



U N I V E R S I D A D
**AUTÓNOMA
DE ICA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ICA
FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
ACTIVIDAD ANTAGONISTA Y PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES ANTIFÚNGICOS DE LEVADURAS Y
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS FRENTE A TRES CEPAS
FITOPATÓGENAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN LA
AGRICULTURA PERUANA

PRESENTADO POR:
HANNA CÁCERES YPARRAGUIRRE
CÓDIGO ORCID: 0000-0001-5040-8950

CHINCHA, 2022

I. Datos de identificación del proyecto

1.1. Datos del proyecto

Título del Proyecto

Actividad antagonista y producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos de levaduras y bacterias ácido lácticas frente a tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

Línea de investigación

Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible

Localización

Laboratorio de Microbiología.

Tipo de proyecto

Investigación aplicada

Área: Transversal

1.2. Datos de los investigadores

Hanna Cáceres Yparraguirre

N° Orcid: 0000-0001-5040-8950

1.3. Resumen

Botrytis cinerea conocido como podredumbre gris o moho gris, genera necrosis en los tejidos que infecta en una amplia variedad de huéspedes. *Lasiodiplodia theobromae* es un hongo necrótrofo que ocasiona importantes daños en diversidad de cultivos de importancia económica, incluso puede causar la muerte de plantas. Está asociado especialmente a plantas estresadas por otros factores abióticos y bióticos (Moreira-Morrillo et al., 2021). El género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se

encuentran en un amplio rango de materiales y productos; como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, producen micotoxinas; al mismo tiempo, como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados (Flores-Bazauri et al., 2015). Las levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) son una alternativa para el control de enfermedades causadas por estos hongos. El presente trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad antagonista y de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana. Se realizará enfrentamiento de 13 cepas de levaduras y 7 BAL a los tres fitopatógenos durante siete días de cultivo para evaluar la actividad antagonista de las cepas en estudio. A través de este proyecto, participarán estudiantes de la Red de Investigadores Estudiantiles de la UAI, que fortalecerán conocimientos en la temática propuesta. La temática de este proyecto está alineada con los objetivos y retos planteados en el proyecto financiado por PRO-INNOVATE, PIMEN-16-P-814-183-20 "MEJORA DE LA CALIDAD Y MAYOR VIDA ÚTIL DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LEVADURAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN CONTROLADA", donde la UAI participa como entidad colaboradora.

II. Descripción del proyecto

2.1. Planteamiento del Problema de Investigación

2.1.1. Situación problemática

El control de plagas en cultivos hortícolas, ha sido manejado generalmente mediante el uso de plaguicidas químicos. Su uso constante ha causado varios problemas como contaminación ambiental, residuos en alimentos, desarrollo de resistencia a los fungicidas sintéticos por los patógenos y la pérdida de la biodiversidad natural en los agroecosistemas (Harris et al., 2001;

Fisher et al., 2012). Esta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de estas plagas de manera sustentable, es decir económicamente viable, con respeto al medio ambiente y no afecte la salud de las personas que aplican estos productos y los que consumen el producto final.

Una alternativa al control químico de hongos fitopatógenos es su supresión por el uso de agentes de control biológico con énfasis en el uso de antagonistas nativos (Zeilinger and Omann, 2007; Vinale et al., 2008). Se ha considerado la posibilidad de controlar patógenos por el uso de varios microorganismos con actividad antagonista tales como hongos, bacterias y actinomicetos. Sin embargo, es importante conocer la actividad antifúngica de algunas levaduras y de las BAL.

2.1.2. Formulación del problema

Problema general

¿Cuál es la capacidad antagonista y de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?

Problemas específicos

PE1: ¿Cuál es la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?

PE2: ¿Cuál es la capacidad de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas

fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?

2.1.3. Justificación

El departamento de Ica, es una región dedicada a la agricultura local y de exportación que se caracteriza por cultivar uvas, paltas, espárragos, arándanos, entre otros cultivos. En general en nuestro país se cultivan diversos productos que son atacados por diversas plagas que afectan la calidad y rendimiento de los mismos. Para su control se utiliza con mayor frecuencia plaguicidas de origen sintético que vienen causando diversos daños al agroecosistema.

El uso de los bioplaguicidas es importante para la sostenibilidad agrícola, permitiendo buenos rendimientos y obteniéndose materia prima sin plaguicidas sintéticos que pongan en riesgo la salud de las personas.

Poder conocer la capacidad antagonista de las 13 cepas de levaduras de diferentes géneros y de las 7 cepas de BAL de diferentes géneros será importante para poder tener más alternativas de control biológico que permitan alternar las aplicaciones en los campos de cultivo. Así, también puede ser punto de partida para el inicio de nuevas formulaciones de bioplaguicidas con cepas de nuevos géneros de microorganismos.

2.1.4. Objetivos (General y específicos)

OG: Determinar la capacidad antagonista y de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

OE1 Determinar la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

OE2 Determinar la capacidad de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

1.1.1. Limitaciones

El presente trabajo abarcará en determinar la capacidad antagonista y la producción de COV antifúngicos a partir de levaduras y bacterias ácido lácticas reconocidas en el marco teórico como antagonistas a fitopatógenos. Las cepas fitopatógenas de importancia económica elegidas para la investigación serán *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromare* y *Alternaria sp.*, estos fitopatógenos atacan a diversos cultivos presentes en la agricultura peruana y que tienen importantes áreas de cultivo. Se realizará la investigación en laboratorio y se subcontratará servicios externos de identificación molecular, servicio de identificación de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos, antibióticos y enzimas. La investigación se realizará por un período de 9 meses.

1.2. Marco teórico

1.2.1. Antecedentes del problema

Kumar et al., (2016). Investigaron a *Enterococcus* sp. BS13 un aislado potencial obtenido de suelo rizosférico de *Vigna mungo* (frijol negro), el cual tuvo actividad biosurfactante con similitud de los biosurfactantes de tipo glicolípido y además este microorganismo mostró la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y la actividad antagónica contra el fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Hadi y Zuheir (2016). Determinaron la actividad antifúngica *in vitro* de BAL (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus* sp. n.º 1, *Lactobacillus* sp.n.º 2 y *Lactococcus* sp.) contra *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum* y *Alternaria* sp. Todas las BAL tuvieron una inhibición significativamente alta ($P < 0.05$) en agar MRS que en agar PDA a 37 °C durante 5 días.

Liu, et al., (2017). Evaluaron 216 cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del vino para controlar el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, un agente causante de la antracnosis de la uva antes de la cosecha. Tres de las cepas dieron positivo para antagonizar al fitopatógeno y se evaluaron más a fondo sus mecanismos como agentes de control biológico ACB. Los resultados mostraron que los tres aislamientos de *S. cerevisiae* produjeron compuestos antifúngicos, inhibieron la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* y produjo β -1,3-glucanasa y quitinasa. Todos los aislamientos colonizaron frutos de uva en grandes cantidades y controlaron *C. gloeosporioides* cuando se inocularon artificialmente en frutos de uva. La aplicación del aislado GA8 dio como resultado una reducción del 69,7 % de la enfermedad por *C. gloeosporioides* en bayas de uva.

Jaibangyang et al., (2020). Evaluaron 366 cepas de levaduras antagónicas (epífitas y endófitas) aisladas de hojas de arroz, caña de azúcar y maíz de Tailandia, que son potencialmente capaces de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) activos contra el hongo productor de aflatoxinas *Aspergillus flavus*.A39 Solo 49 cepas de levaduras pudieron producir COV antifúngicos. *Candida nivariensis* DMKU-CE18 fue la cepa de levadura más eficaz para inhibir el crecimiento del micelio ($64,9 \pm 7,0\%$ de inhibición), para inhibir la germinación de conidios ($49,3 \pm 3,3\%$) de *A. flavus* A39 y para reducir la producción de aflatoxinas ($74,8 \pm 6,5 \%$) en granos de maíz. El COV principal producido por esta cepa de levadura era el más cercano al 1-pentanol.

Zabouri, et al., (2021). Investigaron 45 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda de cabra, vaca y camello de varias regiones de Argelia, las cuales fueron probadas para actividad antifúngica contra cinco cepas de la especie fúngica fitopatógena, toxígena y deteriorante *Alternaria alternata*, aisladas de los tallos, hojas, raíces y frutos de tomates y zanahorias. Dos cepas de BAL, identificadas como *Enterococcus lactis* y *E. faecium*, tuvieron la mayor actividad antifúngica, lo que sugiere una posible aplicación en tecnología alimentaria como bioconservantes contra hongos fitopatógenos y que deterioran los alimentos.

1.2.2. Bases teóricas o marco conceptual

La erradicación del hambre y la pobreza, enfocar la agricultura convencional a una agricultura sustentable, asegurar una vida saludable y trabajo digno para todos, reducir la diferencia social y fomentar el desarrollo económico son los acuerdos aceptados por la comunidad internacional en base a la Agenda 2030 para el

Desarrollo Sostenible. A finales del siglo XX, se realizaron transformaciones agrícolas que se enfocaron en la utilización de enormes cuantías de insumos externos, generalmente de procedencia sintética.

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se consideran antagonistas naturales de diversos microorganismos patógenos presentes en los alimentos (vegetales, granos almacenados), gracias a la producción de una gran cantidad de compuestos con propiedades antifúngicas. Son bacterias grampositivas y muy exigentes. Su crecimiento, contribuyen a la fermentación y degradación de los azúcares de la leche y presentan efectos antagónicos que impiden la proliferación de otras bacterias Gram positivas y otros microorganismos. Su característica principal es la fermentación de la glucosa convirtiéndolo en ácido láctico (Klander, 1983; Hayek Ibrahim, 2013 citado por Smaniotto et al., 2018)

Levaduras

En la actualidad, el uso de las levaduras en la producción de alimentos y bebidas es muy amplio de los que se conoce para la producción pan, la cerveza y la producción de vino. Algunas levaduras presentan un fuerte control antifúngico que facilita su uso como controladores del deterioro de alimentos (Vásquez et al., 2016). Las características antagónicas de las levaduras se han atribuido a mecanismos como la competencia por los nutrientes, secreción de compuestos antifúngicos, como asesino de toxinas, producción de enzimas hidrolíticas, producción de sideróforos, y producción de compuestos orgánicos volátiles (Jaibangyang et al., 2019).

Antagonismo

El antagonismo es un proceso natural entre comunidades microbianas y se caracteriza por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra (Pérez et al., 2014). Existen diversos mecanismos de acción empleados por los microorganismos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, entre ellos antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Larrea, 2001).

Mecanismo de interacción directa con el patógeno En este se puede presentar el parasitismo, el cual consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista.

Bioplaguicidas

Se dividen en dos grandes grupos: plaguicidas microbianos, que incluyen las bacterias, hongos, virus y protozoos, y plaguicidas bioquímicos, que están incluidos los atrayentes, hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química, muy importantes en la relación planta- insecto. Estos, son altamente específicos contra las plagas y representan un mínimo riesgo para las personas o el medio ambiente. (Alfonso, 2002 citado por Nava-Pérez, 2012).

Compuestos orgánicos volátiles

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) son un amplio grupo de productos químicos basados en carbón con bajos pesos moleculares y alta presión de vapor que se disipan rápidamente en el ambiente, generados a partir de actividades

industriales y como resultado del metabolismo secundario de distintos microorganismos. Dichos compuestos pueden ser alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, terpenos y aromáticos, por mencionar algunos (Bennett e Inamdar, 2015 citado por Vázquez-Gómez, 2019)

1.3. Hipótesis y variables

1.3.1. Formulación de hipótesis

Hipótesis General

Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista, producen COV antifúngicos e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%.

HE1: Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%.

HE2: Las levaduras y las bacterias ácido lácticas producen COV antifúngicos frente a tres cepas fitopatógenas mayor a 70%.

1.3.2. Variables y definición conceptual y operacional

Variable: parámetros que se evalúan para determinar el efecto antifúngico de las cepas de levaduras y las cepas de BAL contra los fitopatógenos

Variable dependiente (X):

- Fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Porcentaje de inhibición del crecimiento

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

- Fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*

Porcentaje de inhibición del crecimiento

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

- Fitopatógeno *Alternaria* sp.

Porcentaje de inhibición del crecimiento

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

Variable independiente (Y):

13 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL.

Definición conceptual:

Porcentaje de inhibición del crecimiento. – Consiste en medir el crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del microorganismo antagonista (levaduras y BAL) que impide que se desarrolle por acción de antibióticos, enzimas o competencia.

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios. – Consiste en observar y medir el crecimiento de las estructuras reproductivas del hongo fitopatógeno en presencia del microorganismo antagonista (levaduras y BAL) que impide que se desarrolle por acción de antibióticos, enzimas o competencia.

Definición operacional:

Porcentaje de inhibición del crecimiento. - La inhibición del crecimiento se mide en todos los tratamientos al tercer día, aun cuando en algunos casos el antagonista se encuentre distante del patógeno a través de la antibiosis, mecanismo de acción característico para estas especies de biocontroladores, que se manifiesta por la asociación entre organismos o entre un organismo y un producto metabólico de otro organismo, que resulta perjudicial para uno de ellos (Benitez et al., 2004).

Porcentaje de inhibición de germinación. – La inhibición de la germinación de conidios de los hongos fitopatógenos se mide a las 2, 4, 6, 8 horas a 28 ± 3 °C. Posteriormente con la ayuda de un microscopio se cuantificará los conidios germinados, se considerarán 100 conidios al azar, de cada concentración se realizarán tres repeticiones (Flores et al., 2014).

1.4. Metodología del proyecto

1.4.1. Diseño metodológico

Sitio experimental

Las pruebas de antagonismo para las tres cepas fitopatógena *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Alternaria sp.* se realizará en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Ica, ubicado en el distrito de Chíncha Alta, provincia de Chíncha y departamento de Ica. Alternadamente se realizará en el CITEagroindustrial – Ica (segunda institución que colabora en el proyecto PIMEN). Las pruebas para determinar los compuestos orgánicos volátiles, enzimas líticas y antibióticos e identificación molecular de las cepas fitopatógenas se realizarán en laboratorios externos ya que en la UAI no se cuenta con ese equipamiento.

Muestras biológicas

Los aislados de las 13 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL, serán obtenidas de un Banco de Germoplasma de Cepas Comercial aisladas de diferentes alimentos (uva, vino, leche, yogurt, entre otros). Previo a este trabajo se realizó otra investigación que permitió aislar cepas de *B. cinerea*, *L. theobromae* y *Alternaria sp.* provenientes de campos de cultivo de vid.

Medios de cultivo

Se utilizará el medio De Man Rogosa y Sharpe (MRS) en sólido y en caldo para el crecimiento y enfrentamiento de las BAL, medio Glucosa-Peptona-Levadura (GPY) para el crecimiento de las levaduras y agar papa dextrosa Agar (PDA) para reactivar las cepas de hongos fitopatógenos. Estos medios de cultivo se prepararán según las indicaciones del fabricante, añadiendo agua destilada a la cantidad recomendada del polvo del medio deshidratado y se esterilizaron (121 °C y 1 atm, 20 min) (Rojas et al., 2016).

Se emplearán 13 cepas de levaduras (L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07, L08, L09, L10, L11 y L12) y 7 cepas de BAL (BAL01, BAL02, BAL03, BAL04, BAL05, BAL06 y BAL07).

Ensayo para determinar la capacidad antagonista

Se determinará por medio de la técnica de confrontación dual entre los microorganismos antagonistas (13 levaduras y 7 BAL) y los tres fitopatógenos (*B. cinerea*, *L. theobromae* y *Alternaria sp.*).

Se sembrará en una placa Petri de GPY (9 cm de diámetro) a aproximadamente 2 cm de distancia desde el borde de la placa una línea recta de cada cepa de levadura en estudio, y en medio MRS se sembrará cada cepa de BAL. Luego, se colocará un disco de 5

mm de diámetro de cada especie de hongo fitopatógeno que ha crecido previamente en medio de PDA de 5 días de edad a la distancia de 5 cm de la levadura o bacteria. Se usaron como control placas únicamente con especies de hongos fitopatógenos. Las placas Petri se incubarán a 28 °C durante siete días y se observarán diariamente para evaluar el crecimiento del micelio del patógeno. Cada aislado de levadura y bacteria se analizarán 25 veces (repeticiones). El diámetro de la colonia se determinará siete días después de la inoculación y se calculará el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula de Mari et al. 1996 citado por Kasfi et al., 2018:

$$R(\%) = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Donde:

R es el porcentaje de hifas radiales inhibidoras de crecimiento,

R1 es el crecimiento de hifas del control, y

R2 el crecimiento de hifas en la placa Petri inoculada con aislados de levaduras o bacterias.

Ensayo para determinar la germinación de esporas

Las cepas de levadura se cultivarán en caldo GPY a 28 °C a 150 rpm durante 24 horas.

Se utilizará la técnica de cultivo en portaobjetos, para ello se tomará una bola de algodón, la cual se colocará en el centro de una placa Petri y encima de esta se colocará un portaobjetos de vidrio. Se humedecerá el algodón con 5 mL de agua estéril.

Se obtendrá un cubo de 5mm de PDA y se colocará en el centro del portaobjetos. Enseguida en el portaobjeto se colocará esporas de hongos en los cuatro lados del cuadrado de PDA con ayuda de una aguja (previamente las esporas de hongos han crecido en PDA a 28°C y tendrán 7 días de edad). Se colocará una lámina cubre objetos estéril en la superficie superior del cubo de agar, luego la

placa Petri se tapará y sellará con Parafilm. La placa Petri control se realizará sin inoculación de levadura. Se realizará tres repeticiones y la inhibición de la germinación se evaluará después de la incubación a 28°C durante 21 horas (Zhou et al. 2018 citado por Jaibangyang, et al., 2020).

Por tratamiento se evaluarán 100 conidios, utilizando un microscopio de luz con un aumento de 100X. Las esporas germinadas se contarán con la inhibición de germinación conidial calculada y comparada con el control, de acuerdo con Gong et al., 2015 (citado por Jaibangyang et al., 2020).

De acuerdo a las posibilidades del microscopio del laboratorio de microbiología de la UAI, se medirá la longitud del tubo germinativo y se registrará la escala de clasificación de germinación:

- 1= sin germinación;
- 2= tubo germinativo <2x tamaño del conidio;
- 3= tubo germinativo <2x a 4x tamaño del conidio;
- 4= tubo germinativo >4x tamaño del conidio

1.4.2. Diseño muestral

La muestra está compuesta de la siguiente manera:

Código	Especie	Tratamiento	Código	Género	Tratamiento
L01	Candida incommunis (MycoBank # 327439)	1	BAL01	Lactococcus lactis (ATCC 7963™)	14
L02	Candida parapsilosis (MycoBank # 253819)	2	BAL02	Enterococcus mundtii (ATCC 43186™)	15
L03	Debaryomyces hansenii (MycoBank # 296478)	3	BAL03	Lactobacillus reuteri (ATCC 23272™)	16
L04	Hanseniaspora opuntiae (MycoBank # 488270)	4	BAL04	Lactobacillus plantarum (ATCC 8014™)	17
L05	Pichia guillermoundii (MycoBank # 513463)	5	BAL05	Lactobacillus brevis (ATCC 14869™)	18
L06	Pichia membranifaciens (MycoBank # 227217)	6	BAL06	Gluconacetobacter diazotrophicus (ATCC 49037™)	19
L07	Saccharomyces ellipsoideus subsp. fulliensis (MycoBank # 263896)	7	BAL07	Gluconacetobacter liquefaciens (ATCC 14835™)	20
L08	Saccharomyces cerevisiae (MycoBank # 492348)	8			
L09	Zygosaccharomyces rouxii (MycoBank # 325702)	9			
L10	Zygosaccharomyces bailii (MycoBank # 258102)	10			
L11	Tausonia pullulans (MycoBank # 812190)	11			
L12	Kluyveromyces thermotolerans (MycoBank # 316067)	12			
L13	Torulaspora delbrueckii (MycoBank # 46720)	13			

1.4.3. Técnicas de recolección de datos

Se procederá a realizar mediciones con un vernier expresado en mm el halo de crecimiento del hongo fitopatógeno y de las cepas de levaduras y BAL.

1.4.4. Técnicas estadísticas para el procesamiento de los datos

Los tratamientos se establecerán en un diseño experimental completamente al azar con 25 repeticiones cada uno. Se tendrá 20 tratamientos en total, donde 13 corresponden a cepas de levaduras y 7 a cepas de BAL. Los datos obtenidos del porcentaje de inhibición se transformarán mediante la función del arcoseno: $y = \arcsin[\sqrt{y/100}]$. Todos los datos se someterán a un análisis de varianza, la comparación de medias se realizará mediante el método de Tukey ($p = 0.05$), usando el paquete estadístico Infostad ver. 2019 (Ruiz-Sánchez et al., 2014)

1.4.5. Aspectos éticos y regulatorios

Este proyecto de investigación cumple con los aspectos éticos y regulatorios de nuestro país.

1.5. Aspectos administrativos.

1.5.1. Cronograma

Nº	Actividades a realizar	Ejecución de la investigación institucional						
		Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7
1	Proyecto de investigación:							
2	Informe 1: Planteamiento del problema Estado del arte Metodología							
3	Informe 2: Metodología Instrumento de medición validado y confiabilizado							
4	Informe 3: Trabajo de campo: población-muestra Muestreo							

	Descripción de la recolección de la información Tabla de resultados							
5	Informe 4: Trabajo de campo: Descripción de la recolección de la información Tabla de resultados							
6	Informe 5: Análisis e interpretación de resultados Discusión de resultados							
7	Actividad 6: Artículo para la publicación en revista indexada Constancia de envío a la revista Investigación institucional y porcentaje de similitud							

1.5.2. Presupuesto

Rubros Asignados	Costo Unitario	Cantidad	Costo Total (S/.)	Actividades
Personal Administrativo				
Apoyo administrativo	930	10 meses	S/ 9,300.00	Apoyar en temas estadísticos
RECUSOS HUMANOS INVESTIGADORES				
Bonificación al docente investigador como incentivo por la realización de la investigación.	1,400.00		S/ 15,400.00	Investigador principal
RIE (por confirmar)		3		
INFRAESTRUCTURA DE LA UAI				
Laboratorio de Microbiología		X	X	Infraestructura (horas de uso de laboratorio)
Oficina		X	X	Infraestructura (horas de uso para procesamiento de datos)
EQUIPAMIENTO Y/O MATERIALES				
Materiales de escritorio complementarios	200.00	Varios	S/ 400.00	Ejecución de la investigación (2 investigaciones al año)

Adquisición de cepas de levaduras y BAL	6000.00	1	6000.00	Cepas para investigación
Paquete de materiales de vidrio y plástico	250.00	1	250.00	Preparación de medio de cultivo
Paquete de medios de cultivo	250.00	1	250.00	Preparación de medio de cultivo
Paquete de reactivos	200.00	1	200.00	Preparación de medio de cultivo
Paquete de insumos varios	200.00	1	200.00	Preparación de medio de cultivo
SERVICIOS				
Servicio de identificación de compuestos orgánicos volátiles, enzimas, antibióticos (que producen las mejores levaduras y BAL)	4000	2	S/ 8,000.00	Identificación de compuestos importantes que controlan plagas
Servicio de identificación molecular de cepas fitopatógenas	250.00	8	S/ 2,000.00	
Servicio de liofilización de cepas de levaduras y BAL	1000	1	S/ 1,000.00	Conservación por largo tiempo
PUBLICACIONES INDEXADAS				
Traducción de artículo científico			S/ 3,000.00	Ingles técnico
Derechos para publicación de artículo científico			S/ 10,000.00	Revista indexada de alto impacto (2 articulos)
Inscripción y participación en Congreso Arbitrado			S/ 2,500.00	
IMPREVISTOS			S/ 8,400.00	
TOTAL			S/ 60,000.00	

1.6. Fuentes de financiamiento

Esta investigación será financiada con recursos propios de la Universidad Autónoma de Ica.

1.7. Resultados esperados

Al enfocarse en determinar la capacidad antagonista de las cepas de levaduras y las cepas de BAL adquiridas de un Banco de Germoplasma de Cepas y que son referenciadas por marco teórico que tienen la capacidad antagonista contra diversos patógenos, se investiga directamente para saber cuál de las cepas de levaduras y cuál de las cepas de BAL son antagonistas para tres fitopatógenos que atacan a los cultivos de importancia económica en la agricultura peruana.

De acuerdo a los resultados que se encuentren en la investigación, identificar los compuestos orgánicos volátiles antagonistas que producen las mejores cepas de levaduras y cepas de BAL. Así también identificar que antibióticos y enzimas producen qué afectan el crecimiento de los fitopatógenos.

De acuerdo a los resultados que se encuentren en la investigación, contribuir con los entregables del proyecto PIMEN-16-P-814-183-20 "MEJORA DE LA CALIDAD Y MAYOR VIDA ÚTIL DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LEVADURAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN CONTROLADA", donde la UAI participa como entidad colaboradora.

1.8. Referencias bibliográficas

- Benitez, T., Rincon, A., Limon, M., Codon, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7:249-60.
- Del Puerto Rodríguez, A., Suárez, S., Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana Higiene Epidemiológica*. 52(3):372–87.
- Flores, M., Martínez, M., Nieto, D., Rodríguez, J., Colinas, M., y Martínez, J.(2014). Reducción en la germinación in vitro de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de Brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2): 180-190.
- Flores-Bazauri, W., Chico-Ruíz, J., y Cerna-Rebaza, L. (2015). Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 35(1):34-42.
- Food and Agriculture Organization of United Nations. (2017). The state of agriculture and food [Internet]. Leveraging food systems for inclusive rural transformation. 1–178 p. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i7658s.pdf>.
- Hadi, R. and Zuheir, H. (2016). Efficiency of Lactic Acid Bacteria as biological control agents against some Fungi. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 27(2): 35-40.
- Jaibangyang, S., Nasanit, R., and Limtong, S. (2020). Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. *BioControl*, 65:377-386.
- Kasfi, K., Taheri, P., Jafarpour, B., & Tarighi, S. (2018). Characterization of antagonistic microorganisms against *Aspergillus* spp. from grapevine leaf and berry surfaces. *Journal of Plant Pathology*, 100(2), 179–190. doi:10.1007/s42161-018-0042-x
- Kumar, S., Dubey, RC., and Maheshwari, DK. (2016). Biosurfactant-Mediated Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* Causing Charcoal Rot in *Vigna mungo* by a Plant Growth Promoting *Enterococcus* sp. BS13. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7(11):1-8.
- Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, (62): 96-100. ISSN: 1016-0469
- Liu, Z., Du, S., Ren, Y, y Liu Y. Capacidad de biocontrol de levaduras asesinas (*Saccharomyces cerevisiae*) aislados del vino contra *Colletotrichum gloeosporioides* en uva. *Revista de Microbiología Básica*, 58(1): 60-67.
- Markets and Markets. 2019. Mercado de biopesticidas por tipo (bioinsecticidas, biofungicidas y bionematicidas), fuente (microbianos,

- extractos de plantas e insectos beneficiosos), modo de aplicación, formulación, aplicación de cultivos y región: pronóstico global para 2023. Revisado el 13 enero 2020. Disponible en: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html>
- Moreira-Morillo, A., Cedeño-Moreira, A., Canchgna-Martínez, F. y Garcés-Fiallos, F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa: symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4): 653-662.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J., Vásquez-Montoya, E. 2012. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura, Desarrollo Sustentable*. 2012; 8(3):17–29.
- Pérez, E., Gutiérrez, C., Báez, R., Montoya, E. 2014. Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control Biológico De Plagas. *Ra Ximhai*. 8(3):41–9.
- Pérez, R. (2012). Inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis Sativus* L.). Montecillo, Texcoco, México.
- Pillaca, E. (2019). Acción biocontroladora de tres especies de *Trichoderma* frente a *Cercospora asparagi* Sacc. en el cultivo de *Asparagus officinalis* L. (Espárrago). Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2019; Available from: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/10455>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-bautista, M., Cristóbal-Alejo, J., & Valencia-Botín, A., Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (5): 1325–1332.
- Smaniotto, F., Santos, S., Melo, I., Queiroz, S. (2018). Validación de la actividad antagonista de bacterias ácido-lácticas contra el hongo *Botrytis cinerea*. 12° Congreso Interinstitucional de Iniciación Científica – CIIC2018, Campinas, Sao Paulo, Brasil.
- Vásquez, J., Ramírez, M., y Monsalve, Z. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): 129-139.
- Vásquez-Gómez, E., Soria-Leal, L., y Chávez-Avilés, M. (2019). Análisis del efecto antagonista de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) producidos por *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis* de manera individual y en co-cultivo sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* causante de la pudrición de fresa. *Seguridad Alimentaria*, 17-26.
- Woo, SL., Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, et al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *Open Mycol J*. 2014;8(1):71–126.
- Zabouri, Y., Cheriguene, A., Chougrani, F., Merzouk, Y., Marchetta, A., Urzú, C., De Leo, F. (2021). Actividad antifúngica de bacterias ácido

lácticas frente a especies fitopatógenas de *Alternaria alternata* y su caracterización molecular. Revista de Investigación en alimentos y Nutrición 60(1):18-28.

1.9. Anexos

Anexo 1: Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Indicadores
Problema general				
¿Cuál es la capacidad antagonista y de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?	Determinar la capacidad antagonista y de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana	Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista, producen COV antifúngicos e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%	Cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas adquiridas de un Banco de Germoplasma	13 cepas de levaduras 7 cepas BAL
¿Cuál es la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?	1. Determinar la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana	Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%	Porcentaje de inhibición del crecimiento para <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Alternaria sp.</i>	≥ 70 %
¿Cuál es la capacidad de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?	2. Determinar la capacidad de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana	Las levaduras y las bacterias ácido lácticas producen COV antifúngicos frente a tres cepas fitopatógenas mayor a 70%	Identificación de COV antifúngicos producidos por las levaduras y BAL	COV antifúngicos identificados

Anexo 2: Informe de Turnitin al 28% de similitud

Anexo 3: Instrumento de investigación

No aplica instrumento de investigación para este proyecto.



**FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN,
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**INFORME N° 2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, MARCO TEÓRICO Y METODOLOGÍA**

**DOCENTE INVESTIGADOR
HANNA CÁCERES YPARRAGUIRRE**

**Código ORCID N°
Código Orcid N° 0000-0001-5040-8950**

**CHINCHA ALTA, ICA-PERÚ
2022**

INFORME 2:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Objetivo del informe.

2.1. Problema identificado.

El control de plagas en cultivos hortícolas, ha sido manejado generalmente mediante el uso de plaguicidas químicos. Su uso constante ha causado varios problemas como contaminación ambiental, residuos en alimentos, desarrollo de resistencia a los fungicidas sintéticos por los patógenos y la pérdida de la biodiversidad natural en los agroecosistemas (Harris et al., 2001; Fisher et al., 2012). Esta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de estas plagas de manera sustentable, es decir económicamente viable, con respeto al medio ambiente y no afecte la salud de las personas que aplican estos productos y los que consumen el producto final.

Una alternativa al control químico de hongos fitopatógenos es su supresión por el uso de agentes de control biológico con énfasis en el uso de antagonistas nativos (Zeilinger and Omann, 2007; Vinale et al., 2008). Se ha considerado la posibilidad de controlar patógenos por el uso de varios microorganismos con actividad antagonista tales como hongos, bacterias y actinomicetos. Sin embargo, es importante conocer la actividad antifúngica de algunas levaduras y de las BAL.

2.2. Preguntas de Investigación General y Específicas

Problema general

¿Cuál es la capacidad antagonista y de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?

Problemas específicos

PE1: ¿Cuál es la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?

PE2: ¿Cuál es la capacidad de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?

2.3. Justificación e Importancia

El departamento de Ica, es una región dedicada a la agricultura local y de exportación que se caracteriza por cultivar uvas, paltas, espárragos, arándanos, entre otros cultivos. En general en nuestro país se cultivan diversos productos que son atacados por diversas plagas que afectan la calidad y rendimiento de los mismos. Para su control se utiliza con mayor frecuencia plaguicidas de origen sintético que vienen causando diversos daños al agroecosistema.

El uso de los bioplaguicidas es importante para la sostenibilidad de la agricultura. Su uso permite la diferenciación en los campos, logrando buenos rendimientos y obteniendo materia prima sin plaguicidas sintéticos y sobre todo sin poner en riesgo la salud de la persona que se encarga de las aplicaciones sanitarias o de manera indirecta, las poblaciones aledañas a las zonas de cultivo que por acción del aire se deriva los productos sanitarios a esos espacios donde hay casas, se evita la resistencia a plagas y otras formas indirectas existentes.

Poder conocer la capacidad antagonista de las 13 cepas de levaduras de diferentes géneros y de las 7 cepas de BAL de diferentes géneros será importante para poder tener más alternativas de control biológico que permitan alternar las aplicaciones en los campos de cultivo. Así, también puede ser punto de partida para el inicio de nuevas formulaciones de bioplaguicidas con cepas de nuevos géneros de microorganismos.

2.4. Objetivo General y Específicos

OG: Determinar la capacidad antagonista y de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

OE1 Determinar la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

OE2 Determinar la capacidad de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana

2.5. Impacto de la Investigación

La investigación contribuirá con dos alternativas adicionales (levaduras y bacterias ácido lácticas) para usarlas como control biológico.

2.6. Alcances y Limitaciones

El presente trabajo abarcará en determinar la capacidad antagonista y la producción de COV antifúngicos a partir de levaduras y bacterias ácido lácticas reconocidas en el marco teórico como antagonistas a fitopatógenos. Las cepas fitopatógenas de importancia económica elegidas para la investigación serán *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Alternaria sp.*, estos fitopatógenos atacan a diversos cultivos presentes en la agricultura peruana y que tienen importantes áreas de cultivo. Se realizará la investigación en laboratorio y se subcontratará servicios externos de identificación molecular, servicio de identificación de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos, antibióticos y enzimas. La investigación se realizará por un período de 9 meses.

ESTADO DEL ARTE

3.1. Antecedentes

Kumar et al., (2016). Investigaron a *Enterococcus sp.* BS13 un aislado potencial obtenido de suelo rizosférico de *Vigna mungo* (frijol negro), el cual tuvo actividad biosurfactante con similitud de los biosurfactantes de tipo glicolípido y además este microorganismo mostró la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y la actividad antagonista contra el fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Hadi y Zuheir (2016). Determinaron la actividad antifúngica in vitro de BAL (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sp.* n.º 1, *Lactobacillus sp.* n.º 2 y *Lactococcus sp.*) contra *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum* y *Alternaria sp.* Todas las BAL tuvieron una inhibición significativamente alta ($P < 0.05$) en agar MRS que en agar PDA a 37 °C durante 5 días.

Liu, et al., (2017). Evaluaron 216 cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del vino para controlar el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, un agente causante de la antracnosis de la uva antes de la cosecha. Tres de las cepas dieron positivo para antagonizar al fitopatógeno y se evaluaron más a fondo sus

mecanismos como agentes de control biológico ACB. Los resultados mostraron que los tres aislamientos de *S. cerevisiae* produjeron compuestos antifúngicos, inhibieron la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* y produjo β -1,3-glucanasa y quitinasa. Todos los aislamientos colonizaron frutos de uva en grandes cantidades y controlaron *C. gloeosporioides* cuando se inocularon artificialmente en frutos de uva. La aplicación del aislado GA8 dio como resultado una reducción del 69,7 % de la enfermedad por *C. gloeosporioides* en bayas de uva.

Jaibangyang et al., (2020). Evaluaron 366 cepas de levaduras antagónicas (epífitas y endófitas) aisladas de hojas de arroz, caña de azúcar y maíz de Tailandia, que son potencialmente capaces de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) activos contra el hongo productor de aflatoxinas *Aspergillus flavus*. Solo 49 cepas de levaduras pudieron producir COV antifúngicos. *Candida nivariensis* DMKU-CE18 fue la cepa de levadura más eficaz para inhibir el crecimiento del micelio (64,9 + 7,0% de inhibición), para inhibir la germinación de conidios (49,3 + 3,3%) de *A. flavus* A39 y para reducir la producción de aflatoxinas (74,8 $\pm$ 6,5 %) en granos de maíz. El COV principal producido por esta cepa de levadura era el más cercano al 1-pentanol.

Zabouri, et al., (2021). Investigaron 45 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda de cabra, vaca y camello de varias regiones de Argelia, las cuales fueron probadas para actividad antifúngica contra cinco cepas de la especie fúngica fitopatógena, toxígena y deteriorante *Alternaria alternata*, aisladas de los tallos, hojas, raíces y frutos de tomates y zanahorias. Dos cepas de BAL, identificadas como *Enterococcus lactis* y *E. faecium*, tuvieron la mayor actividad antifúngica, lo que sugiere una posible aplicación en tecnología alimentaria como bioconservantes contra hongos fitopatógenos y que deterioran los alimentos.

3.2. Marco teórico.

La erradicación del hambre y la pobreza, enfocar la agricultura convencional a una agricultura sustentable, asegurar una vida saludable y trabajo digno para todos, reducir la diferencia social y fomentar el desarrollo económico son los acuerdos aceptados por la comunidad internacional en base a la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. A finales del siglo XX, se realizaron transformaciones agrícolas que se enfocaron en la utilización de enormes cuantías de insumos externos, generalmente de procedencia sintética. En la mayoría de naciones, esta acción ha generado fuertes daños al medio ambiente, como la deforestación excesiva, la degradación de los suelos y el agua, y altas cantidades de emisiones de gases de efecto invernadero. Por lo cual, en las futuras acciones se deben tener en cuenta limitaciones ambientales, orientadas tanto a mitigar el cambio climático y la escasez de recursos naturales como a adecuarse a ellos. Es así, que los agricultores deberán minimizar el empleo de recursos en la agricultura sin poner en peligro la productividad de sus cultivos (FAO, 2017).

El uso de los plaguicidas es múltiple y variado y se usa en agricultura hasta un 85 % de la producción mundial, con el fin de mantener un control sobre las plagas que

afectan los cultivos. La agricultura intensiva ha llevado al uso y abuso de plaguicidas, dando lugar a la aparición de nuevos brotes de plagas (reapariciones), selección de poblaciones de plagas resistentes (insectos, bacterias y malas hierbas), aumentando los riesgos para la salud humana y el medio ambiente y todo ello conlleva a barreras al comercio (límite de residuos de plaguicidas permitidos). Adicionándose a ello, los incidentes de salud, producto del uso y fabricación de agroquímicos, llevando todo ello a cambiar y a usar alternativas que sean sostenibles. (Pillaca, 2019) (Del Puerto, et al., 2014).

Los residuos de los pesticidas en el producto final, han provocado que empresas del rubro agrícola busquen alternativas limpias para el control de plagas, siendo una de ellas, el control biológico, y por ejemplo desde 1995 el cultivo de espárrago fue uno de los principales cultivos de exportación no tradicional en Perú que utilizó el control biológico como uno de los componentes del manejo integrado de plagas, para afrontar los problemas fitosanitarios (Pillaca, 2019).

Los bioplaguicidas se dividen en dos grandes grupos: plaguicidas microbianos y plaguicidas bioquímicos (Pérez, 2012). Y se proyecta que el mercado global de bioplaguicidas crecerá de USD 3.0 mil millones en 2018 a USD 6.4 mil millones en 2023, a una tasa compuesta anual de 15.99% durante el período de pronóstico. El aumento de la popularidad de los bioplaguicidas puede atribuirse a la naturaleza ecológica de estos productos, ya que son completamente naturales y no dañan el medio ambiente. Existe un creciente apoyo para el despliegue de soluciones biológicas como alternativas a los pesticidas químicos tanto en la agricultura orgánica como en los sistemas de MIP.

Se proyecta que el mercado de pesticidas microbianos registre la mayor tasa de crecimiento anual entre 2018 y 2023. Los factores más importantes de esta expansión son las regulaciones nuevas y más estrictas relativas a los plaguicidas químicos, la necesidad de cultivos libres de residuos, la expansión de la agricultura ecológica y el aumento de la demanda de productos agrícolas más seguros y respetuosos con el medioambiente (Markets and Markets, 2019).

Los órganos rectores de todo el mundo, particularmente en Europa, ahora están implementando mandatos legislativos con el objetivo de disminuir la dependencia de los pesticidas en la agricultura para aumentar la seguridad del consumidor y del medio ambiente (Woo, et al., 2014).

3.3. Definiciones.

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se consideran antagonistas naturales de diversos microorganismos patógenos presentes en los alimentos (vegetales, granos almacenados), gracias a la producción de una gran cantidad de compuestos con propiedades antifúngicas. Son bacterias grampositivas y muy exigentes. Su crecimiento, contribuyen a la fermentación y degradación de los azúcares de la leche y presentan efectos antagonísticos que impiden la proliferación de otras bacterias Gram positivas y otros microorganismos. Su característica principal es la

fermentación de la glucosa convirtiéndolo en ácido láctico (Klander, 1983; Hayek Ibrahim, 2013 citado por Smaniotto et al., 2018)

Levaduras

En la actualidad, el uso de las levaduras en la producción de alimentos y bebidas es muy amplio de los que se conoce para la producción pan, la cerveza y la producción de vino. Algunas levaduras presentan un fuerte control antifúngico que facilita su uso como controladores del deterioro de alimentos (Vásquez et al., 2016). Las características antagónicas de las levaduras se han atribuido a mecanismos como la competencia por los nutrientes, secreción de compuestos antifúngicos, como asesino de toxinas, producción de enzimas hidrolíticas, producción de sideróforos, y producción de compuestos orgánicos volátiles (Jaibangyang et al., 2019).

Antagonismo

El antagonismo es un proceso natural entre comunidades microbianas y se caracteriza por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra (Pérez et al., 2014). Existen diversos mecanismos de acción empleados por los microorganismos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, entre ellos antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Larrea, 2001).

Mecanismo de competencia por espacio

Es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. La competencia más común es por nutrimentos, oxígeno o espacio.

Mecanismo de interacción directa con el patógeno

En este se puede presentar el parasitismo, el cual consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista.

Bioplaguicidas

Se dividen en dos grandes grupos: plaguicidas microbianos, que incluyen las bacterias, hongos, virus y protozoos, y plaguicidas bioquímicos, que están incluidos los atrayentes, hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química, muy importantes en la relación planta- insecto. Estos, son altamente específicos contra las plagas y representan un mínimo riesgo para las personas o el medio ambiente. Pero siempre es recomendable el uso de equipos de protección personal al igual que cuando se usan los plaguicidas convencionales. Al contrario de los bioplaguicidas, estos son productos de materiales sintético y controlan la plaga objetivo, pero también afectan a organismos no deseados como insectos benéficos, la vegetación y biodiversidad silvestre (Alfonso, 2002 citado por Nava-Pérez, 2012).

Compuestos orgánicos volátiles

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) son un amplio grupo de productos químicos basados en carbón con bajos pesos moleculares y alta presión de vapor que se disipan rápidamente en el ambiente, generados a partir de actividades industriales y como resultado del metabolismo secundario de distintos microorganismos. Dichos compuestos pueden ser alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, terpenos y aromáticos, por mencionar algunos (Bennett e Inamdar, 2015 citado por Vázquez-Gómez, 2019).

ANEXO:

Referencias bibliográficas revisadas (indicar los links o enviar copias de los artículos científicos revisados).

- Benitez, T., Rincon, A., Limon, M., Codon, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7:249-60.
- Del Puerto Rodríguez, A., Suárez, S., Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana Higiene Epidemiológica*. 52(3):372–87.
- Flores, M., Martínez, M., Nieto, D., Rodríguez, J., Colinas, M., y Martínez, J.(2014). Reducción en la germinación in vitro de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de Brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2): 180-190.
- Flores-Bazauri, W., Chico-Ruíz, J., y Cerna-Rebaza, L. (2015). Actividad antagonica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 35(1):34-42.
- Food and Agriculture Organization of United Nations. (2017). The state of agriculture and food [Internet]. Leveraging food systems for inclusive rural transformation. 1–178 p. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i7658s.pdf>.
- Hadi, R. and Zuheir, H. (2016). Efficiency of Lactic Acid Bacteria as biological control agents against some Fungi. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 27(2): 35-40.
- Jaibangyang, S., Nasanit, R., and Limtong, S. (2020). Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. *BioControl*, 65:377-386.
- Kasfi, K., Taheri, P., Jafarpour, B., & Tarighi, S. (2018). Characterization of antagonistic microorganisms against *Aspergillus* spp. from grapevine leaf and berry surfaces. *Journal of Plant Pathology*, 100(2), 179–190. doi:10.1007/s42161-018-0042-x
- Kumar, S., Dubey, RC., and Maheshwari, DK. (2016). Biosurfactant-Mediated Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* Causing Charcoal Rot in *Vigna mungo* by a Plant Growth Promoting *Enterococcus* sp. BS13. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7(11):1-8.
- Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo

- Liu, Z., Du, S., Ren, Y, y Liu Y. Capacidad de biocontrol de levaduras asesinas (*Saccharomyces cerevisiae*) aislados del vino contra *Colletotrichum gloeosporioides* en uva. *Revista de Microbiología Básica*, 58(1): 60-67.
- Markets and Markets. 2019. Mercado de biopesticidas por tipo (bioinsecticidas, biofungicidas y bionematicidas), fuente (microbianos, extractos de plantas e insectos beneficiosos), modo de aplicación, formulación, aplicación de cultivos y región: pronóstico global para 2023. Revisado el 13 enero 2020. Disponible en: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html>
- Moreira-Morillo, A., Cedeño-Moreira, A., Canchgna-Martínez, F. y Garcés-Fiallos, F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa: symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4): 653-662.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J., Vásquez-Montoya, E. 2012. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura, Desarrollo Sustentable*. 2012; 8(3):17–29.
- Pérez, E., Gutiérrez, C., Báez, R., Montoya, E. 2014. Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control Biológico De Plagas. *Ra Ximhai*. 8(3):41–9.
- Pérez, R. (2012). Inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis Sativus* L.). Montecillo, Texcoco, México.
- Pillaca, E. (2019). Acción biocontroladora de tres especies de *Trichoderma* frente a *Cercospora asparagi* Sacc. en el cultivo de *Asparagus officinalis* L. (Espárrago). *Univ Nac Mayor San Marcos* [Internet]. 2019; Available from: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/10455>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-bautista, M., Cristóbal-Alejo, J., & Valencia-Botín, A., Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (5): 1325–1332.
- Smaniotto, F., Santos, S., Melo, I., Queiroz, S. (2018). Validación de la actividad antagonista de bacterias ácido-lácticas contra el hongo *Botrytis cinerea*. 12° Congreso Interinstitucional de Iniciación Científica – CIIC2018, Campinas, Sao Paulo, Brasil.
- Vásquez, J., Ramírez, M., y Monsalve, Z. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): 129-139.
- Vásquez-Gómez, E., Soria-Leal, L., y Chávez-Avilés, M. (2019). Análisis del efecto antagonista de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) producidos por *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis* de manera individual y en co-cultivo sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* causante de la pudrición de fresa. *Seguridad Alimentaria*, 17-26.
- Woo, SL., Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, et al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *Open Mycol J*. 2014;8(1):71–126.
- Zabouri, Y., Cheriguene, A., Chougrani, F., Merzouk, Y., Marchetta, A., Urz, C., De Leo, F. (2021). Actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas frente a especies

fitopatógenas de *Alternaria alternata* y su caracterización molecular. Revista de Investigación en alimentos y Nutrición 60(1):18-28.

INFORME 2: METODOLOGIA APLICADA

Objetivo del informe.

4.1. Tipo y Nivel de la Investigación

De acuerdo a lo redactado en el Manual de Frascati, 2015 el tipo de investigación a realizar es investigación aplicada, que consiste en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero está dirigida fundamentalmente hacia un objetivo práctico específico.

Se realiza el nivel de Investigación cuantitativa, este enfoque metodológico utiliza la recolección de datos para probar hipótesis, con base a la medición numérica y el análisis estadístico, para así establecer patrones de comportamiento y probar teorías, aplicando la lógica deductiva.

Se parte de la premisa que existe una realidad objetiva que puede ser observada y medida, dado esto, tiene sentido la búsqueda de objetividad por parte del investigador, intentando asegurar procedimientos rigurosos y objetivos en la recolección y análisis de datos. El objetivo es la generalización de resultados obtenidos a través de la investigación. Las metas son tanto describir, explicar y predecir fenómenos, como generar y probar teorías que nacen a partir de la comparación de investigaciones previas con los resultados del estudio.

4.2. Diseño de Investigación

Sitio experimental

Las pruebas de antagonismo para las tres cepas fitopatógena *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Alternaria sp.* se realizará en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Ica, ubicado en el distrito de Chincha Alta, provincia de Chincha y departamento de Ica. Alternadamente se realizará en el CITEagroindustrial – Ica (segunda institución que colabora en el proyecto PIMEN). Las pruebas para determinar los compuestos orgánicos volátiles, enzimas líticas y antibióticos e identificación molecular de las cepas fitopatógenas se realizarán en laboratorios externos ya que en la UAI no se cuenta con ese equipamiento.

Muestras biológicas

Los aislados de las 13 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL, serán obtenidas de un Banco de Germoplasma de Cepas Comercial aisladas de diferentes alimentos (uva, vino, leche, yogurt, entre otros). Previo a este trabajo se realizó otra investigación que permitió aislar cepas de *B. cinerea*, *L. theobromae* y *Alternaria sp.* provenientes de campos de cultivo de vid.

Medios de cultivo

Se utilizará el medio De Man Rogosa y Sharpe (MRS) en sólido y en caldo para el crecimiento y enfrentamiento de las BAL, medio Glucosa-Peptona-Levadura (GPY) para el crecimiento de las levaduras y agar papa dextrosa Agar (PDA) para reactivar las cepas de hongos fitopatógenos. Estos medios de cultivo se prepararán según las indicaciones del fabricante, añadiendo agua destilada a la cantidad recomendada del polvo del medio deshidratado y se esterilizaron (121 °C y 1 atm, 20 min) (Rojas et al., 2016).

Se emplearán 13 cepas de levaduras (L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07, L08, L09, L10, L11 y L12) y 7 cepas de BAL (BAL01, BAL02, BAL03, BAL04, BAL05, BAL06 y BAL07).

Ensayo para determinar la capacidad antagonista

Se determinará por medio de la técnica de confrontación dual entre los microorganismos antagonistas (13 levaduras y 7 BAL) y los tres fitopatógenos (*B. cinerea*, *L. theobromae* y *Alternaria sp.*).

Se sembrará en una placa Petri de GPY (9 cm de diámetro) a aproximadamente 2 cm de distancia desde el borde de la placa una línea recta de cada cepa de levadura en estudio, y en medio MRS se sembrará cada cepa de BAL. Luego, se colocará un disco de 5 mm de diámetro de cada especie de hongo fitopatógeno que ha crecido previamente en medio de PDA de 5 días de edad a la distancia de 5 cm de la levadura o bacteria. Se usaron como control placas únicamente con especies de hongos fitopatógenos. Las placas Petri se incubarán a 28 °C durante siete días y se observarán diariamente para evaluar el crecimiento del micelio del patógeno. Cada aislado de levadura y bacteria se analizarán 25 veces (repeticiones). El diámetro de la colonia se determinará siete días después de la inoculación y se calculará el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula de Mari et al. 1996 citado por Kasfi et al., 2018:

$$R(\%) = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Donde:

R es el porcentaje de hifas radiales inhibidoras de crecimiento,

R1 es el crecimiento de hifas del control, y

R2 el crecimiento de hifas en la placa Petri inoculada con aislados de levaduras o bacterias.

Ensayo para determinar la germinación de esporas

Las cepas de levadura se cultivarán en caldo GPY a 28 °C a 150 rpm durante 24 horas.

Se utilizará la técnica de cultivo en portaobjetos, para ello se tomará una bola de algodón, la cual se colocará en el centro de una placa Petri y encima de esta se colocará un portaobjetos de vidrio. Se humedecerá el algodón con 5 mL de agua estéril.

Se obtendrá un cubo de 5mm de PDA y se colocará en el centro del portaobjetos. Enseguida en el portaobjeto se colocará esporas de hongos en los cuatro lados del cuadrado de PDA con ayuda de una aguja (previamente las esporas de hongos han crecido en PDA a 28°C y tendrán 7 días de edad). Se colocará una lámina cubre objetos estéril en la superficie superior del cubo de agar, luego la placa Petri se tapará y sellará con Parafilm. La placa Petri control se realizará sin inoculación de levadura. Se realizará tres repeticiones y la inhibición de la germinación se evaluará después de la incubación a 28°C durante 21 horas (Zhou et al. 2018 citado por Jaibangyang, et al., 2020).

Por tratamiento se evaluarán 100 conidios, utilizando un microscopio de luz con un aumento de 100X. Las esporas germinadas se contarán con la inhibición de germinación conidial calculada y comparada con el control, de acuerdo con Gong et al., 2015 (citado por Jaibangyang et al., 2020).

De acuerdo a las posibilidades del microscopio del laboratorio de microbiología de la UAI, se medirá la longitud del tubo germinativo y se registrará la escala de clasificación de germinación:

1= sin germinación;

2= tubo germinativo <2x tamaño del conidio;

3= tubo germinativo <2x a 4x tamaño del conidio;

4= tubo germinativo >4x tamaño del conidio

4.3. Hipótesis General (*De ser necesario – investigación cuantitativa*)

Hipótesis General

Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista, producen COV antifúngicos e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%.

4.4. Hipótesis Específicas (*De ser necesario – investigación cuantitativa*)

HE1: Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%.

HE2: Las levaduras y las bacterias ácido lácticas producen COV antifúngicos frente a tres cepas fitopatógenas mayor a 70%.

4.5. Variables (De ser necesario - – *investigación cuantitativa*)

Variable dependiente (X):

- Fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Porcentaje de inhibición del crecimiento

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

- Fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*

Porcentaje de inhibición del crecimiento

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

- Fitopatógeno *Alternaria* sp.

Porcentaje de inhibición del crecimiento

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios

Variable independiente (Y):

13 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL.

Definición conceptual:

Porcentaje de inhibición del crecimiento. – Consiste en medir el crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del microorganismo antagonista (levaduras y BAL) que impide que se desarrolle por acción de antibióticos, enzimas o competencia.

Porcentaje de inhibición de germinación de conidios. – Consiste en observar y medir el crecimiento de las estructuras reproductivas del hongo fitopatógeno en presencia del microorganismo antagonista (levaduras y BAL) que impide que se desarrolle por acción de antibióticos, enzimas o competencia.

Definición operacional:

Porcentaje de inhibición del crecimiento. - La inhibición del crecimiento se mide en todos los tratamientos al tercer día, aun cuando en algunos casos el antagonista se encuentre distante del patógeno a través de la antibiosis, mecanismo de acción característico para estas especies de biocontroladores, que se manifiesta por la asociación entre organismos o entre un organismo y un producto metabólico de otro organismo, que resulta perjudicial para uno de ellos (Benitez et al., 2004).

Porcentaje de inhibición de germinación. – La inhibición de la germinación de conidios de los hongos fitopatógenos se mide a las 2, 4, 6, 8 horas a 28 ± 3 °C. Posteriormente con la ayuda de un microscopio se cuantificará los conidios germinados, se considerarán 100 conidios al azar, de cada concentración se realizarán tres repeticiones (Flores et al., 2014).

4.6. Operacionalización de Variables (*De ser necesario – investigación cuantitativa*)

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Indicadores
Problema general				
¿Cuál es la capacidad antagonista y de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?	Determinar la capacidad antagonista y de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana	Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista, producen COV antifúngicos e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%	Cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas adquiridas de un Banco de Germoplasma	13 cepas de levaduras 7 cepas BAL
¿Cuál es la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?	1. Determinar la capacidad antagonista que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana	Las levaduras y las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antagonista e inhiben el crecimiento de tres cepas fitopatógenas mayor a 70%	Porcentaje de inhibición del crecimiento para <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Alternaria sp.</i>	$\geq 70\%$
¿Cuál es la capacidad de producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana?	2. Determinar la capacidad de producción de COV antifúngicos que tienen las levaduras y las bacterias ácido lácticas para el control de tres cepas fitopatógenas de importancia económica en la agricultura peruana	Las levaduras y las bacterias ácido lácticas producen COV antifúngicos frente a tres cepas fitopatógenas mayor a 70%	Identificación de COV antifúngicos producidos por las levaduras y BAL	COV antifúngicos identificados

4.7. Técnicas de Investigación

Técnicas de recolección de datos

Se procederá a realizar mediciones con un vernier expresado en mm el halo de crecimiento del hongo fitopatógeno y de las cepas de levaduras y BAL.

Técnicas estadísticas para el procesamiento de los datos

Los tratamientos se establecerán en un diseño experimental completamente al azar con 25 repeticiones cada uno. Se tendrá 20 tratamientos en total, donde 13 corresponden a cepas de levaduras y 7 a cepas de BAL. Los datos obtenidos del porcentaje de inhibición se transformarán mediante la función del arcoseno: $y = \arcsin[\sqrt{y/100}]$. Todos los datos se someterán a un análisis de varianza, la comparación de medias se realizará mediante el método de Tukey ($p = 0.05$), usando el paquete estadístico Infostad ver. 2019 (Ruiz-Sánchez et al., 2014)

4.8. Instrumento de medición o plan de entrevistas o plan de experimentos

La muestra está compuesta de la siguiente manera:

Código	Especie	Tratamiento	Código	Género	Tratamiento
L01	<i>Candida incommunis</i> (MycoBank # 327439)	1	BAL01	<i>Lactococcus lactis</i> (ATCC 7963™)	14
L02	<i>Candida parapsilosis</i> (MycoBank # 253819)	2	BAL02	<i>Enterococcus mundtii</i> (ATCC 43186™)	15
L03	<i>Debaryomyces hansenii</i> (MycoBank # 296478)	3	BAL03	<i>Lactobacillus reuteri</i> (ATCC 23272™)	16
L04	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (MycoBank # 488270)	4	BAL04	<i>Lactobacillus plantarum</i> (ATCC 8014™)	17
L05	<i>Pichia guillermoundii</i> (MycoBank # 513463)	5	BAL05	<i>Lactobacillus brevis</i> (ATCC 14869™)	18
L06	<i>Pichia membranifaciens</i> (MycoBank # 227217)	6	BAL06	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ATCC 49037™)	19
L07	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> subsp. <i>fulliensis</i> (MycoBank # 263896)	7	BAL07	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> (ATCC 14835™)	20
L08	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MycoBank # 492348)	8			
L09	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (MycoBank # 325702)	9			
L10	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (MycoBank # 258102)	10			
L11	<i>Tausonia pullulans</i> (MycoBank # 812190)	11			
L12	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> (MycoBank # 316067)	12			
L13	<i>Torulaspora delbrueckii</i> (MycoBank # 46720)	13			

4.9. Validación y confiabilidad del Instrumento (*De ser necesario – investigación cuantitativa*)

Esta investigación no utiliza instrumento de investigación



**FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN,
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**INFORME N° 3
TRABAJO DE CAMPO
Parte 1**

**DOCENTE INVESTIGADOR
HANNA CÁCERES YPARRAGUIRRE**

**Código ORCID N°
Código Orcid N° 0000-0001-5040-8950**

**CHINCHA ALTA, ICA-PERÚ
2022**

INFORME 3:
TRABAJO DE CAMPO – Parte 1 Enfrentamiento dual con
Lasiodiplodia theobromae

Objetivo del informe.

4.10. Población – Muestra.

Tabla 1: Lista de levaduras y bacterias ácido lácticas usadas en la investigación

Código	Especie	Tratamiento	Código	Género	Tratamiento
L01	Candida incommunis (MycoBank # 327439)	1	BAL01	Lactococcus lactis (ATCC 7963™)	14
L02	Candida parapsilosis (MycoBank # 253819)	2	BAL02	Enterococcus mundtii (ATCC 43186™)	15
L03	Debaryomyces hansenii (MycoBank # 296478)	3	BAL03	Lactobacillus reuteri (ATCC 23272™)	16
L04	Hanseniaspora opuntiae (MycoBank # 488270)	4	BAL04	Lactobacillus plantarum (ATCC 8014™)	17
L05	Pichia guillermoundii (MycoBank # 513463)	5	BAL05	Lactobacillus brevis (ATCC 14869™)	18
L06	Pichia membranifaciens (MycoBank # 227217)	6	BAL06	Gluconacetobacter diazotrophicus ATCC 49037™)	19
L07	Saccharomyces ellipsoideus subsp. fulliensis (MycoBank # 263896)	7	BAL07	Gluconacetobacter liquefaciens (ATCC 14835™)	20
L08	Saccharomyces cerevisiae (MycoBank # 492348)	8			
L09	Zygosaccharomyces rouxii (MycoBank # 325702)	9			
L10	Zygosaccharomyces bailii (MycoBank # 258102)	10			
L11	Tausonia pullulans (MycoBank # 812190)	11			
L12	Kluyveromyces thermotolerans (MycoBank # 316067)	12			
L13	Torulasporea delbrueckii (MycoBank # 46720)	13			

4.11. Muestreo.

No aplica

4.12. Descripción de la recolección de la información a través del trabajo de campo o experimentos en laboratorio.

- Sitio experimental

Las pruebas de antagonismo para cepa fitopatógena *Lasiodiplodia theobromae* se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Ica, ubicado en el distrito de Chincha Alta, provincia de Chincha y departamento de Ica.

- Muestras biológicas

Los aislados de las 13 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL, fueron obtenidas de un Banco de Germoplasma de Cepas Comercial aisladas de diferentes alimentos (uva, vino, leche, yogurt, entre otros). Previo a este trabajo se realizó otra investigación que permitió aislar cepa de *L. theobromae* proveniente de campos de cultivo de vid.

- Reactivación de *Lasiodiplodia theobromae*

Se realizó a partir de una placa Petri que contenía el cultivo madre, mediante repiques en el centro de la placa Petri (Fig. 1), se reactivaron un total de ocho placas con medio PDA y se dejó incubar por 7 días a temperatura ambiente.

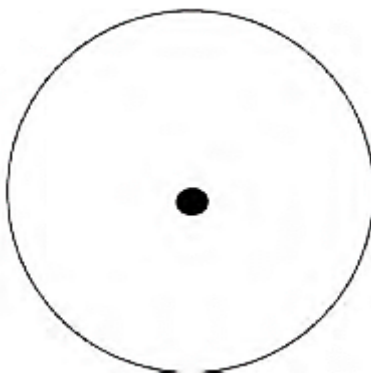


Fig. 1: Repique del hongo fitopatógeno en el centro de una placa Petri con medio PDA.

- Reactivación de Bacterias ácido lácticas.

La reactivación de las 7 cepas de bacterias ácido lácticas se realizaron en tubos de ensayo con 5mL de Caldo MRS, el pH fue ajustado a 6.2 con el uso de HCl, fueron llevadas al agitador a 200 rpm por un periodo de 24 – 48 horas a temperatura ambiente, asimismo se sembró por duplicado en placas con Agar MRS para ser caracterizadas.

De las 7 cepas, se reactivó con éxito 4 cepas y las 3 cepas restantes se pidió al proveedor que realice un reenvío. Para fines de este informe se presenta resultados solo con las 4 cepas reactivadas, pero para los otros informes se presentará con las 7 cepas.

- Reactivación de Levaduras

La reactivación de las 13 cepas de levaduras se realizó en tubos con 5 mL de Caldo GPY, el pH fue ajustado a 5-8 +/- 0.2 con el uso de HCl, posteriormente fueron colocadas en el agitador a 200 rpm por un periodo de 24 – 48 horas a temperatura ambiente. De igual forma, las 13 cepas se sembraron por duplicado en placas con Agar GPY para su posterior caracterización morfológica.

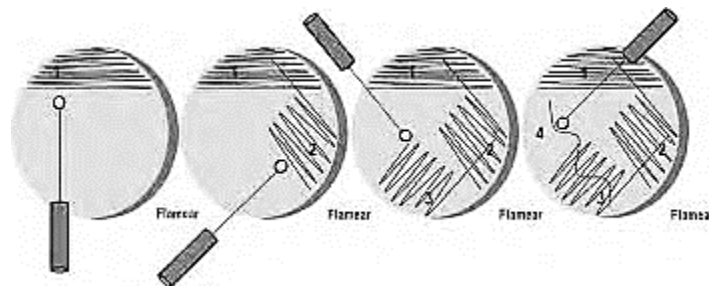


Fig. 2: Siembra por agotamiento y estría.

- Caracterización morfológica de cepas

Se realizó mediante la evaluación macroscópica tanto para levaduras como bacterias ácido lácticas, se tomaron ocho variables, de los cuáles fueron: Forma, tamaño, elevación, bordes, pigmentación, textura, opacidad y apariencia (Fig. 3).

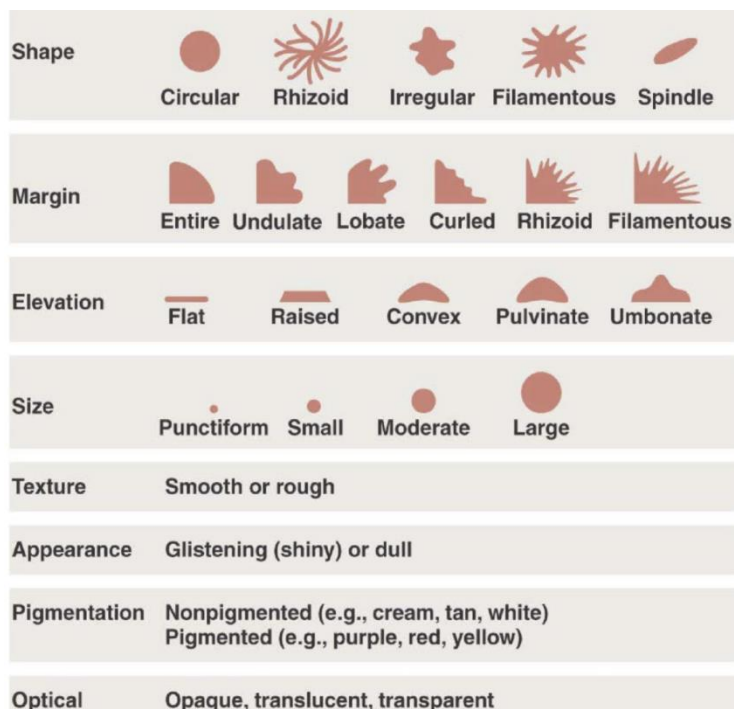


Fig. 3: Imagen de las ocho variables para la evaluación macroscópica.

- Ensayo para determinar la capacidad antagonista (Primera parte: cepa *L. theobromae*)

Se determino por medio de la técnica de confrontación dual entre los microorganismos antagonistas (13 levaduras y 7 BAL) y una cepa fitopatógena (*L. theobromae*).

Para la selección preliminar de aquellas cepas que muestren antagonismo contra el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*, se determinó por el método directo conocido como enfrentamiento dual. Esta prueba consistió en el desarrollo simultáneo de las cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas antagonistas con el hongo fitopatógeno en placas Petri de 9 cm de diámetro con agar GPY y MRS, respectivamente; las cepas antagonistas se sembraron a 2 cm de distancia desde el borde de la placa, posteriormente, se colocó en el centro un disco de 8 mm del hongo fitopatógeno a trabajar, esto se realizó por duplicado mediante una estría con la cepa crecida en

placas con su medio respectivo y la otra estría se realizó del sobrenadante de los pre inóculos. Como controles solo se usaron placas con los medios GPY y MRS sembradas solo con el hongo a 2 cm de distancia del borde de la placa, con 3 repeticiones por cada medio de cultivo. Todas estas placas fueron llevadas a la incubadora a una temperatura de 26 °C durante 7 días y se observó el crecimiento a partir del 4to día para evaluar el crecimiento del micelio del fitopatógeno. El diámetro de la colonia se determinó a los siete días después de la inoculación y se calculó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$PICR = ((R1 - R2) / R1) * 100$$

Donde:

R1: radio mayor (radio del patógeno testigo)

R2: radio menor (radio del patógeno enfrentado con el antagonista)

- **Técnicas estadísticas para el procesamiento de los datos**

Los tratamientos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones cada uno. Se tendrá 20 tratamientos en total, donde 13 corresponden a cepas de levaduras y 7 a cepas de BAL.

4.13. Tabla de resultados.

- Descripción de las levaduras usadas

Tabla 2: Descripción del origen de levaduras usadas en la investigación

ESPECIES DE LEVADURAS	CÓDIGO MycoBank#	AISLAMIENTO	MEDIO	T° y Ph (CRECIMIENTO)	CONSERVACIÓN
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	316067	Fermentación de la mermelada de ciruela			
<i>Tausonia pullulans</i>	812190	Medio ambiente			
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	258102	Vino de Estados Unidos			
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	325702	Mosto de uva			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	492348	Destilería		T° :24 °C – 26 °C	
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	263896	Vino	• Agar YM • Caldo YM.	Ph: 5.6 – 6.2	4 – 10 °C
<i>Pichia membranifaciens</i>	227217	Vino Alemán	• Agar Sabourand		
<i>Pichia guillermoundii</i>	513463	Mantequilla rancia	• Dextrosa • Medio YPD		
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	488270	Mosto de uva			
<i>Debaryomyces hansenii</i>	296478	Sake de Japón			
<i>Candida parapsilosis</i>	253819	Bebedero de Puerto Rico		T° : 24 °C – 35 °C	
<i>Candida incommunis</i>	27439	Mosto de uva		Ph: 5.6 – 6.2	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	812190	Mosto de uva de Francia		T°: 24 °C - 26 °C	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Bioplaguicida		Ph: 5.6 – 6.2	

- **Descripción de las bacterias ácido lácticas usadas**

Tabla 3: Descripción del origen de bacterias ácido lácticas usadas en la investigación

ESPECIES	NOMBRE DE CEPA	AISLAMIENTO	MEDIO	T° y Ph (CRECIMIENTO)	CONSERVACIÓN
<i>Lactobacillus brevis</i>	Bb14	Estiércol de cerdo	Agar MRS Caldo MRS	T°: 30 °C Ph: 6.5 +/- 0.2	4 – 10 °C
<i>Lactobacillus reuteri</i>	F275	Estiércol de cerdo	Agar MRS Caldo MRS		
<i>Lactococcus lactis</i>	NCTC 6681	Cuajada	Medio ATCC	T° : 37 °C	
<i>Lactobacillus sp.</i>	-	Bioplaguicida	Agar MRS Caldo MRS	Ph: 7.4 +/- 0.2	

- **Caracterización de levaduras**

Para la caracterización fenotípica de levaduras en agar GPY se tomaron en cuenta diferentes variables, tal como se muestran en la tabla 4, Fig. 4 y 5.

Tabla 4: Descripción morfológica de levaduras usadas en la investigación

Especie	Código de cepa	Forma	Tamaño	Elevación	Bordes	Color	Textura	Opacidad	Apariencia
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	L1	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Cremoso	Opaco	Brillante
<i>Tausonia pullulans</i>	L2	Circular	Moderado	Elevado	Entero	Crema	Cremoso	Traslucido	Brillante
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	L3	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	L4	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Blanca	Seco	Opaco	No Brillante
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L5	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Candida parapsilosis</i>	L6	Circular	Moderado	Elevado	Entero	Blanca	Seco	Opaco	No Brillante
<i>Candida incommunis</i>	L7	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	L8	Circular	Puntiformes	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Debaryomyces hansenii</i>	L9	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	L10	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Crema	Seco	Opaco	No Brillante
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	L11	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Pichia guillermoundii</i>	L12	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Pichia membranifaciens</i>	L13	Circular	Moderado	Elevado	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante

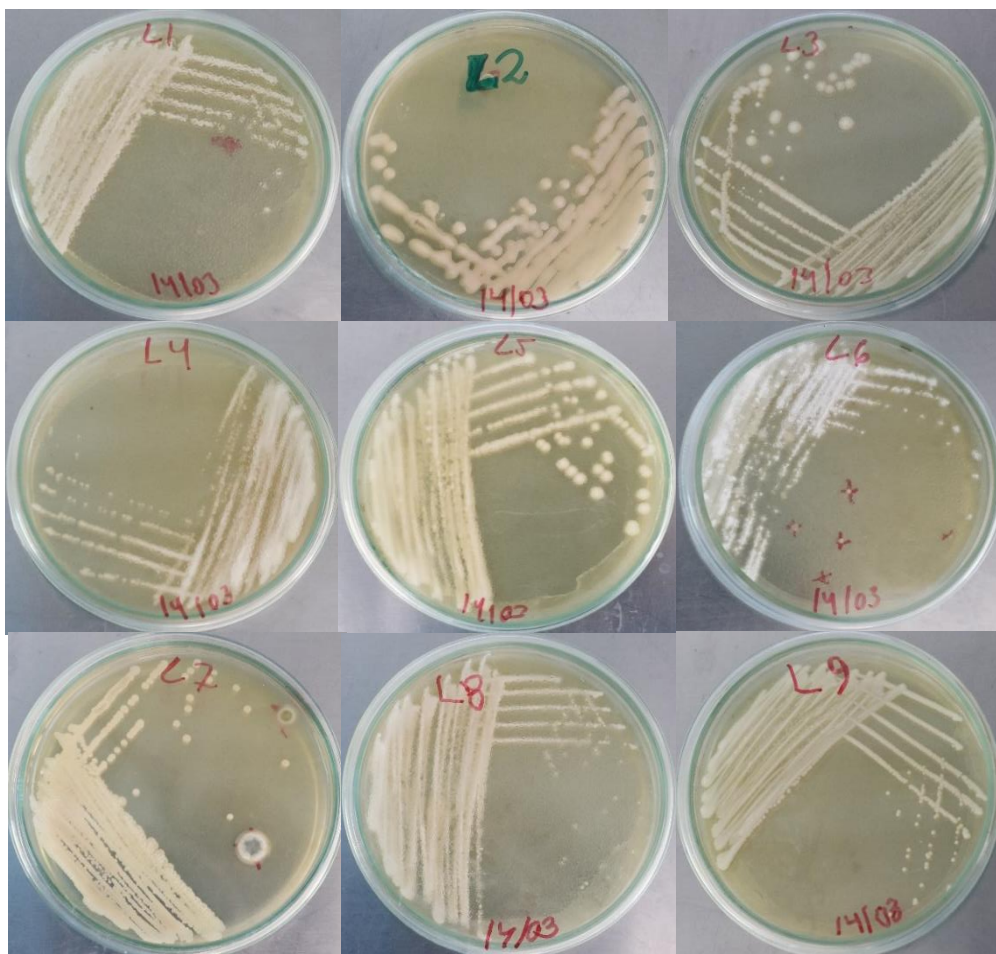


Fig. 4: Vista macroscópica de levaduras en placas Petri con medio GPY.

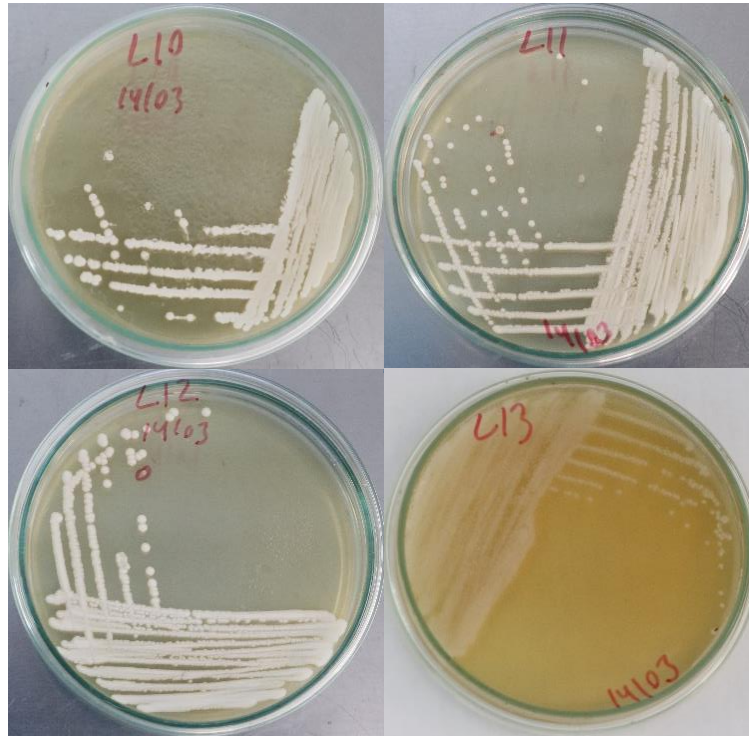


Fig. 5: Vista macroscópica de levaduras en placas Petri con medio GPY.

- **Caracterización de bacterias ácido lácticas**

Para la caracterización fenotípica de bacterias ácido lácticas en agar MRS, se tomaron en cuenta diferentes variables, tal como se muestran en la tabla 5, Fig. 6.

Tabla 5: Descripción morfológica de bacterias ácido lácticas usadas en la investigación

Especie	Código de cepa	Forma	Tamaño	Elevación	Bordes	Color	Textura	Opacidad	Apariencia
<i>Lactobacillus brevis</i>	B1	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Cremoso	Opaco	Brillante
<i>Lactobacillus reuteri</i>	B4	Irregular	Moderado	Umbonada	Entero	Crema	Rugoso	Opaco	No brillante
<i>Lactobacillus lactis</i>	B5	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Lactobacillus sp.</i>	BS	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Seco	Opaco	No Brillante

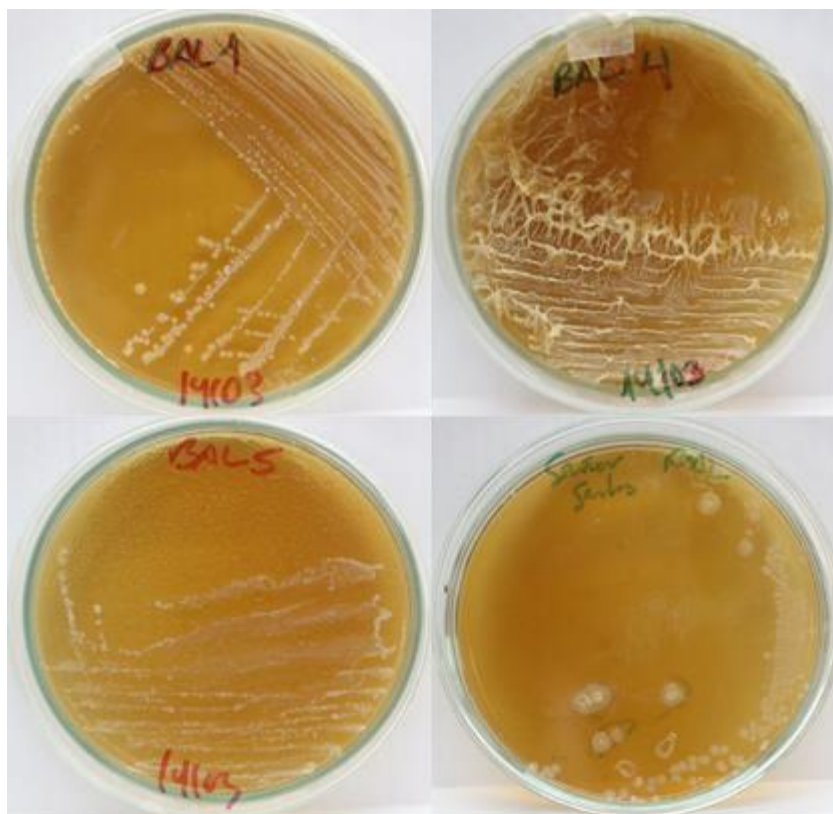


Fig. 6: Vista macroscópica de las bacterias ácido lácticas en placas Petri con medio MRS.

- **Pruebas de antagonismos de levaduras frente a *L. theobromae***

De las 13 cepas de levaduras, las cuáles fueron codificadas, solo una especie resultó tener una gran actividad antagonista frente a *Lasiodiplodia theobromae* (Fig. 7). Además, los resultados del porcentaje de inhibición se ejecutaron en base al promedio de las repeticiones por cepa. Estos valores se referencian en la Tabla 6, la cepa L5 mostró el mayor porcentaje de inhibición con un 72,73% para la estría sembrada con la cepa reactivada en placa y un 74,24% para la estría sembrada con el sobrenadante de la reactivación (Fig. 8).

Por último, al 4to día de enfrentamiento *Lasiodiplodia theobromae* creció en toda la placa de los 3 controles, tal como se muestra en la figura 9.

Tabla 6: Porcentaje de inhibición de *Lasiodiplodia theobromae* por la actividad antagonista de cepas de levaduras al séptimo día de enfrentamiento.

ESPECIE DE LEVADURA	CÓDIGO	% DE INHIBICIÓN		PROMEDIO
		Cultivo de placa	Cepa del Sobrenadante	
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	L1	36.36%	37.87%	37.12%
<i>Tausonia pullulans</i>	L2	42.42%	39.39%	40.91%
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	L3	36.36%	36.36%	36.36%
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	L4	34.85%	39.39%	37.12%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L5	72.73%	74.24%	73.49%
<i>Candida parapsilosis</i>	L6	34.85%	34.85%	34.85%
<i>Candida incommunis</i>	L7	34.85%	37.87%	36.36%
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	L8	39.39%	37.87%	38.63%
<i>Debaryomyces hansenii</i>	L9	34.85%	34.85%	34.85%
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	L10	36.36%	39.39%	37.88%
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	L11	36.36%	36.36%	36.36%

<i>Pichia guillermoundii</i>	L12	42.42%	39.39%	40.91%
<i>Pichia membranifaciens</i>	L13	39.39%	36.36%	37.88%

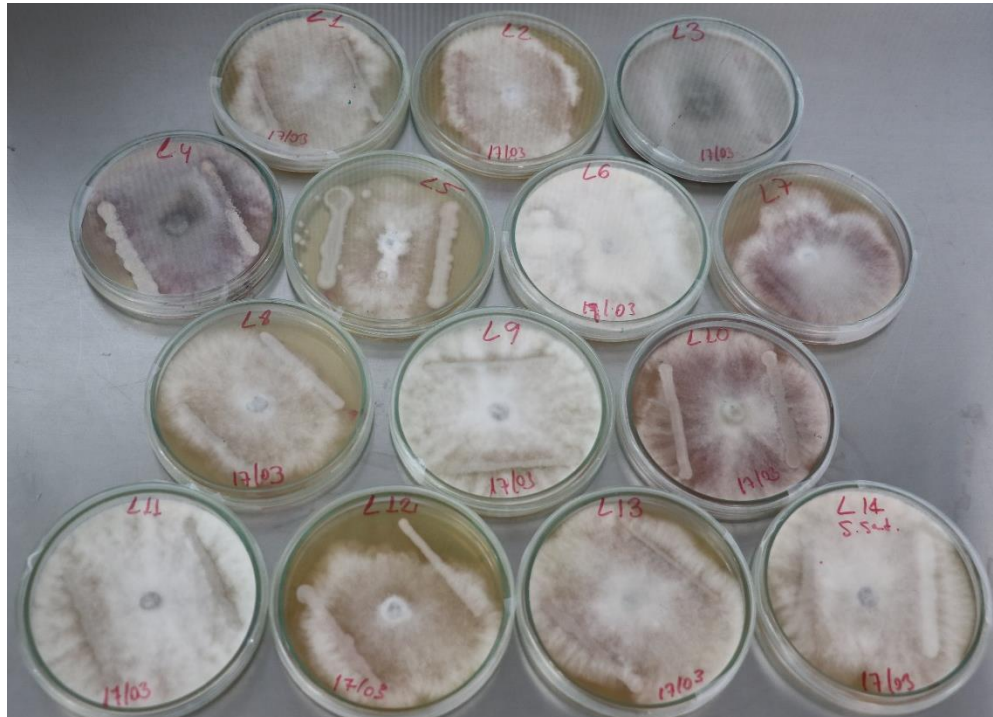


Fig. 7: Enfrentamiento dual de las 14 cepas de levaduras frente al *Lasioidiplodia theobromae*.



Fig. 8: Cepa L5 mostrando una gran actividad antagonística frente a *Lasioidiplodia theobromae*.

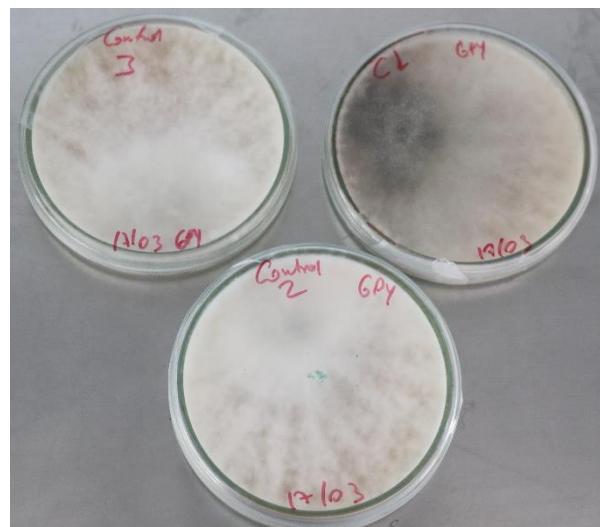


Fig. 9: Controles sembrados únicamente con *Lasioidiplodia theobromae* en medio GPY.

- **Pruebas de antagonismos de bacterias ácido lácticas frente a *L. theobromae***

De las 04 cepas de bacterias ácido lácticas, éstas fueron codificadas, al igual que el caso de las levaduras solo una especie resultó tener una gran actividad antagónica frente a *Lasiodiplodia theobromae* (Fig. 10). Posteriormente, los resultados del porcentaje de inhibición se hicieron en base al promedio de las repeticiones por cepa. Estos valores se referencian en la Tabla 7, la cepa codificada como B4 fue la que mostró el mayor porcentaje de inhibición con un 92.59% para la estría sembrada con la cepa reactivada en placa y un 81,52% para la estría sembrada con 20 ul del sobrenadante de la cepa (Fig. 11).

Por último, al 4to día de enfrentamiento dual *Lasiodiplodia teobromae* no invadió toda la placa de los tres controles (Fig. 12).

Tabla 7: Porcentaje de inhibición de *Lasiodiplodia theobromae* por la actividad antagonista de cepas de bacterias ácido lácticas al séptimo día de enfrentamiento.

ESPECIE DE LEVADURA	CÓDIGO	% DE INHIBICIÓN		PROMEDIO
		Cultivo de placa	Cepa del Sobrenadante	
<i>Lactobacillus brevis</i>	B1	22,22%	20,40%	21,31%
<i>Lactobacillus reuteri</i>	B4	92.59%	81,50%%	87,05%
<i>Lactobacillus lactis</i>	B5	20,40%	25,90%	23,15%
<i>Lactobacillus sp.</i>	BS	24,10%	22,20%	23,15%

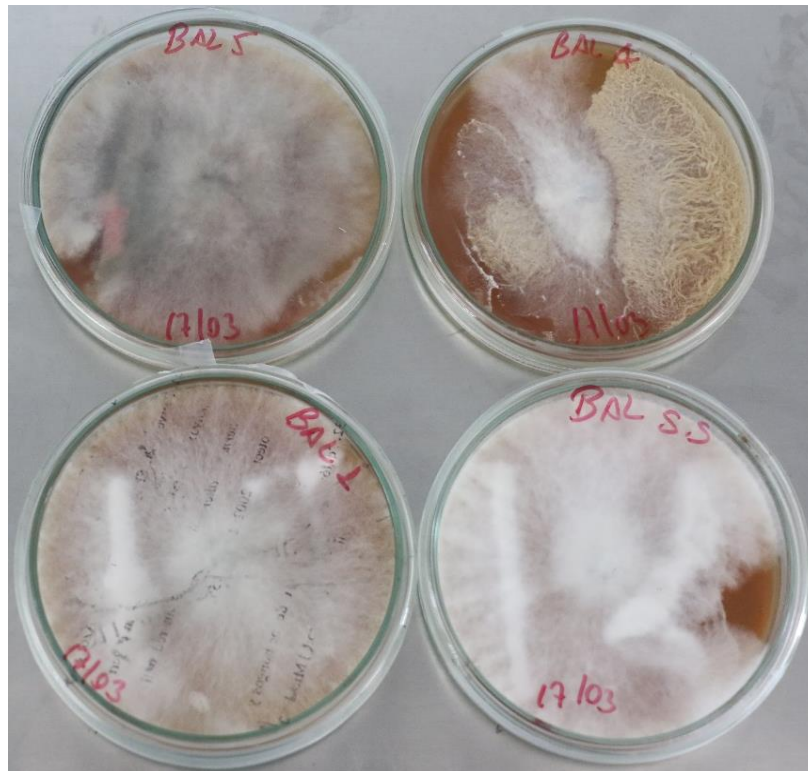


Fig. 10: Determinación de la capacidad antagonista de las bacterias ácido lácticas *Lasiodiplodia theobromae*.



Fig. 11: Cepa B4 mostrando una gran capacidad antagónica frente a *Lasiodiplodia theobromae*.

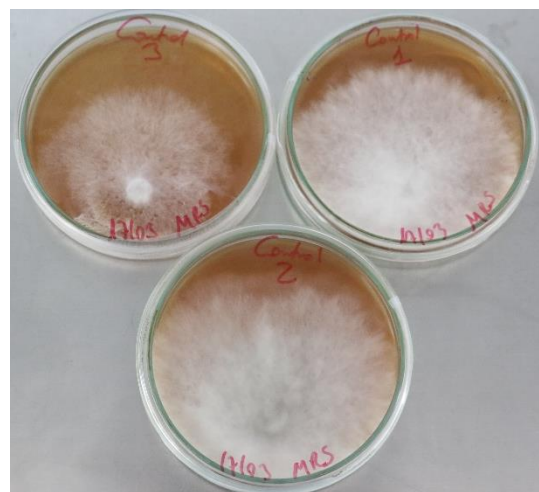


Fig. 12: Controles sembrados únicamente con *Lasiodiplodia theobromae* en medio MRS.



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE ICA

**FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN,
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**INFORME N° 4
TRABAJO DE CAMPO
Parte 2**

**DOCENTE INVESTIGADOR
HANNA CÁCERES YPARRAGUIRRE**

**Código ORCID N°
Código Orcid N° 0000-0001-5040-8950**

**CHINCHA ALTA, ICA-PERÚ
2022**

4.1. Descripción de la recolección de la información a través del trabajo de campo o experimentos en laboratorio.

- Sitio experimental

Las pruebas de antagonismo para cepa fitopatógena *Botrytis cinerea* se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Ica, ubicado en el distrito de Chincha Alta, provincia de Chincha y departamento de Ica.

- Muestras biológicas

Los aislados de las 13 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL, fueron obtenidas de un Banco de Germoplasma de Cepas Comercial aisladas de diferentes alimentos (uva, vino, leche, yogurt, entre otros). Previo a este trabajo se realizó otra investigación que permitió aislar cepa de *B. cinerea* proveniente de campos de cultivo de vid.

- Reactivación de *Botrytis cinerea*

Se realizó a partir de una placa Petri que contenía el cultivo madre, mediante repiques en el centro de la placa Petri (Fig. 1), se reactivaron un total de ocho placas con medio PDA y se dejó incubar por 7 días a temperatura ambiente.

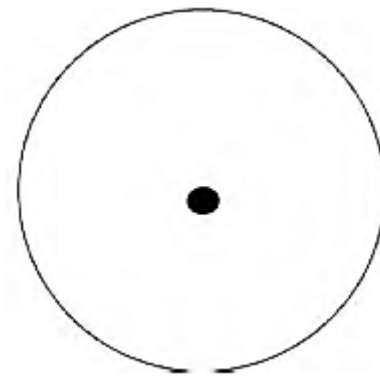


Fig. 1: Repique del hongo fitopatógeno en el centro de una placa Petri con medio PDA.

- Reactivación de Bacterias ácido lácticas.

La reactivación de las 7 cepas de bacterias ácido lácticas se realizaron en tubos de ensayo con 5mL de Caldo MRS, el pH fue ajustado a 6.2 con el uso de HCl, fueron llevadas al agitador a 200 rpm por un periodo de 24 – 48 horas a temperatura ambiente, asimismo se sembró por duplicado en placas con Agar MRS para ser caracterizadas.

Se reactivo con éxito las 7 cepas de bacterias ácido lácticas.

- Reactivación de Levaduras

La reactivación de las 13 cepas de levaduras se realizó en tubos con 5 mL de Caldo GPY, el pH fue ajustado a 5-8 +/- 0.2 con el uso de HCl, posteriormente fueron colocadas en el agitador a 200 rpm por un periodo de 24 – 48 horas a temperatura ambiente. De igual forma, las 13 cepas se sembraron por duplicado en placas con Agar GPY para su posterior caracterización morfológica.

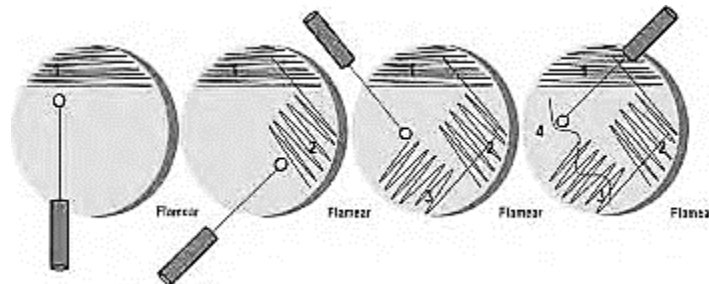


Fig. 2: Siembra por agotamiento y estría.

- Caracterización morfológica de cepas

Se realizó mediante la evaluación macroscópica tanto para levaduras como bacterias ácido lácticas, se tomaron ocho variables, de los cuáles fueron: Forma, tamaño, elevación, bordes, pigmentación, textura, opacidad y apariencia (Fig. 3).

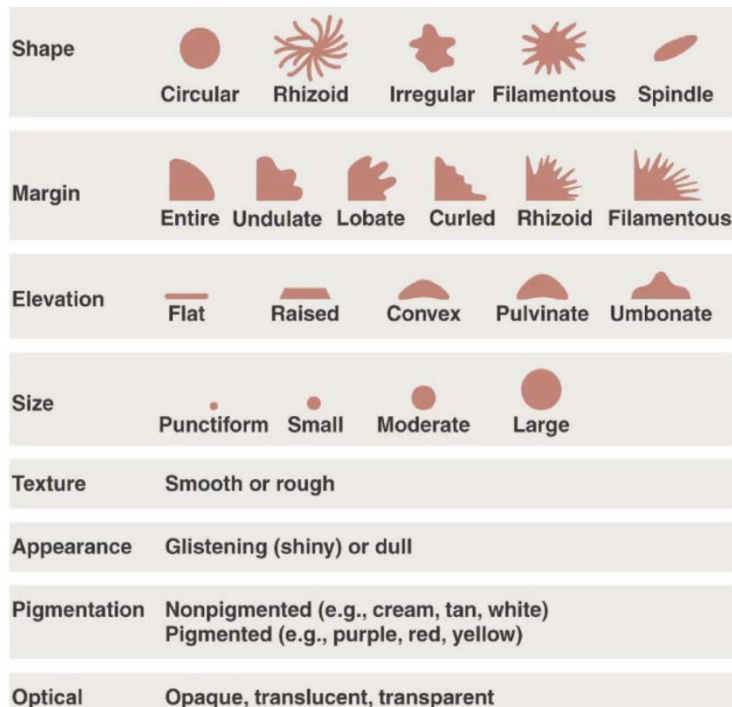


Fig. 3: Imagen de las ocho variables para la evaluación macroscópica.

- Ensayo para determinar la capacidad antagonista (segunda parte: cepa *Botrytis cinerea*)

Se determino por medio de la técnica de confrontación dual entre los microorganismos antagonistas (13 levaduras y 7 BAL) y una cepa fitopatógena (*Botrytis cinerea*).

Para la selección preliminar de aquellas cepas que muestren antagonismo contra el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, se determinó por el método directo conocido como enfrentamiento dual. Esta prueba consistió en el desarrollo simultáneo de las cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas antagonistas con el hongo fitopatógeno en placas Petri de 9 cm de diámetro con agar GPY y MRS, respectivamente; las cepas antagonistas se sembraron a 2 cm de distancia desde el borde de la placa, posteriormente, se colocó en el centro un disco de 8 mm del hongo fitopatógeno a trabajar, esto se realizó por duplicado mediante una estría con la cepa crecida en placas con su medio respectivo y la otra estría se realizó del sobrenadante de los pre inóculos. Como controles solo se usaron placas con los medios GPY y MRS sembradas solo con el hongo a 2 cm de distancia del borde de

la placa, con 3 repeticiones por cada medio de cultivo. Todas estas placas fueron llevadas a la incubadora a una temperatura de 26 °C durante 7 días y se observó el crecimiento a partir del 4to día para evaluar el crecimiento del micelio del fitopatógeno. El diámetro de la colonia se determinó a los siete días después de la inoculación y se calculó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$PICR = ((R1 - R2) / R1) * 100$$

Donde:

R1: radio mayor (radio del patógeno testigo)

R2: radio menor (radio del patógeno enfrentado con el antagonista)

- **Técnicas estadísticas para el procesamiento de los datos**

Los tratamientos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones cada uno. Se tendrá 20 tratamientos en total, donde 13 corresponden a cepas de levaduras y 7 a cepas de BAL.

4.2. Tabla de resultados.

- Descripción de las levaduras usadas

Tabla 2: Descripción del origen de levaduras usadas en la investigación

ESPECIES DE LEVADURAS	CÓDIGO MycoBank	AISLAMIENTO	MEDIO	T° y Ph (CRECIMIENTO)	CONSERVACIÓN
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	316067	Fermentación de la mermelada de ciruela			
<i>Tausonia pullulans</i>	812190	Medio ambiente			
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	258102	Vino de Estados Unidos			
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	325702	Mosto de uva			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	492348	Destilería		T° :24 °C – 26 °C	
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	263896	Vino	• Agar YM • Caldo YM.	Ph: 5.6 – 6.2	4 – 10 °C
<i>Pichia membranifaciens</i>	227217	Vino Alemán	• Agar Sabourand		
<i>Pichia guillermoundii</i>	513463	Mantequilla rancia	Dextrosa • Medio YPD		
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	488270	Mosto de uva			
<i>Debaryomyces hansenii</i>	296478	Sake de Japón			
<i>Candida parapsilosis</i>	253819	Bebedero de Puerto Rico		T° : 24 °C – 35 °C Ph: 5.6 – 6.2	
<i>Candida incommunis</i>	27439	Mosto de uva			
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	812190	Mosto de uva de Francia		T°: 24 °C - 26 °C Ph: 5.6 – 6.2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Bioplaguicida			

- **Descripción de las bacterias ácido lácticas usadas**

Tabla 3: Descripción del origen de bacterias ácido lácticas usadas en la investigación

ESPECIES	NOMBRE DE CEPA	AISLAMIENTO	MEDIO	T° y Ph (CRECIMIENTO)	CONSERVACIÓN
<i>Lactobacillus brevis</i>	Bb14	Estiércol de cerdo	Agar MRS Caldo MRS	T°: 30 °C Ph: 6.5 +/- 0.2	4 – 10 °C
<i>Lactobacillus reuteri</i>	F275	Estiércol de cerdo	Agar MRS Caldo MRS		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>			Agar MRS Caldo MRS	T°: 30 °C	
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>			Agar MRS Caldo MRS	Ph: 6.5 +/- 0.2	
<i>Enterococcus mundtii</i>			Agar MRS Caldo MRS	T°: 30 °C	
<i>Lactobacillus plantarum</i>			Agar MRS Caldo MRS	Ph: 6.5 +/- 0.2	
<i>Lactococcus lactis</i>	NCTC 6681	Cuajada	Medio ATCC	T° : 37 °C Ph: 7.4 +/- 0.2	

- **Caracterización de levaduras**

Para la caracterización fenotípica de levaduras en agar GPY se tomaron en cuenta diferentes variables, tal como se muestran en la tabla 4, Fig. 4 y 5.

Tabla 4: Descripción morfológica de levaduras usadas en la investigación

Especie	Código de cepa	Forma	Tamaño	Elevación	Bordes	Color	Textura	Opacidad	Apariencia
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	L1	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Cremoso	Opaco	Brillante
<i>Tausonia pullulans</i>	L2	Circular	Moderado	Elevado	Entero	Crema	Cremoso	Traslucido	Brillante
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	L3	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	L4	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Blanca	Seco	Opaco	No Brillante
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L5	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Candida parapsilosis</i>	L6	Circular	Moderado	Elevado	Entero	Blanca	Seco	Opaco	No Brillante
<i>Candida incommunis</i>	L7	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	L8	Circular	Puntiformes	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Debaryomyces hansenii</i>	L9	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	L10	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Crema	Seco	Opaco	No Brillante
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	L11	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Pichia guillermoundii</i>	L12	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante
<i>Pichia membranifaciens</i>	L13	Circular	Moderado	Elevado	Entero	Blanca	Liso	Opaco	No Brillante

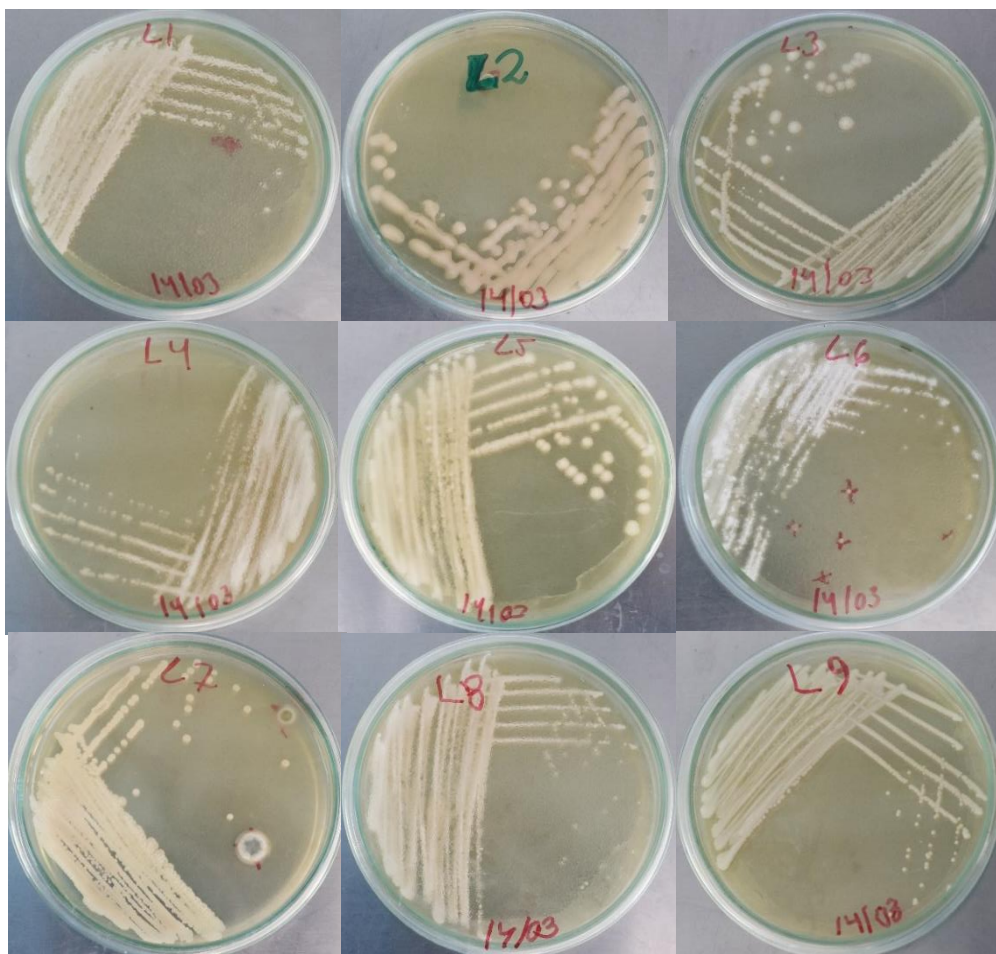


Fig. 4: Vista macroscópica de levaduras en placas Petri con medio GPY.

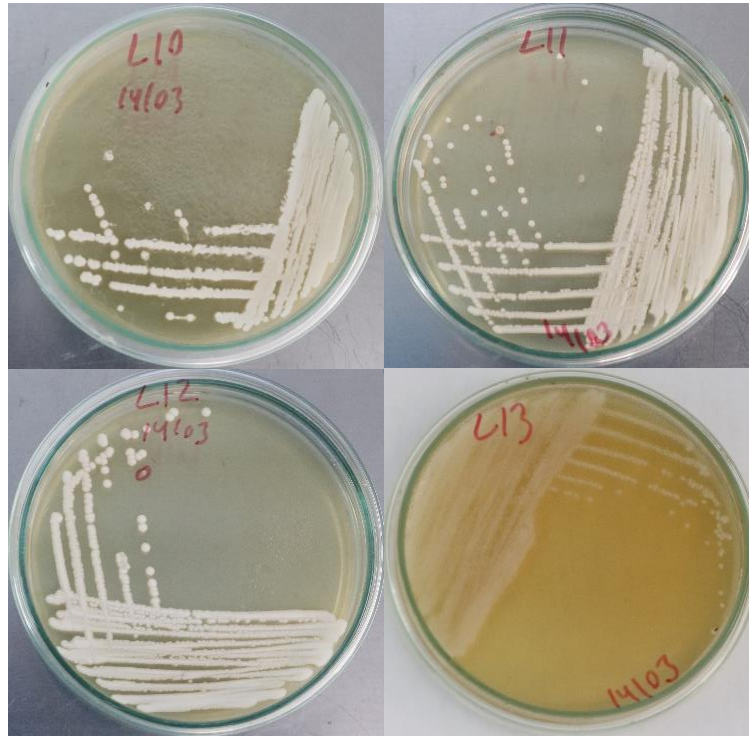


Fig. 5: Vista macroscópica de levaduras en placas Petri con medio GPY.

- **Caracterización de bacterias ácido lácticas**

Para la caracterización fenotípica de bacterias ácido lácticas en agar MRS, se tomaron en cuenta diferentes variables, tal como se muestran en la tabla 5, Fig. 6.

Tabla 5: Descripción morfológica de bacterias ácido lácticas usadas en la investigación

Especie	Forma	Tamaño	Elevación	Bordes	Color	Textura	Opacidad	Apariencia
<i>Lactobacillus lactis</i>	Circular	Pequeño	Convexo	Entero	Amarillo	Cremoso	No opaco	Brillante
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Circular	Pequeño	Convexo	Entero	Amarillo	Cremoso	No opaco	Brillante
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Crema	Cremoso	Opaco	Brillante
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Circular	Pequeño	Convexo	Entero	Crema	Cremoso	Opaco	Brillante
<i>Lactobacillus brevis</i>	Circular	Pequeño	Elevado	Entero	Crema	Cremoso	Opaco	Brillante
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Circular	Pequeño	Convexo	Entero	Blanca	Cremoso	No opaco	Brillante
<i>Enterococcus mundtii</i>	Circular	Moderado	Convexo	Entero	Crema	Cremoso	No opaco	Brillante

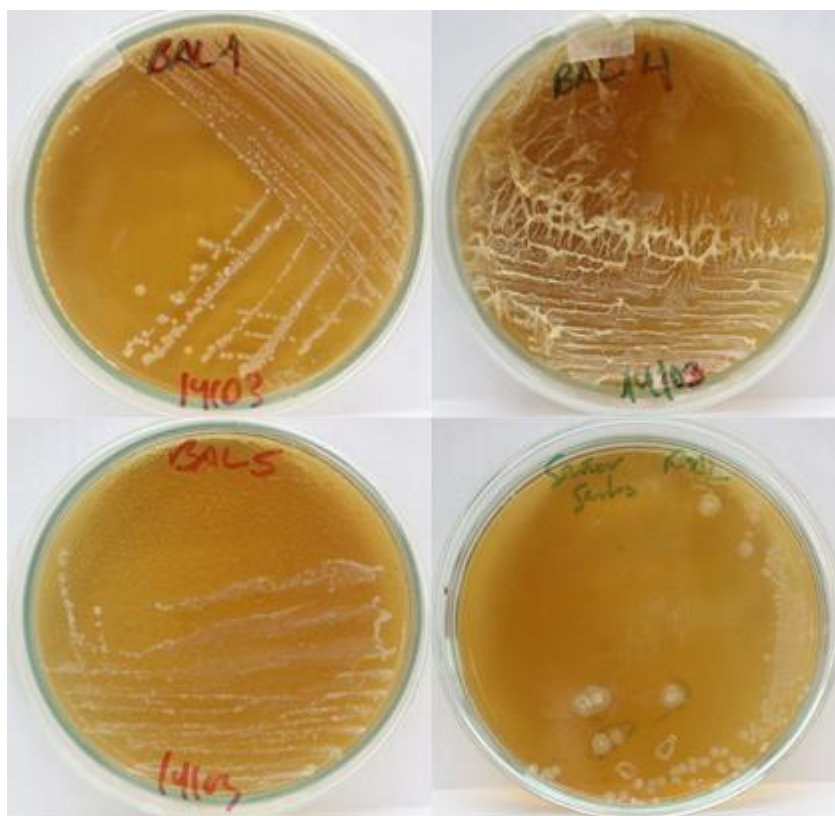


Fig. 6: Vista macroscópica de las bacterias ácido lácticas en placas Petri con medio MRS.

- **Pruebas de antagonismos de levaduras frente a *L. theobromae***

De las 13 cepas de levaduras, las cuáles fueron codificadas, solo tres especies resultaron tener una gran actividad antagonista frente a *Botrytis cinerea* (Fig. 7). Además, los resultados del porcentaje de inhibición se ejecutaron en base al promedio de las repeticiones por cepa. Estos valores se referencian en la Tabla 6, la cepa L2, L5 y L10 mostraron el mayor porcentaje de inhibición con un 81.97%, 76.53%, 88.78% para la estría sembrada con la cepa reactivada en placa y un 81.63%, 73,47% y 87.76% para la estría sembrada con el sobrenadante de la reactivación (Fig. 8). Por último, al 7mo día de enfrentamiento *Botrytis cinerea* creció 7 cm, no cubrió toda la placa de los 3 controles, tal como se muestra en la figura 9.

Tabla 6: Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* por la actividad antagonista de cepas de levaduras al séptimo día de enfrentamiento.

ESPECIE DE LEVADURA	CÓDIGO	% DE INHIBICIÓN		PROMEDIO
		Cultivo de placa	Cepa del Sobrenadante	
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	L1	62.59%	64.29%	63.43%
<i>Tausonia pullulans</i>	L2	81.97%	81.63%	81.63%
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	L3	60.20%	59.86%	60.03%
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	L4	47.62%	46.60%	47.10%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L5	76.53%	73.47%	75.00%
<i>Candida parapsilosis</i>	L6	68.03%	63.95%	65.98%
<i>Candida incommunis</i>	L7	39.46%	36.05%	37.75%
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	L8	65.31%	64.97%	65.13%

<i>Debaryomyces hansenii</i>	L9	57.48%	55.44%	56.46%
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	L10	88.78%	87.76%	88.26%
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	L11	49.66%	57.14%	53.40%
<i>Pichia guillermoundii</i>	L12	71.09%	69.05%	70.06%
<i>Pichia membranifaciens</i>	L13	51.70%	57.82%	54.76%



Fig. 7: Enfrentamiento dual de cepas de levaduras frente al *Botrytis cinerea*.



Fig. 8: Cepa L5 mostrando una gran actividad antagónica frente a *Botrytis cinerea*.

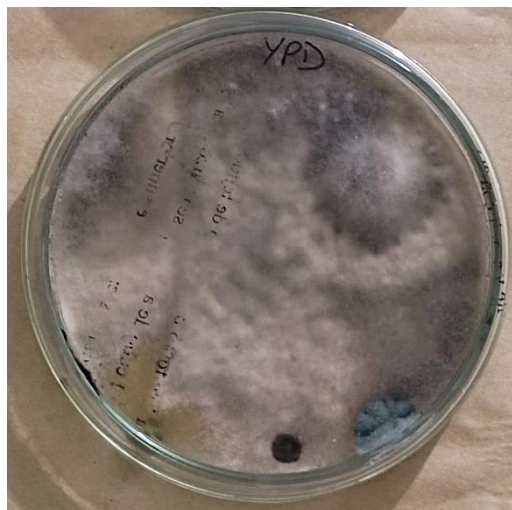


Fig. 9: Controles sembrados únicamente con *Botrytis cinerea* en medio GPY.

- **Pruebas de antagonismos de bacterias ácido lácticas frente a *Botrytis cinerea***

De las 07 cepas de bacterias ácido lácticas, éstas fueron codificadas, al igual que el caso de las levaduras solo una especie resultó tener una gran actividad antagonica frente a *Botrytis cinerea* (Fig. 10). Posteriormente, los resultados del porcentaje de inhibición se hicieron en base al promedio de las repeticiones por cepa. Estos valores se referencian en la Tabla 7, la cepa codificada como B5 fue la que mostró el mayor porcentaje de inhibición con un 73,36% para la estría sembrada con la cepa reactivada en placa y un 66,80% para la estría sembrada con 20 ul del sobrenadante de la cepa (Fig. 11).

Por último, al 7mo día de enfrentamiento dual *Botrytis cinerea* no invadió toda la placa de los tres controles (Fig. 12).

Tabla 7: Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* por la actividad antagonista de cepas de bacterias ácido lácticas al séptimo día de enfrentamiento.

ESPECIE DE LEVADURA	CÓDIGO	% DE INHIBICIÓN		PROMEDIO
		Cultivo de placa	Cepa del Sobrenadante	
Lactobacillus brevis	B1	42,62%	42,62%	42,62%
Lactobacillus plantarum	B2	43,44%	39,34%%	41,39%
Enterococcus mundtii	B3	56,97%	58,20%	57,58%
Lactobacillus reuteri	B4	29,51%	42,21%	35,86%
Lactococcus lactis	B5	73,36%	66,80%	70,08%
Gluconacetobacter diazotrophicus	B6	59,84%	53,28%	56,55%
Gluconacetobacter liquefaciens	B7	30,33%	28,69%	29,50%