGTGAGCATTG  59
            ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    CGAAAGGACGTCTGCAGGGCCGTTTGTTTGTACAGGTTATTCAAAATGACGTGAGCATTG  60

Query  60   GCGTCACGGCGGATCTCAATGACGATTCTCATTCCGTTACGGTCGGATTCGTCACGCAGA  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GCGTCACGGCGGATCTCAATGACGATTCTCATTCCGTTACGGTCGGATTCGTCACGCAGA  120

Query  120  TCGGTAATTCCTTCGAttttttGTCCCGGACAAGATCTGCGATTTTTTCAATTAATCTC  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  TCGGTAATTCCTTCGATTTTTTTGTCCCGGACAAGATCTGCGATTTTTTCAATTAATCTC  180

Query  180  GCTTTGTTCACCTGATAAGGAAGTTCTGTGACAATAATTCTTTCTTTTCCCGATGATGTC  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GCTTTGTTCACCTGATAAGGAAGTTCTGTGACAATAATTCTTTCTTTTCCCGATGATGTC  240

Query  240  TCTTCGATTTCAGCCTTAGCCCGGATCGTAATGGATCCCCGTCCGGATTCATATGCCTTG  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TCTTCGATTTCAGCCTTAGCCCGGATCGTAATGGATCCCCGTCCGGATTCATATGCCTTG  300

Query  300  CGGATGCCGCTCCGGCCCAAAATCTGACCTGCAGTCGGAAAATCCGGGCCCGGGATGTAT  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CGGATGCCGCTCCGGCCCAAAATCTGACCTGCAGTCGGAAAATCCGGGCCCGGGATGTAT  360

Query  360  TC  361
            ||
Sbjct  361  TC  362
```

F. Anexo: Formulación 1: Conteos Morfotipo 1, Morfotipo 1 + Morfotipo2 y Porcentaje de Morfotipo 2 en conteo total

Formulación1									
Viabilidad UFC mL^{-1} - M1									
Prototipo	**Conteo M1 T0**	**Conteo M1 25°C 30 ddf**	**Conteo M1 25°C 60 ddf**	**Conteo M1 25°C 90 ddf**	**Conteo M1 25°C 120 ddf**	**Conteo M1 4°C 30 ddf**	**Conteo M1 4°C 60 ddf**	**Conteo M1 4°C 90 ddf**	**Conteo M1 4°C 120 ddf**
1	$6,8x10^8$	$7,7x10^8$	$6,7x10^8$	$5,9x10^8$	$4,9x10^8$	$8,3x10^8$	$8,6x10^8$	$9,3x10^8$	$8,8x10^8$
2	$6,7x10^8$	$6,3x10^8$	$9,7x10^8$	$5,3x10^8$	$7,2x10^8$	$6,8x10^8$	$8,4x10^8$	$7,7x10^8$	$7,6x10^8$
3	$7,2x10^8$	$7,4x10^8$	$7,3x10^8$	$5,6x10^8$	$6,3x10^8$	$8,2x10^8$	$9,7x10^8$	$9,2x10^8$	$8,2x10^8$
4	$7,7x10^8$	$8,3x10^8$	$8,1x10^8$	$7,1x10^8$	$7,8x10^8$	$7,9x10^8$	$7,9x10^8$	$7,7x10^8$	$7,3x10^8$
5	$6,9x10^8$	$9,2x10^8$	$9,4x10^8$	$7,9x10^8$	$9,0x10^8$	$9,6x10^8$	$8,7x10^8$	$9,7x10^8$	$7,8x10^8$
Viabilidad UFC mL^{-1} - M1 + M2									
Prototipo	**Conteo M1 + M2 T0**	**Conteo M1+M2 25°C 30 ddf**	**Conteo M1 + M2 25°C 60 ddf**	**Conteo M1 + M2 25°C 90 ddf**	**Conteo M1 + M2 25°C 120 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 30 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 60 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 90 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 120 ddf**
1	$9,0x10^8$	$1,2x10^9$	$1,1x10^9$	$8,8x10^8$	$7,4x10^8$	$1,3x10^9$	$1,3x10^9$	$1,4x10^9$	$1,3x10^9$
2	$9,1x10^8$	$1,0x10^9$	$1,5x10^9$	$8,7x10^8$	$1,0x10^9$	$1,2x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$
3	$8,9x10^8$	$1,3x10^9$	$1,2x10^9$	$9,6x10^8$	$8,6x10^8$	$1,3x10^9$	$1,4x10^9$	$1,3x10^9$	$1,2x10^9$
4	$8,1x10^8$	$1,3x10^9$	$1,2x10^9$	$1,2x10^9$	$1,2x10^9$	$1,3x10^9$	$1,2x10^9$	$1,2x10^9$	$9,8x10^8$
5	$1,2x10^9$	$1,4x10^9$	$1,5x10^9$	$1,3x10^9$	$1,2x10^9$	$1,4x10^9$	$1,4x10^9$	$1,5x10^9$	$1,1x10^9$
Porcentaje de M2 en conteo de M1 + M2									
Prototipo	**T0**	**25°C 30 ddf**	**25°C 60 ddf**	**25°C 90 ddf**	**25°C 120 ddf**	**4°C 30 ddf**	**4°C 60 ddf**	**4°C 90 ddf**	**4°C 120 ddf**
1	24	37	39	33	34	38	33	31	34
2	26	38	35	38	28	41	34	32	29
3	20	42	39	42	27	36	31	28	33
4	4	35	34	39	34	37	31	34	26
5	42	37	35	36	26	33	38	34	32

M1: Morfotipo 1 (IM2C6). M2: Sospechosa. Porcentaje promedio de M2 en formulación 1: 33%

G. Anexo: Formulación 2: Conteos Morfotipo 1, Morfotipo 1 + Morfotipo2 y Porcentaje de Morfotipo 2 en conteo total

Formulación 2							
Viabilidad UFC mL^{-1} - M1							
Prototipo	**Conteo M1 T0**	**Conteo M1 25°C 30 ddf**	**Conteo M1 25°C 60 ddf**	**Conteo M1 25°C 90 ddf**	**Conteo M1 4°C 30 ddf**	**Conteo M1 4°C 60 ddf**	**Conteo M1 4°C 90 ddf**
1	$9,6x10^8$	$9,7x10^8$	$1,1x10^9$	$8,0x10^8$	$7,7x10^8$	$6,9x10^8$	$8,7x10^8$
2	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$9,5x10^8$	$5,3x10^8$	$6,9x10^8$	$6,4x10^8$	$8,1x10^8$
3	$1,2x10^9$	$1,1x10^9$	$8,5x10^8$	$5,8x10^8$	$9,2x10^8$	$9,6x10^8$	$1,0x10^9$
4	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$9,2x10^8$	$5,7x10^8$	$7,4x10^8$	$9,0x10^8$	$8,1x10^8$
5	$1,0x10^9$	$1,3x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$8,2x10^8$	$9,8x10^8$	$9,6x10^8$
Viabilidad UFC mL^{-1} - M1 + M2							
Prototipo	**Conteo M1 + M2 T0**	**Conteo M1+M2 25°C 30 ddf**	**Conteo M1 + M2 25°C 60 ddf**	**Conteo M1 + M2 25°C 90 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 30 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 60 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 90 ddf**
1	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$1,3x10^9$	$9,6x10^8$	$9,3x10^8$	$8,5x10^8$	$9,9x10^8$
2	$1,3x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$6,4x10^8$	$8,5x10^8$	$7,9x10^8$	$9,9x10^8$
3	$1,3x10^9$	$1,4x10^9$	$1,1x10^9$	$7,2x10^8$	$1,1x10^9$	$1,2x10^9$	$1,2x10^9$
4	$1,4x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$7,5x10^9$	$8,5x10^8$	$1,0x10^9$	$9,6x10^8$
5	$1,2x10^9$	$1,5x10^9$	$1,4x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$1,2x10^9$
Porcentaje de M2 en conteo de M1 + M2							
Prototipo	**T0**	**25°C 30 ddf**	**25°C 60 ddf**	**25°C 90 ddf**	**4°C 30 ddf**	**4°C 60 ddf**	**4°C 90 ddf**
1	16	15	14	17	17	19	12
2	14	16	15	17	18	18	19
3	12	19	19	19	17	18	15
4	18	14	17	24	12	12	16
5	13	15	9	15	25	12	17

M1: Morfotipo 1 (IM2C6) M2: Sospechosa. Porcentaje promedio M2 en formulación 2: 16%

H. Anexo: Formulación 3: Conteos Morfotipo 1, Morfotipo 1 + Morfotipo2 y Porcentaje de Morfotipo 2 en conteo total

Formulación 3					
Viabilidad UFC mL^{-1} - M1					
Prototipo	**Conteo M1 T0**	**Conteo M1 25°C 30 ddf**	**Conteo M1 25°C 60 ddf**	**Conteo M1 4°C 30 ddf**	**Conteo M1 4°C 60 ddf**
1	$9,6x10^8$	$9,8x10^8$	$7,9x10^8$	$8,7x10^8$	$5,7x10^8$
2	$8,4x10^8$	$8,8x10^8$	$9,3x10^8$	$8,5x10^8$	$7,6x10^8$
3	$9,2x10^8$	$8,2x10^8$	$8,9x10^8$	$8,6x10^8$	$6,2x10^8$
4	$6,9x10^8$	$8,6x10^8$	$7,9x10^8$	$8,6x10^8$	$6,8x10^8$
5	$9,1x10^8$	$1,1x10^9$	$1,0x10^9$	$8,7x10^8$	$9,7x10^8$
Viabilidad UFC mL^{-1} - M1 + M2					
Prototipo	**Conteo M1 + M2 T0**	**Conteo M1+M2 25°C 30 ddf**	**Conteo M1 + M2 25°C 60 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 30 ddf**	**Conteo M1 + M2 4°C 60 ddf**
1	$1,2x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$7,1x10^8$
2	$1,1x10^9$	$1,3x10^9$	$1,2x10^9$	$1,0x10^9$	$9,2x10^8$
3	$1,1x10^9$	$1,0x10^9$	$1,2x10^9$	$1,1x10^9$	$7,7x10^8$
4	$9,0x10^8$	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$1,1x10^9$	$8,1x10^8$
5	$1,1x10^9$	$1,4x10^9$	$1,3x10^9$	$1,1x10^9$	$1,2x10^9$
Porcentaje de M2 en conteo de M1 + M2					
Prototipo	**T0**	**25°C 30 ddf**	**25°C 60 ddf**	**4°C 30 ddf**	**4°C 60 ddf**
1	18	26	29	19	20
2	21	29	21	18	18
3	17	21	25	20	19
4	23	19	25	20	16
5	18	23	22	20	20

M1: Morfotipo 1 (IM2C6) M2: Sospechosa. Porcentaje promedio M2 en formulación 3: 21%

Bibliografía

Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., & Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*, *93*(4), 436–442. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.436

Abarca, C., Martinez, A., Caro, M., & Quintero, R. (1992). Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawi. *Universidad Ciencia y Tecnologia*, *2*(3), 6. https://doi.org/10.2307/1421179

Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., & González-Mendoza, D. (2017). Antifungical activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. *Mycobiology*, *45*(4), 385–391. https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.385

Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., & Heulin, T. (2007). Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy . *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *17*(8), 872–879. https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.8.872

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.

Ahimou, F., Jacques, P., & Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, *27*(10), 749–754. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7

Ahlem, H., Mohammed, E., Badoc, A., & Ahmed, L. (2012). Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. *African Journal of Biotechnology*, *11*(9), 2210–2217. https://doi.org/10.5897/ajb11.645

Alvarez, H. (2012). Efecto del Manejo Nutricional del Calcio en la Expresión de *Botrytis cinérea* en Flores y Tallos de Rosa *sp.* Universidad Nacional de Colombia.

Amalraj, L. D., Venkateswarlu, B., Desai, S., G, P. K., Hassan, M., Sk, A., & Meenakshi, T. (2013). Effect of Polymeric Additives, Adjuvants , Surfactants on Survival , Stability and Plant Growth Promoting Ability of Liquid Bioinoculant. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2–6. https://doi.org/10.1109/CDC.2016.7798382

Arrebola, E., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, *53*(1), 122–128. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010

Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of

Bacillus subtilis EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, *114*(7), 195–200. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014

ASOCOLFLORES. (2018). *Boletín Estadístico - Informativo* (Vol. 1). Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/210302/CENATRA_Bolet_n_2016___10Abril2017__FINAL.pdf

Barnett, H., & Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. (B. Pub.Co, Ed.) (4th Editio).

Basic Local Alignment Search Tool. (2018). Retrieved from https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Bautista Silva, J. P., Barbosa Barbosa, H. de J., & Uribe Vélez, D. (2016). Prototipo de formulación a base de *Rhodotorula mucilaginosa* para el control de *Botrytis cinerea* en Rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *18*(2), 13. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55826

Beever, R., & Weeds, P. (2007). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and Botryotinia. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 29–48). Kluwer Academic Publishers, Dordercht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3

Blanco, D. (2012). Evaluación de bacilos aerobios formadores de endosporas (BAFES) para el control biológico de *Rhizoctonia solani* Kuhn en el cultivo de papa criolla (Solanum tuberosum Grupo Phureja). Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/10703/

Boddy, L. (2016). Pathogens of autotrophs. In L. A. Press (Ed.), *The Fungi 3rd Edition* (pp. 245–292).

Bouizgarne, B. (2013). Bacteria for plant growth promotion and disease management. (D. Maheshwari, Ed.), Bacteria in Agrobiology: Disease Management. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, *41*(2), 323–342. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015

Burges, H. . (Ed.). (1998). *Formulation of Microbial Biopesticides*. Springer Science+Business Media Dordrecht.

Caicedo, A. (2014). Diseño de un prototipo de formulación líquida a base de levaduras filosféricas para el control biológico de *Botrytis Cinerea* en rosas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Camelo, C. (2014). *Efecto de la selección rizosferica sobre la actividad promotora de crecimiento vegetal de Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endospora provenientes del Uraba Antioqueño*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from

http://www.bdigital.unal.edu.co/46035/1/1032398096.2014.pdf

Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. In *Pesticides in the modern world. Pesticides use and management. Edited by Margarita Stoytcheva* (pp. 273–302). https://doi.org/10.5772/948

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens. Microbial Biotechnology*, *8*(2), 281–295. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238

Ceballos, I., Villegas, V., Mosquera, S., Mira, J., Gutierrez, J., & Arroyave, J y Posada, L. (2014). *WO2014/178032 A1*. Colombia.

Ceballos, I., Villegas, V., Mosquera, S., Mira, J., Gutierrez, J., Arroyave, J., & Posada, L. (2016). *14/888.926*. United States.

Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., & Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters*, *30*(5), 919–923. https://doi.org/10.1007/s10529-007-9626-9

Chen, Z. M., Li, Q., Liu, H. M., Yu, N., Xie, T. J., Yang, M. Y., … Chen, X. D. (2010). Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(5), 1353–1360. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2162-x

Chiou, A. L., & Wu, W. S. (2003). Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of lily grey mould (*Botrytis elliptica*). *Journal of Phytopathology*, *151*(1), 13–18. https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00669.x

Chun, J., & Sook, K. (2000). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* nucleotide sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, *78*, 123–127.

Corwin, J. A., Subedy, A., Eshbaugh, R., & Kliebenstein, D. J. (2016). Expansive Phenotypic Landscape of *Botrytis cinerea* Shows Differential Contribution of Genetic Diversity and Plasticity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *29*(4), 287–298. https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0196-R

Davila, L. (2015). Diseño y Evaluación de un prototipo de formulación a base de levaduras antagonistas para el biocontrol de Botrytis en *Rosa sp.* Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from http://bdigital.unal.edu.co/54765/1/1014229464.2016.pdf

Dean, R., Kan, J., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K., Pietro, A., Spanu, P. D., … Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X

DeMiccolis, R., Pollastro, S., & Faretra, F. (2016). Genetics of *Botrytis.* In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 35–48). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0

Dheepa, R., Vinodkumar, S., Renukadevi, P., & Nakkeeran, S. (2016). Phenotypic and molecular characterization of chrysanthemum white rust pathogen *Puccinia horiana* (Henn) and the effect of liquid based formulation of *Bacillus* spp. for the management of chrysanthemum white rust under protected cultivation. *Biological Control*, *103*, 172–186. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.006

Díaz-García, A., García-Riaño, J., & Zapata-Narvaez, J. (2015). Improvement of Sporulation Conditions of a New Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in Liquid Fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *06*(04), 302–310. https://doi.org/10.4236/abb.2015.64029

Diaz, A., Gomez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., … Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. In A. Cotes (Ed.), *Control Biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros Vol 2* (pp. 632–682). Mosquera, Colombia: Corporación de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

Dik, A., & Webben, J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* disease in greenhouses. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 319–333). The Netherlands: Springer.

Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, *65*(3), 312–321. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012

Droby, S., & Lichter, A. (2007). Post harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 349–359). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3

Dunlap, C. A., Kim, S. J., Kwon, S. W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus, Bacillus amyloliquefaciens* subsp. Plantarum and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(3), 1212–1217. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858

Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(6), 665–703. https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5

Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, *102*(8), 719–732. https://doi.org/10.1007/BF01877146

Elad, Y. (2016). Cultural and Integrated control of *Botrytis.* In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp.

149–160). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0

Elad, Y., Pertot, I., Cotes, A., & Stewart, A. (2016). Plant hosts of *Botrytis* spp. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (Springer, pp. 413–486). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0

Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JAN), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022

Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., … Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, *16*(2), 177–187. https://doi.org/10.1111/mpp.12170

Fekete, É., Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa, L., Árnyasi, M., Asadollahi, M., & Sándor, E. (2012). Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiological Research*, *167*(5), 283–291. https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.006

Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. *Science*, *341*(6147), 752–758. https://doi.org/10.1126/science.1236281

Fernández-Ortuño, D., Chen, F., & Schnabel, G. (2012). Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in the Carolinas. *Plant Disease*, *96*(8), 1198–1203. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1049-RE

Figueroa, C., & Garcia, C. (2002). Aislamiento e identificación de *Botrytis* sp en áreas de invernadero y pos cosecha en un cultivo de rosas de la Sabana de Bogotá mediante empleo de placas petrifilm. Pontificia Universidad Javeriana.

Fillinger, S., & Walker, A.-S. (2016). Chemical control and resistance management diseases. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 189–209). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0

Fukumori, Y., Nakajima, M., & Akutsu, K. (2004). Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea. Journal of General Plant Pathology*, *70*(5), 256–260. https://doi.org/10.1007/s10327-004-0124-9

Gantiva, D., & Uribe, D. (2014). Bacilos aerobios formadores de endosporas como biocontroladores de Botrytis cinerea en rosas Diana Gantiva-Díaz, 1–20.

Garcia, R. (2008). Selección de levaduras habitantes de la filosfera de mora con potencial biocontrolador de *Botrytis cinerea* y caracterización ecofisiológica de las mismas. Universidad Nacional de Colombia.

Gleason, M., & Helland, S. (2003). *Encyclopedia of Rose Science*. (E. L. A. Press, Ed.).

Gómez, T. (2013). Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosa en la Sabana de Bogotá. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/44422/

Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Abadias, M., & Teixidó, N. (2017). Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. *BioControl*, *62*(4), 545–555. https://doi.org/10.1007/s10526-017-9802-3

Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X., Peres, N. A., Smith, P., & Schnabel, G. (2014). Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry. *Phytopathology*, *104*(4), 396–402. https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0156-R

Grijalba, E., Gomez, M., & Zuluaga, M. (2014). Compatibilidad in vitro de Isaria fumosorosea (Wize) Brown y Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) con plaguicidas comerciales. *Acta Agronomica*, *63*(1), 48–54.

Gutierrez-Monsalve, Jaime A.Mosquera, S., Mira, J. J., Villegas-Escobar, V., & González-Jaramillo, L. M. (2015). Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture. *Biological Control*, *87*, 39–46. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.012

Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J., & Deschamps, A. (2016). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, *55*(3), 301–322. https://doi.org/10.14601/Phytopathol

Hamdache, A., Ezziyyani, M., & Lamarti, A. (2018). Effect of preventive and simultaneous inoculations of *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) strains on conidial germination of Botrytis cinerea Pers.:Fr. *Anales de Biología*, *40*, 65–72. https://doi.org/10.6018/analesbio.40.08

Harwood, C. R., & Wipat, A. (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*, *389*, 84–87. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/0014579396005248/1-s2.0-0014579396005248-main.pdf?_tid=e9b00f4b-5f61-490f-8472-65dad57dd89d&acdnat=1523140315_2215df147e2243a63189a2d1437b2078

Hathout, Y., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Demirev, P., & Fenselau, C. (2000). Kurstakins: A new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Natural Products*, *63*(11), 1492–1496. https://doi.org/10.1021/np000169q

Holtz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The Ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 9–24). Springer.

Huang, H. C., & Erickson, R. S. (2005). Control of Lentil Seedling Blight Caused by *Botrytis cinerea* Using Microbial Seed treatments. *Plant Pathology*, 35–40.

Huynh-Ba, K. (2008). *Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies and best practices*. *Springer*. New York: Springer Science+Business Media Dordrecht.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2011). Resolución 698 de 2011. *Por Medio de La Cual Se Establecen Los Requisitos Para El Registro de Departamentos Técnicos de Ensayos de Eficacia, Productores e Importadores de Bioinsumos de Uso Agrícola y Se Dictan Otras Disposiciones*. Retrieved from https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx

Kanetis, L., & Christodoulou, S. (2017). Fungicide resistance profile and genetic structure of *Botrytis cinerea* from greenhouse crops in Cyprus, 527–540. https://doi.org/10.1007/s10658-016-1020-9

Kanjanamaneesathian, M., Wiwattanapatapee, R., Rotniam, W., & Wongpetkhiew, W. (2014). Spraying hydroponic lettuce roots with a suspension concentrate formulation of Bacillus velezensis to suppress root rot disease and promote plant growth. *New Zealand Plant Protection*, *67*(Kanghae 2010), 213–219.

Kim, H. J., Lee, S. H., Kim, C. S., Lim, E. K., Choi, K. H., Kong, H. G., … Moon, B. J. (2007). Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(3), 438–444.

Knowles, D. . (1998). *Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations Edited by*. (D. . Knowles, Ed.). Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers.

Köhl, J., Nicot, P., Blum, B., Postma, J., & Ruocco, M. (2010). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, *57*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.12.004

Kolodziej, B. J., & Slepecky, R. a. (1964). Trace Metal Requirements for Sporulation of *Bacillus Megaterium*1. *Journal of Bacteriology*, *88*(4), 821–830.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., & Kapoor, R. (2014). Analyses of genetic and pathogenic variability among Botrytis cinerea isolates. *Microbiological Research*, *169*(11), 862–872. https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.012

Lalloo, R., Maharajh, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(2), 499–508. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2294-z

Lane, D. L. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrand & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 115–117). New York: Wiley.

Lee, J. P., Ju, H., Son, J. H., Lee, S.-W., Moon, B. J., Jung, S. J., … Kim, C. S. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato

gray mold caused by *Botrytis cinerea. Biological Control*, *37*(3), 329–337. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.01.001

Lee, S. C., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y., & Choi, Y. L. (2007). Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, *188*(4), 307–312. https://doi.org/10.1007/s00203-007-0250-9

Leroch, M., Kretschmer, M., & Hahn, M. (2011). Fungicide resistance phenotypes of botrytis cinerea isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*, *159*(1), 63–65. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01719.x

Lim, J. H., & Kim, S. D. (2010). Biocontrol of phytophthora blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and B. licheniformis K11 formulations. *Journal of Applied Biological Chemistry*, *53*(6), 766–773. https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.116

Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., … Kim, J. C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, *33*(5), 488–498. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073

Liu, J. F., Yang, J., Yang, S. Z., Ye, R. Q., & Mu, B. Z. (2012). Effects of different amino acids in culture media on surfactin variants produced by *Bacillus subtilis* TD7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(8), 2091–2100. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9636-5

Liu, K., McInroy, J. A., Kloepper, J. W., Hu, C.-H., & Newman, M. (2017). Selection and Assessment of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Biological Control of Multiple Plant Diseases. *Phytopathology*, *107*(8), 928–936. https://doi.org/10.1094/phyto-02-17-0051-r

López Ortega, M. del P. (2012). Control Biológico de *Botrytis* sp. mediante levaduras filosféricas en rosas de corte tipo exportación, 111 p.

Luz, C., & Batagin, I. (2005). Potential of oil-based formulations of Beauveria bassiana to control Triatoma infestans. *Mycopathologia*, *160*(1), 51–62. https://doi.org/10.1007/s11046-005-0210-3

Maachia, B., Rafik, E., Nandal, P., Mohapatra, T., & Bernard, P. (2015). Biological control of the grapevine diseases “grey mold” and powdery mildew by *Bacillus* B27 and B29 strains. *Indian Journal of Experimental Biology*, *53*, 109–115.

MADR. (2018). *Cadena de Flores y Follajes*. Retrieved from https://sioc.minagricultura.gov.co/Flores/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/002 - Cifras Sectoriales - 2018 Febrero Flores.pdf

Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biological Control*, *54*(2), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.04.004

Manjula, K., & Podile, A. R. (2001). Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*(7), 618–625. https://doi.org/10.1139/cjm-47-7-618

Marcus, M. (2009). Perspectives and challenges for biopesticide industry. In *4th Annual Biocontrol Industry Meeting*. Lucerne, Switzerland.

Martínez-Absalón, S., Rojas-Solís, D., Hernández-León, R., Prieto-Barajas, C., Orozco-Mosqueda, M. del C., Peña-Cabriales, J. J., … Santoyo, G. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen Botrytis cinerea. *Biocontrol Science and Technology*, *24*(12), 1349–1362. https://doi.org/10.1080/09583157.2014.940846

Mbarga, J. B., Begoude, B. A. D., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., Schiffers, B., … Hoopen, G. M. te. (2014). A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya. Biological Control*, *77*, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.06.004

Medina, C. M., Cristancho, D., & Uribe, D. (2009). Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filosféricos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (Rubus glaucus). *Acta Biol. Colomb.*, *14*(3), 181–198.

Michereff, F., de Faria, M., S, W., & Silva, K. (2009). *Micoinseticidas emicoacaricidas no Brasil: Como estamos apos quatro decadas?*

Mischra, J., & Arora, N. (2016). Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach. In N. Arora, S. Mehnaz, & B. R (Eds.), *Bioformulations for sustainable agriculture* (Springer, pp. 7–20).

Monteiro, S.M.S, Clemente j.j, Carrondo, T., Cunha, A. E. (2014). Enhanced spore production of *Bacillus subtillis* grow in a chemically defined medium. *Advances in Microbiology*, (June), 444–454. https://doi.org/10.4236/aim.2014.48049

Monteiro, S. M., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J., & Cunha, A. E. (2005). A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis. Biotechnology Progress*, *21*(4), 1026–1031. https://doi.org/10.1021/bp050062z

Montero, H., & Quintero, J. (2010). *Guía de buenas prácticas ambientales para cultivos de flores ornamentales*. ASOCOLFLORES y MAVDT.

Nicot, P., Stewart, A., Bardin, M., & Elad, Y. (2016). Biological control and biopesticide suppression of *Botrytis* - incited diseases. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 165–181). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0

Nita, P., Pallavi, G., Shubhangi, S., Hemlata, S., Neha, P., & Balasaheb, K. (2012). Liquid formulations of *Acetobacter diazotrophicus* L1 and *Herbaspirillum seropedicae* J24 and their field trials on wheat. *International Journal of Environmental Sciences*, *3*(3), 1116–1129. https://doi.org/10.6088/ijes.2012030133019

Odile, C. (2016). Epidemiology and aerobiology of *Botrytis* spp. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 127–148). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371

Pedraza, L. A. (2015). Evaluación de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) de suelos rizosféricos , como agentes de control biológico de Burkholderia glumae Evaluación de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) de suelos rizosféricos , como agentes d, 129.

Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(6), 579–586. https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001

Plesken, C., Weber, R. W. S., Rupp, S., Leroch, M., & Hahn, M. (2015). *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7048–7056. https://doi.org/10.1128/AEM.01719-15

Posada-Uribe, L. F., Romero-Tabarez, M., & Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*(10), 1879–1888. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1

Pretorius, D., van Rooyen, J., & Clarke, K. G. (2015). Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnology*, *32*(2), 243–252. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.12.003

Ramyabharathi, S. A., & Rajendran, L. (2016). Liquid formulation of endophytic *Bacillus* and its standardization for the management of Fusarium wilt in tomato, (June).

Rao, Y. K., Tsay, K. J., Wu, W. S., & Tzeng, Y. M. (2007). Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, *42*(4), 535–541. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.007

Rasiukevičiūtė, N., Rugienius, R., & Šikšnianienė, J. B. (2018). Genetic diversity of *Botrytis cinerea* from strawberry in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*, *105*(3), 265–270. https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.034

Ravensberg, W. (2011). A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthopods. *Springer* (Vol. 91). Dordrecht, Holanda: Springe Science and Business Media.

Ren, H., Su, Y. ting, & Guo, X. hua. (2018). Rapid optimization of spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged cultures based on dipicolinic acid fluorimetry assay. *AMB Express*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/s13568-018-0555-x

Restrepo, F. (2010). Manual de manejo de *Botrytis cinerea* en rosas. (R. Lee, Ed.). Bogotá, Colombia: Ceniflores.

Rivera, D., Obando, M., Barbosa, H., Tapias, D. R., & Buitrago, R. B. (2014). Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the Rhizobium-

Cowpea interaction. *Universitas Scientiarum*, *19*(3), 265–275. https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-3.eplr

Rivera, H. (2014). Desarrollo y evaluación de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras contra *Botrytis cinerea* en rosas. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from http://bdigital.unal.edu.co/48498/1/2635143.2014

Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (Eds.). (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients: Pharmaceutical Excipients*. *American Pharmacists Association* (Sixth Edit). London: Pharmaceutical Press. https://doi.org/10.1007/978-1-908517-43-2

Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2017). Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in german horticulture. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JAN), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406–425. https://doi.org/https://doi.org/citeulikearticle-id:93683

Sanchez, F. (2012). Evaluación de la actividad antagonista de Bacilos Aerobios Formadores de Endospora como biocontrolador contra *Burkholderia glumae*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Santos, A., García, M., Cotes, A. M., & Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micologia*, *29*(3), 150–156. https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.11.002

Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases. *Phytopathology*, *94*(11), 1267–1271. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267

Shrestha, R. K., Burdman, S., Sikorski, J., Eckshtain-Levi, N., Kopelowitz, J., Zelinger, E., … Rosenberg, T. (2013). Phenotypic Variation in the Plant Pathogenic Bacterium Acidovorax citrulli. *PLoS ONE*, *8*(9), e73189. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073189

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JAN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087

Singleton, P., Keyser, H., & Sande, E. (2002). Development and evaluation of liquid inoculants. *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*, (January 2002), 52–66. Retrieved from http://aciar.gov.au/files/node/2110/pr109echapter07.pdf

Soe, K. T., & de Costa, D. M. (2012). Development of a spore-based formulation of microbial pesticides for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*, *22*(6), 633–657. https://doi.org/10.1080/09583157.2012.676025

Solanki, M. K., Srivastava, Alok K.Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, S., Singh, R. K.,

Pandey, A. K., & Arora, D. K. (2012). Diversity and antagonistic potential of *Bacillus* spp. associated to the rhizosphere of tomato for the management of Rhizoctonia solani. *Biocontrol Science and Technology*, *22*(2), 203–217. https://doi.org/10.1080/09583157.2011.649713

Srinivasan, K., & Mathivanan, N. (2009). Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. *Biological Control*, *51*(3), 395–402. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.013

Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(4), 579–606. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x

Stirling, D. (2003). DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In B. JM & D. Stirling (Eds.), *PCR Protocols* (p. 53,54). Humana Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:53

Suresh, P., e, Mamta, S., G, K. K., L, S., & U, N. M. (2010). Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from chickpea: DNA polymorphisms, cultural, morphological and virulence characteristics. *African Journal of Biotechnology*, *9*(46), 7961–7967. https://doi.org/10.5897/AJB10.1361

Tadros, T. (2013). Suspension Concentrates. In *Encyclopedia of colloid and interface science* (p. 1334). Springer Berlin Heidelberg.

Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M. V., & González-López, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, *270*(1), 223–232. https://doi.org/10.1007/s11104-004-1522-7

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 4876–4882. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876

Tomlinson, J. A., Dickinson, M. J., & Boonham, N. (2010). Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*, *51*(6), 650–657. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02949.x

Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315

TRADE MAP. (2018). Retrieved December 8, 2018, from https://www.trademap.org/Index.aspx

Tzeng, Y. M., Rao, Y. K., Tsay, K. J., & Wu, W. S. (2008). Effect of cultivation conditions on spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 and its antagonism to *Botrytis elliptica*. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(5), 1275–1282. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03683.x

Villarreal Solano, Y. L. (2013). Estudio de estabilidad para la selección de una formulación de un producto probiótico. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/39572/

Walker, A.-S. (2016). Diversity within and between species of *Botrytis*. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 91–120). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0

Weisskopf, L. (2013). The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytophathogenic fungi. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 1352–1363.

White, T., Bruns, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, & J. Sninsky (Eds.), *PCR Protocols. A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego: Academic Press.

Winder, R. S., Wheeler, J. J., Conder, N., Otvos, I. S., Nevill, R., & Duan, L. (2003). Microencapsulation: A strategy for formulation of inoculum. *Biocontrol Science and Technology*, *13*(2), 155–169. https://doi.org/10.1080/09583150210000073439

Yadav, A. K., & Chandra, K. (2014). Mass Production and Quality Control of Microbial Inoculants. *Proceedings Indian Natural Science Academy*, (2), 483–489. https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/5

Yánez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, *60*(3), 280–289. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001

Yin, Y. N., Kim, Y. K., & Xiao, C. L. (2011). Molecular Characterization of Boscalid Resistance in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Phytopathology*, *101*(8), 986–995. https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0016

Zapata, Y., Díaz, A., Grijalba, E., Rodríguez, F., Elad, Y., & Cotes, A. M. (2016). Phyllosphere yeasts with potential for biological control of *Botrytis cinerea* in rose. *Acta Horticulturae*, *1144*, 77–83. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.11

Zhao, X., Han, Y., Tan, X. qian, Wang, J., & Zhou, Z. jiang. (2014). Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *Journal of Microbiology*, *52*(4), 324–332. https://doi.org/10.1007/s12275-014-3354-3