



Universidad Nacional

SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
EVALUACION DE ORIGINALIDAD



INFORME DE REVISIÓN

Se ha realizado el análisis con el software antiplagio de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", por parte de la Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien deja:

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título es:

**Determinación de la capacidad antagonica de cepas de Bacillus spp.
aisladas de la rizósfera de Vitis vinífera frente a Botrytis cinérea**

Presentado por:

GABRIELA ALEXANDRA SALCEDO ASTORIMA

Del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** obteniéndose como resultado una coincidencia de **0%** otorgándosele el calificativo de:

APROBADO

Se adjunta al presenta el reporte de evaluación del software antiplagio.

Observaciones:

SE APRUEBA EL PRESENTE TRABAJO POR TENER UNA SIMILITUD INFERIOR AL LIMITE ESTABLECIDO EN EL REGLAMENTO CORRESPONDIENTE (MENOR A 20%).

Ica, 15 de Julio de 2022



ROSA BERTHA ALTAMIRANO DIAZ
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Ciencias Biológicas



**Determinación de la capacidad antagónica de cepas de *Bacillus spp.*
aisladas de la rizósfera de *Vitis vinifera* frente a *Botrytis cinerea***

**Tesis para optar el Título profesional de
BIÓLOGO**

**Línea de investigación: Salud pública y conservación del medio
ambiente**

Presentado por:

SALCEDO ASTORIMA, GABRIELA ALEXANDRA

Ica - Perú

2022

Dedicatoria:

A Dios por encaminarme, a mi madre y mi familia quienes me brindaron su apoyo en los momentos más difíciles, para superarme cada día y a mis maestros y mi asesora por su esfuerzo de apoyarme para que pudiera conseguir mi título.

Agradecimientos:

A la Mblga. Marianella Haydee Salinas Fuentes y el Dr. Luis Álvarez Bernaola, por su asesoría quienes con sus conocimientos, me guiaron y apoyaron durante cada etapa en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Escuela Profesional de Biología, por el apoyo brindado en mi formación académica como profesional.

Asimismo al Fundo Agro Victoria S.A.C, por el apoyo brindado para la ejecución de mi proyecto en los materiales y equipos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ESTRATEGIA METODOLOGICA.....	13
2.1. Material de estudio:.....	13
2.2. Técnicas e instrumentos de recolección de la información.....	13
2.2.1. Técnicas de recolección de la información	13
2.2.1.1. Toma de muestra.....	13
2.2.2. Instrumentos de recolección de la información.....	13
2.2.2.1. Procesamiento de la muestra.....	13
2.2.2.2. Aislamiento y selección cepas de <i>Bacillus spp.</i>	14
2.2.2.2.1. Aislamiento de <i>Bacillus spp.</i>	14
2.2.2.2.2. Selección de <i>Bacillus spp.</i> para obtención de cultivos puros.....	14
2.2.2.3. Evaluación de la capacidad antagónica de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> frente a <i>B. cinerea</i>	14
2.2.2.3.1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial	14
2.2.2.3.2. Competencia por sustrato.....	15
2.2.2.3.3. Producción de metabolitos volátiles	16
2.2.2.4. Identificación parcial de las cepas con capacidad antagónica.....	17
2.2.2.4.1. Caracterización macroscópica y microscópica	17
2.2.2.4.2. Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus spp.</i>	17
2.2.2.4.2.1. Prueba de catalasa	17
2.2.2.4.2.2. Prueba de oxidasa.....	18
2.2.2.4.2.3. Prueba de hidrólisis de almidón	18
2.2.2.4.2.4. Prueba de movilidad.....	18
2.2.2.5. Análisis e interpretación de los resultados.....	19
III. RESULTADOS.....	20
IV. DISCUSIÓN	37
V. CONCLUSIONES	40
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42
VIII. ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas de la rizósfera de <i>V. vinifera</i> del campo A y B de la Cooperativa Huacachina “Sector Hato” del distrito Ica	20
Tabla 2. Capacidad antagónica por competencia de sustrato de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo A frente a <i>B. cinerea</i>	27
Tabla 3. Capacidad antagónica por competencia de sustrato de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo B frente a <i>B. cinerea</i>	28
Tabla 4. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo A con actividad antagonista.....	32
Tabla 5. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo B con actividad antagonista.....	33
Tabla 6. Pruebas bioquímicas parciales de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A con actividad antagonista.....	34
Tabla 7. Pruebas bioquímicas parciales de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo B con actividad antagonista.....	34
Tabla 8. Diferencia significativa de la actividad antagónica de las cepas aisladas de los campos A y B de <i>Bacillus spp.</i> vs Serenade (cepa comercial) frente a <i>B. cinerea</i> a los 8 días	35
Tabla 9. Cepa de <i>Bacillus spp.</i> con mejor actividad antagónica frente a <i>B. cinerea</i> a los 8 días.	36
Tabla 10. Medición del crecimiento radial (cm /día) de <i>B. cinerea</i> frente a las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A y B a los 2, 4,6 y 8 días.	56
Tabla 11. Análisis de varianza de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A y B después de 2 días de enfrentamiento frente a <i>B. cinerea</i>	63
Tabla 12. Análisis de varianza de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A y B después de 4 días de enfrentamiento frente a <i>B. cinerea</i>	63
Tabla 13. Análisis de varianza de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A y B después de 6 días de enfrentamiento frente a <i>B. cinerea</i>	64
Tabla 14. Análisis de varianza de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A y B después de 8 días de enfrentamiento frente a <i>B. cinerea</i>	64
Tabla 15. Separación de medias de la actividad antagónica de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A y B frente a <i>B. cinerea</i>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1. Inhibición del crecimiento radial de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> frente a <i>B. cinerea</i> a los 8 días de incubación . A: M1A1, B: M2A1, C: M3A1, D: M1A2, E: M2A2, F: M3A2, G: Cepa comercial Serenade, H: M2A3, I: M3A3 y J: Control de <i>B. cinerea</i>	21
Figura. 2. Inhibición del crecimiento radial de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> frente a <i>B. cinerea</i> a los 8 días de incubación. A: M1B1, B: M2B1, C: M3B1, D: M1B2, E: M2B2, F: M3B2, G: M1B3, H: M2B3, I: M3B3, J: Control de <i>B. cinerea</i> . K: M2B4 y L: Cepa comercial Serenade.....	22
Figura. 3. Medidas de los radios de crecimiento de <i>B. cinerea</i> frente a las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A a los 2, 4, 6 y 8 días.....	23
Figura. 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de <i>B. cinerea</i> frente a las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo A a los 2, 4, 6 y 8 días.	24
Figura. 5. Medidas de los radios de crecimiento de <i>B. cinerea</i> frente a las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A a los 2, 4, 6 y 8 días.....	25
Figura. 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de <i>B. cinerea</i> frente a las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo A a los 2, 4, 6 y 8 días.	26
Figura. 7. Cambios macroscópicos e inhibición del crecimiento radial por la producción de metabolitos volátiles de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo A frente <i>B. cinerea</i> . A: M1A1, B: M2A1, C: M3A1, D: M1A2, E: M2A2, F: M3A2, G: Cepa comercial Serenade, H: M2A3, I: M3A3 y J: Control de <i>B. cinerea</i>	29
Figura. 8. Cambios macroscópicos e inhibición del crecimiento radial por la producción de metabolitos volátiles de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> aisladas del campo B frente <i>B. cinerea</i> . A: M1B1, B: M2B1, C: M3B1, D: M1B2, E: M2B2, F: M3B2, G: M1B3, H: M2B3, I: M3B3, J: Control de <i>B. cinerea</i> . K: M2B4 y L: Cepa comercial Serenade.	30
Figura. 9. Cambios micromorfológicos de la acción antagónica de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> frente a <i>B. cinerea</i> mediante la tinción azul de lactofenol (400 X). A: Control <i>B. cinerea</i> se identifica las estructuras de conidios (a) y conidióforo (b), B, C y D: Filamentos malformados y ausencia de conidióforos.....	31
Figura. 10. Muestreo en zigzag para la toma de muestra de la rizósfera de <i>V. vinifera</i>	48
Figura. 11. Toma de muestra de la rizósfera de <i>V. vinifera</i> del campo A.....	48
Figura. 12. Toma de muestra de la rizósfera de <i>V. vinifera</i> del campo B.	49
Figura. 13. Toma de muestra de la rizósfera de <i>V. vinifera</i> con una profundidad de 20 cm....	49
Figura. 14. Características de la cepa de <i>B. cinerea</i> . A: Observación macroscópica de la colonia de <i>B. cinerea</i> anverso de la placa, B: Observación macroscópica de la colonia de <i>B. cinerea</i> en reverso de la placa y C: Observación microscópica de <i>B. cinerea</i>	50

Figura. 15. Flujograma del procedimiento del aislamiento de las cepas de <i>Bacillus spp.</i> de la rizósfera de <i>V. vinifera</i>	51
Figura. 16. Flujograma del procedimiento de la prueba antagonista radial de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> frente a <i>B. cinerea</i>	52
Figura. 17. Crecimiento radial del control de <i>B. cinerea</i> . A: A los 2 días, B: A los 4 días, C: A los 6 días y D: A los 8 días.....	53
Figura. 18. Inhibición del crecimiento radial de la cepa comercial Serenade frente <i>B. cinerea</i> . A: A los 2 días, B: A los 4 días, C: A los 6 días y D: A los 8 días.	54
Figura. 19. Inhibición del crecimiento radial de la cepa M1A3 frente <i>B. cinerea</i> . A: A los 2 días, B: A los 4 días, C: A los 6 días y D: A los 8 días	55
Figura. 20. Flujograma del procedimiento de metabolitos volátiles de las cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i> frente a <i>B. cinerea</i>	59
Figura. 21. Morfología de las cepas seleccionadas de <i>Bacillus spp.</i> del campo A. A: M1A1, B: M2A1, C: M3A1, D: M1A2, E: M2A2, F: M3A2, G: M2A3 y H: M3A3.	60
Figura. 22. Morfología de las cepas seleccionadas de <i>Bacillus spp.</i> del campo B. A: M1B1, B: M2B1, C: M3B1, D: M1B2, E: M2B2, F: M3B2, G: M1B3, H: M2B3, I: M3B3 y J: M2B4.	61
Figura. 23. Características macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Bacillus spp.</i> , A: Características macroscópicas B: Características microscópicas mediante la tinción Gram (1000 X) y C: Características microscópicas mediante la tinción de esporas de Shaeffer Fulton (1000 X).....	62
Figura. 24. Pruebas bioquímicas de la cepa de <i>Bacillus spp.</i> A: Prueba de catalasa (positiva), B: Prueba de oxidasa (positiva), C: Prueba de hidrolisis de almidón (positiva) y D: Prueba de movilidad (positiva).....	62

RESUMEN

El género *Bacillus* tiene una gran capacidad biocontroladora a través de diferentes mecanismos de defensa frente al desarrollo de fitopatógenos, por tanto el presente trabajo tiene como objetivo aislar cepas de *Bacillus spp.* de la rizósfera de *Vitis vinifera* con capacidad antagonica frente a *Botrytis cinerea* en la Cooperativa Huacachina “Sector Hato”, el muestreo se realizó mediante la técnica de zig-zag en el campo A y B, las cepas seleccionadas se evaluaron por su capacidad antagonica mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, competencia de sustrato (escala de Ezziyyani) y la producción de metabolitos volátiles, se utilizó como control positivo *B. amyloliquefaciens* QST 713 (Serenade). Para la identificación parcial de las cepas antagonicas se utilizaron las pruebas morfológicas y bioquímicas. Se aislaron 18 cepas de *Bacillus spp.* con actividad antagonista frente *B. cinerea*. La inhibición radial de las cepas del campo A y B fue del 62-73% y de 53 -71% respectivamente, con un grado de escala de 2 ($\frac{1}{2}$ invasión de la superficie de la cepa patógena), 3 (total invasión de la superficie de la cepa patógena) y 4 (total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella), siendo todas las cepas positivas en la producción de metabolitos volátiles. Las cepas que tuvieron mejor actividad antagonica fueron 6 cepas, no encontrándose diferencia significativa con la cepa control. En cuanto a la identificación todas las cepas pertenecieron al género *Bacillus*. Se concluye que las cepas aisladas de *Bacillus spp.* tienen efecto antagonico frente a *B. cinerea*.

Palabras clave: *Bacillus spp.* , *Botrytis cinerea*, actividad antagonista, control biológico.

ABSTRACT

The *Bacillus* genus has a great biocontrol capacity through different defense mechanisms against the development of phytopathogens, therefore the present work aims to isolate strains of *Bacillus spp.* of the rhizosphere of *Vitis vinifera* with antagonistic capacity against *Botrytis cinerea* in the Huacachina "Sector Hato" Cooperative, the test was carried out using the zig-zag technique in field A and B, the selected strains were evaluated for their antagonistic capacity by means of the percentage of radial growth inhibition, substrate competition (Ezziyyani scale) and the production of volatile metabolites, was obtained as positive control *B. amyloliquefaciens* QST 713 (Serenade). For the partial identification of the antagonistic strains, morphological and biochemical tests were used. 18 strains of *Bacillus spp.* with antagonistic activity against *B. cinerea*. Radial inhibition of field strains A and B was 62-73% and 53-71%, respectively, with a scale degree of 2 (½ invasion of the surface of the pathogenic strain), 3 (total invasion of the surface of the pathogenic strain) and 4 (total invasion of the surface of the pathogenic strain, sporulation on it), all strains being positive in the production of volatile metabolites. The strains that had the best antagonistic activity were 6 strains, with no significant difference being found with the control strain. Regarding the identification, all the strains belonged to the genus *Bacillus*. It is concluded that the isolated strains of *Bacillus spp.* they have an antagonistic effect against *B. cinerea*.

Key words: *Bacillus spp.* , *Botrytis cinerea*, antagonist activity, biological control.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* es una bacteria Gram positiva que se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial en diversos hábitats, como en ecosistemas acuáticos y terrestres¹, este género se caracteriza por ser aerobios estrictos o en ocasiones anaerobios facultativos, presentar una morfología bacilar de tamaño variable que oscila de 0.5 a 10 μm ². Son bacterias esporuladas que soportan ambientes de condiciones extremas permitiendo su sobrevivencia por largos periodos de tiempo³.

Este género se encuentra principalmente en los suelos debido a que son saprófitos, donde utilizan una gran diversidad de sustratos orgánicos⁴. Su importancia en el suelo radica porque es un secretor de proteína y metabolitos eficientes que promueven el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno, donde favorecen la producción de reguladores de crecimiento brindando sus beneficios a la agricultura y al medio ambiente, debido que es más eficaz que un fertilizante químico⁵.

El género *Bacillus* ha evidenciado una actividad biocontroladora frente a bacterias y hongos; con diversas especies como *B. subtilis*, *B. plummilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*; siendo ampliamente estudiadas como controles biológicos frente a las enfermedades de importancia agrícola⁶. Entre los principales mecanismos de defensa frente al desarrollo de organismos fitopatógenos son las excreciones de antibióticos, enzimas líticas, sideróforos, toxinas e inducción de resistencia sistémica de la planta⁷. En la producción de compuestos antimicrobianos, donde destacan tres familias importantes de lipopéptidos como las surfactinas, iturinas y fengicinas; estas son bioactivas en un amplio rango de fitopatógenos⁸. Además sintetizan enzimas líticas como quitinasas, β -1-3- glucanasas, que degradan la pared de los hongos, también pueden causar lisis, donde esta acción les permite liberar oligómeros de quitina y glucano, siendo esto una defensa de la planta⁹.

Otro mecanismo de *Bacillus spp.* es la capacidad de sintetizar sideróforos, debido a que el hierro es un elemento importante para la vida de los organismos y también es factor limitante en el suelo rizosférico³, este género tiene la capacidad de regular la concentración de hierro en el medio a través de su proceso de quelación¹⁰, por eso estas bacterias tienen una gran ventaja competitiva frente a los fitopatógenos que no lo producen¹¹.

Este microorganismo también presenta un mecanismo de respuesta sistémica inducida, que se activa por elicitores durante la interacción con agentes patógenos y por activarse no solo en el sitio de la infección, sino en otros tejidos de una manera sistémica¹², lo cual le sirve para defenderse de la invasión de patógenos como hongos. Investigaciones ponen en evidencia que este microorganismo produce compuestos orgánicos volátiles¹³, como control frente a los fitopatógenos.

En la actualidad el cultivo de *V. vinifera* viene siendo afectado por el hongo *B. cinerea*, donde este hongo provoca grandes pérdidas económicas en la agroexportación¹⁴; debido a que afecta severamente a las bayas en épocas de cosecha causando “la podredumbre gris” y esto se incrementa cuando las condiciones ambientales, son favorables para su crecimiento como la alta humedad y una temperatura que oscila entre 15 a 25 grados¹⁵. Este hongo fitopatógeno se alimenta inicialmente de los nutrientes endógenos de su espora cuando las condiciones no son óptimas, para después absorber los nutrientes provenientes de los tejidos vivos, senescentes o muertos de la planta, cuando llega a presentar micelios, conidióforos y conidias se forma un abundante inoculo de infección en los tejidos florales, bayas y hojas en el cultivo de vid¹⁶. Incluso la infección es mayor cuando las bayas presentan resquebrajamiento y heridas por insectos o pájaros, siendo una infección directa por esporas o micelios¹⁷.

El control se realiza generalmente por agroquímicos, presentando un gran problema para la salud y medio ambiente, también puede causar una resistencia por parte de los patógenos y la residualidad de estos productos químicos en el suelo, planta y en el agua. Por eso las investigaciones hoy en día, están enfocados al estudio de microorganismos benéficos que tiene la capacidad de interfieren en el ciclo biológico de los patógenos¹⁸.

Conociendo la actividad biocontroladora del género *Bacillus*, se justifica el amplio uso de cepas para el control de enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas, esto se sustenta en diferentes estudios sobre este microorganismo, donde describen la evaluación de su eficacia de las cepas de *B. subtilis*, *B. amyloquefaciens* y *B. ginsengihumi* frente a *B. cinerea*¹⁹; en otro análisis se determinó el efecto antagonista de los compuestos orgánicos volátiles (COV'S) producidos por *B. subtilis* frente al crecimiento de *B. cinerea*²⁰; también otros estudios han determinado el efecto de biocontrol de *Bacillus spp.* contra *Botrytis sp.* en plantas de arándanos²¹; además hay investigaciones donde aislaron cepas nativas de *Bacillus spp.* en los suelos de campo de *V. vinifera* donde se evaluó la capacidad antagonista frente al patógeno *B. cinerea*²².

Adicionalmente, algunas especies del género *Bacillus* han sido declaradas organismos seguros para la salud o el ambiente GRAS (Generally Recognized as Safe por sus siglas en inglés), para su comercialización y uso²³. También destaca en el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) como agentes de control biológico (ACB), siendo una alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas causada por distintas enfermedades y reduciendo la contaminación de los suelos y mantos acuíferos²⁴.

Sin embargo es importante el aislamiento y evaluación de las cepas nativas en cuanto a su eficiencia en sus mecanismos de control biológico frente a un fitopatógeno, en la introducción de un agrosistema, para conocer si tiene una mayor eficiencia que una cepa industrial, ya que las condiciones ambientales pueden cambiar de acuerdo a su ecosistema.

Por lo cual el objetivo de la investigación fue aislar cepas de *Bacillus spp.* de la rizósfera de *V. vinifera* con capacidad antagonista frente a *B. cinerea*, determinado la capacidad antagonista y

la producción de metabolitos volátiles, con la finalidad de emplear estas cepas nativas en un futuro como un biofungicida y a la vez también reducir el uso de agroquímicos que causa un impacto negativo en el medio ambiente y en la salud humana debido a su residualidad.

II. ESTRATEGIA METODOLOGICA.

2.1. Material de estudio:

- El suelo procedente de la rizósfera de *V. vinifera* “Vid” del campo A y B de la Cooperativa Huacachina “Sector Hato” del distrito Ica.
- Cepa de *B. cinerea*, procedente del laboratorio de producción de agrobiológicos - Fundo Agro Victoria.
- Control positivo: *B. amyloliquefaciens* (cepa QST 713) del producto comercial Serenade (Cepa procedente del laboratorio de producción de agrobiológicos - Fundo Agro Victoria).

2.2. Técnicas e instrumentos de recolección de la información

2.2.1. Técnicas de recolección de la información

2.2.1.1. Toma de muestra

Se recolectaron las muestras en dos diferentes zonas del distrito de Ica, en la Cooperativa Huacachina –“Sector Hato”, con las coordenadas para el campo A 14°07'42.6''S 75°44'18.5''W y B 14°07'14.2''S 75°44'36.0''W. En cada recolección de muestra se siguió un muestreo de recorrido en zig-zag²⁵ en los campos de cultivos de vid, donde se tomó 15 submuestras (extremos laterales y central del campo) de cada zona con una profundidad 10 a 20 cm de suelo rizosférico, luego fueron agrupadas en 3 muestras. Para después proceder con la homogenización, envasado e identificación de las muestras, donde luego fueron procesadas en el laboratorio de producción de agrobiológico del Fundo AgroVictoria²⁶. Anexos (Fig. 10, 11, 12,13)

2.2.2. Instrumentos de recolección de la información

2.2.2.1. Procesamiento de la muestra

Para cada muestra procedente de la rizósfera, se realizó un tamizado previamente con la finalidad de eliminar las obstrucciones como resto de raíces u hojarascas entre otros. Para la dilución se empleó el método Standard Methods (1998), donde se pesó 10 g de la muestra, y se adicionó a 90 ml del diluyente (agua peptonada al 0,1%) a esta dilución se le realizó un pre-tratamiento térmico a baño a María a 80°C por 15 minutos para eliminar los microorganismos no esporulados, luego se

procedió a enfriar las muestras para poder realizar las diluciones seriadas hasta 10^{-6} en solución salina (0,85% P/V NaCl). Anexo (Fig.15)

2.2.2.2. Aislamiento y selección cepas de *Bacillus spp.*

2.2.2.2.1. Aislamiento de *Bacillus spp.*

De la dilución de 10^{-2} hasta 10^{-6} se sembró por superficie 0,1 ml en placas con agar nutritivo (AN), utilizando la espátula de Drigalski estéril y luego se llevó a incubar a 28°C durante 48 horas²⁷.

2.2.2.2.2. Selección de *Bacillus spp.* para obtención de cultivos puros.

Luego de la incubación se seleccionaron las colonias con las características macromorfológicas como su forma irregular, con bordes que varía entre aserrada, lobulada u ondulada y elevación que puede ser planas o acuminadas, como características micromorfológicas, se procedió a realizar la Tinción Gram y Tinción Shaeffer Fulton. Luego se procedió a realizar siembras en tubos de AN, para obtener cultivos puros y proceder a su evaluación.

2.2.2.3. Evaluación de la capacidad antagónica de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea*

2.2.2.3.1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

Para evaluar el porcentaje de inhibición radial primeramente se reactivó la cepa del hongo fitopatógeno en el medio de agar de papa dextrosa (PDA) y se procedió a incubar por 7 días a 28°C. Así mismo las cepas seleccionadas se sembraron en caldo tripticosa soya (TBS) durante 24 horas a 28°C.

La determinación de la capacidad antagonista se realizó mediante la técnica de cámara dual descrita por Bell et al²⁸, esta prueba consiste en el desarrollo simultáneo de la bacteria antagónica y el patógeno, en placas con el medio de PDA (sin cloranfenicol) bajo las mismas condiciones.

El método consistió en sembrar la cepa bacteria en los extremos de una placa de agar PDA (sin cloranfenicol) haciendo una estría vertical, luego se procedió a colocar una disco de 5 mm del hongo fitopatógeno (previamente sembrado en un agar PDA por 7 días a 28°C) en el centro de la placa, luego se llevó a incubar a 28°C por 7 días. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa, donde se utilizó como control el hongo sembrado sin ninguna cepa bacteriana y también se utilizó como control positivo comercial Serenade que contiene a la cepa *B. amyloliquifaciens* que se trabajó de la misma forma. Anexo (Fig.16)

Cada 48 horas se tomó las mediciones del radio de la colonia fúngica, hasta que el crecimiento del control del hongo llegue a cubrir toda la placa²⁹. Anexos (Fig. 17, 18 y 19)

Donde después se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de inhibición, el cual se determinó por la siguiente ecuación³⁰:

$$\text{Porcentaje de inhibición: } \left(\frac{R1-R2}{R1} \right) * 100$$

R1: Radio de la colonia control del hongo fitopatógeno *B. cinerea*.

R2: Radio de la colonia enfrentado con la bacteria.

2.2.2.3.2. Competencia por sustrato

Para determinar la capacidad del biocontrol se observó el crecimiento o no crecimiento de la bacteria frente al hongo y la lectura se realizó de acuerdo a la escala de grados antagónicos propuesto por Ezziyyani et al³⁰.

Capacidad antagónica grado 0: Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol muy malo.

Capacidad antagónica grado 1: ¼ Invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol malo.

Capacidad antagónica grado 2: ½ Invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol deficiente.

Capacidad antagónica grado 3: Total invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol bueno.

Capacidad antagónica grado 4: Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella. Potencial controlador biológico es muy bueno.

2.2.2.3.3. Producción de metabolitos volátiles

Para determinar la inhibición del crecimiento del patógeno mediante la producción de metabolitos volátiles por las cepas bacterianas aisladas, se siguió los protocolos propuestos por Montealegre et al. (2003) con algunas modificaciones³¹.

Consistió en utilizar dos bases de la placa Petri; en una base conteniendo agar nutritivo (AN) se sembró por superficie con ayuda de la espátula Drigalsky, 100 ul de cada cepa aislada previamente reactivada en TSA. En la otra base de la placa de Petri se colocó el medio de cultivo PDA (con cloranfenicol) y se sembró un disco de 5 mm de diámetro en el centro de la placa del hongo patógeno *B. cinerea*. Luego se procedió a colocar las dos bases una frente a la otra, sin dejar espacio entre las dos placas, donde se procedió a sellar con Parafilm. En el caso del control difiere en que no se sembró en agar nutritivo la bacteria. Anexo (Fig. 20)

Las placas se llevaron a incubar a 28°C durante 7 días. Pasado el tiempo de incubación se observó si el bacilo inhibía el crecimiento de *B. cinerea* y se procedió a la lectura.

Metabolitos volátiles positivos = Aquellas cepas que inhibieron el crecimiento total de *B. cinerea* y también aquellas que tuvieron un crecimiento menor al control.

Metabolitos volátiles negativos = Se observó que no presentaban inhibición al crecimiento *B. cinerea*.

Luego se procedió a realizar a las cepas que dieron metabolitos volátiles positivos una observación macroscópica para ver si habría cambios en la colonia (menos algodonosa o presenta una disminución en la coloración) respecto al control y una coloración con azul de lactofenol para observar microscópicamente a 400 X, para ver si había cambios micromorfológicos (hifas tortuosas, no presencia de esporas o de conidióforos)^{32,33}.

2.2.2.4. Identificación parcial de las cepas con capacidad antagónica

Las cepas que dieron positivas a las pruebas antagónicas, se le realizó las siguientes pruebas de identificación.

2.2.2.4.1. Caracterización macroscópica y microscópica

Se procedió a sembrar las cepas en agar nutritivo e incubarlas por 24 – 48 horas a 28°C. Se caracterizó morfológicamente, teniendo en cuenta la forma, borde y elevación según las pruebas descritas en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology³⁴. Luego se realizó la Tinción Gram para la ver la forma y tipo de pared, así mismo la Tinción de Shaeffer Fulton para ver la presencia de esporas y disposición³⁵. Anexos (Fig.21, 22)

2.2.2.4.2. Pruebas bioquímicas de *Bacillus spp.*

Se realizó las siguientes pruebas bioquímicas como: la prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de movilidad e hidrólisis de almidón.

2.2.2.4.2.1. Prueba de catalasa

La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias, que sintetizan catalasa e hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso.

Esta prueba consistió en colocar en un portaobjeto con ayuda del asa bacteriológica, un inóculo de la bacteria y luego se procedió a agregar 1 gota de agua oxigenada³⁶.

Prueba positiva = Desprendimiento de burbujas.

Prueba negativa = No hay desprendimiento de burbujas.

2.2.2.4.2.2. Prueba de oxidasa

Esta prueba se utiliza para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromo-oxidasa. Esto sucede en presencia de oxígeno atmosférico la enzima intracelular citocromooxidasa oxida el reactivo fenilendiamina y forma una coloración azul violácea. (indofenol).

Para realizar esta prueba con el asa bacteriológica se tomó un inóculo de la colonia, el cual se depositó sobre la zona reactiva de Bactident Oxidasa³⁷.

Prueba positiva = Presencia de la coloración azul violácea.

Prueba negativa = Sin aparición de color.

2.2.2.4.2.3. Prueba de hidrólisis de almidón

Esta prueba es para determinar la capacidad de la bacteria en hidrolizar el almidón por acción enzimática secretando amilasas.

En esta prueba consistió en utilizar placa Petri con agar almidón, en la cual se sembró la bacteria por estría y luego se llevó a incubar a 28°C por 24 horas a 48 horas, después se agregó 5 gotas de lugol^{38,39}.

Prueba positiva = Cuando se observa un halo transparente alrededor de la bacteria.

Prueba negativa = Cuando mantiene la coloración azul- negro alrededor de la bacteria.

2.2.2.4.2.4. Prueba de movilidad

Esta prueba es para verificar si tienen las bacterias motilidad por medios de flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos.

En esta prueba se sembró por puntura la muestra

en un agar SIM (sulfuro indol para movilidad) y se llevó a incubar a 28°C por 24 horas³⁸.

Prueba positiva = Si la bacteria migra de la línea de siembra y se difunde en el medio, donde se observa el medio turbio.

Prueba negativa = El crecimiento de la bacteria solo crece en la línea de siembra y el medio se mantiene claro.

2.2.2.5. Análisis e interpretación de los resultados.

Los datos y las pruebas estadísticas se evaluaron empleando el programa SAS System para Windows Version 9.4 con 95% de confianza.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de *V. vinifera* del campo A y B de la Cooperativa Huacachina “Sector Hato” del distrito Ica .

Cepas de <i>Bacillus spp.</i> con capacidad antagónica		
	Campo A	Campo B
	M1A1 (+)	M1B1(+)
	M1A2 (+)	M1B2(+)
	M1A3 (-)	M1B3(+)
	M2A1 (+)	M2B1(+)
	M2A2 (+)	M2B2(+)
	M2A3 (+)	M2B3(+)
	M3A1 (+)	M2B4(+)
	M3A2 (+)	M3B1(+)
	M3A3 (+)	M3B2(+)
		M3B3(+)
Total:	9	10

(+) Presentó actividad antagonista frente a *B. cinerea*.

(-) No presentó actividad antagonista frente a *B. cinerea*.

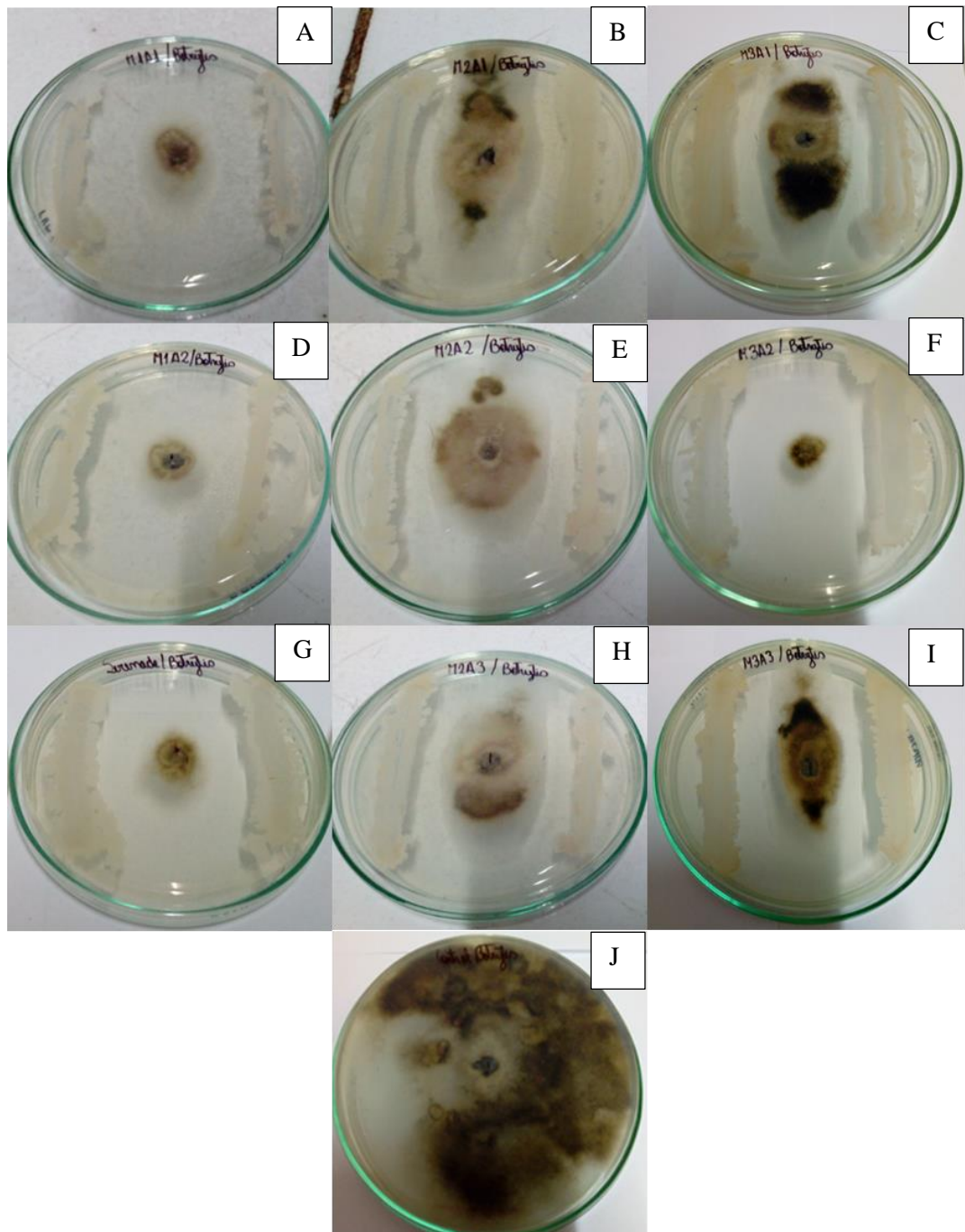


Figura. 1. Inhibición del crecimiento radial de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea* a los 8 días de incubación . A: M1A1, B: M2A1, C: M3A1, D: M1A2, E: M2A2, F: M3A2, G: Cepas comerciales Serenade, H: M2A3, I: M3A3 y J: Control de *B. cinerea*

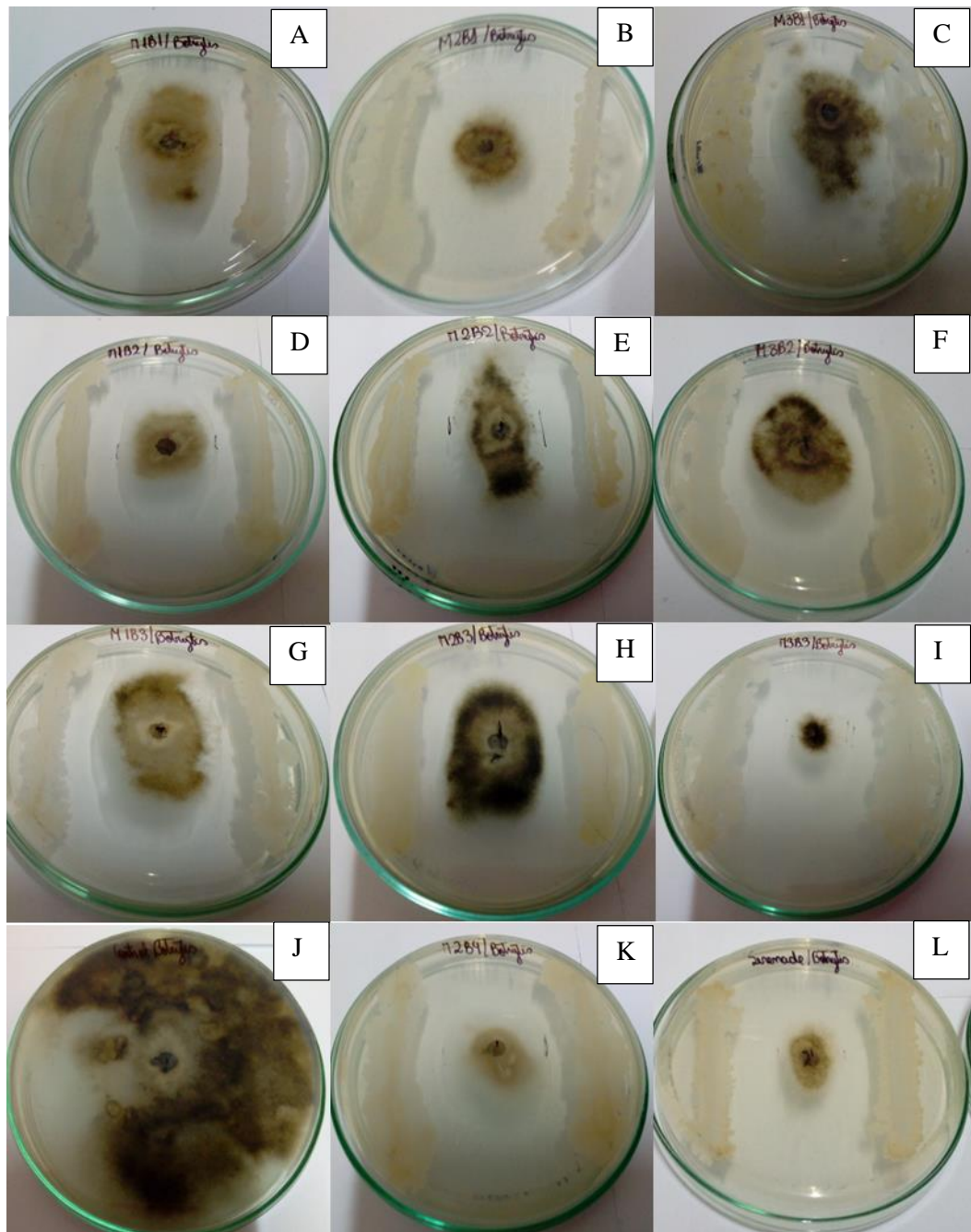


Figura. 2. Inhibición del crecimiento radial de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea* a los 8 días de incubación. A: M1B1, B: M2B1, C: M3B1, D: M1B2, E: M2B2, F: M3B2, G: M1B3, H: M2B3, I: M3B3, J: Control de *B. cinerea*. K: M2B4 y L: Cepa comercial Serenade.

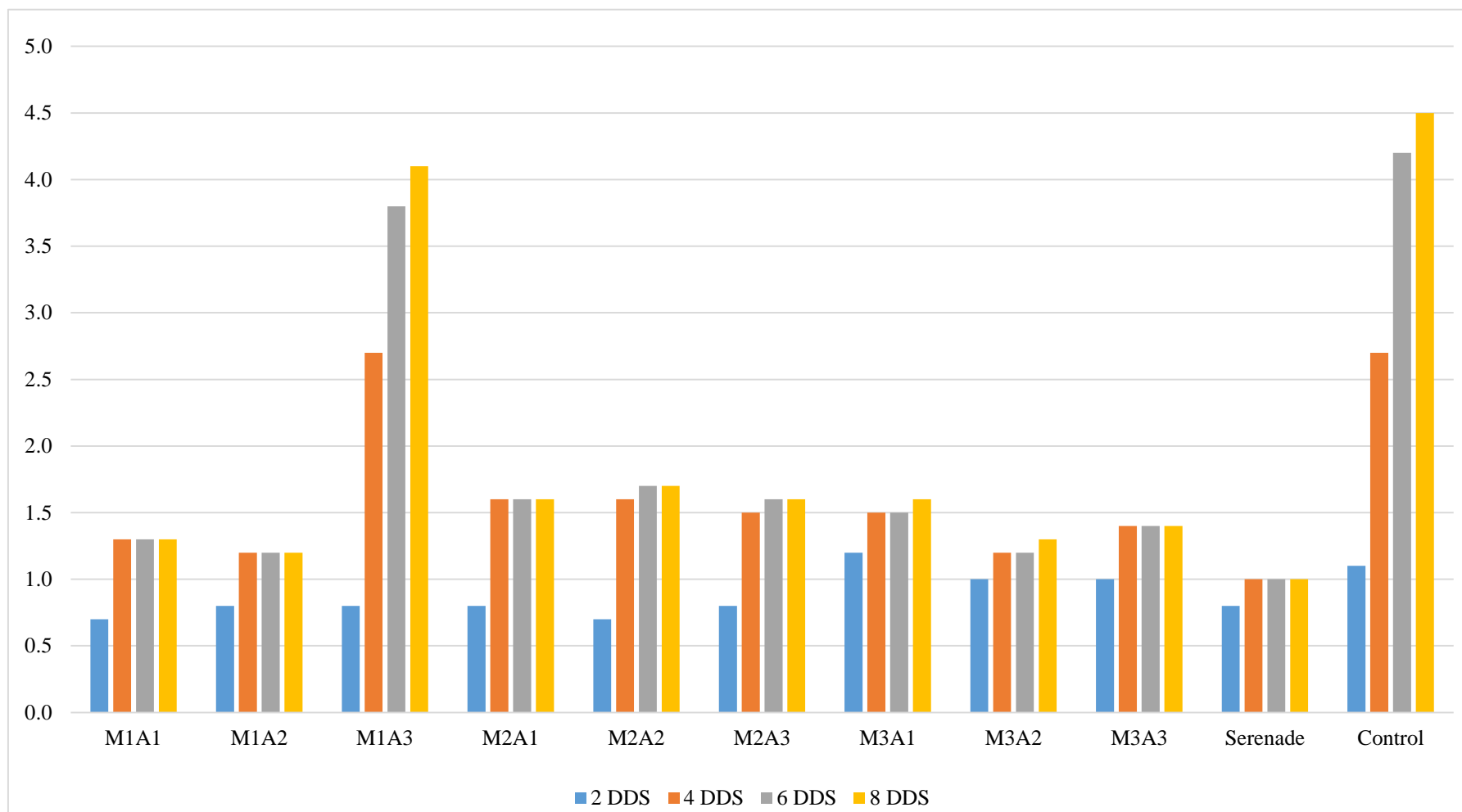


Figura. 3. Medidas de los radios de crecimiento de *B. cinerea* frente a las cepas aisladas de *Bacillus* spp. del campo A a los 2, 4, 6 y 8 días.

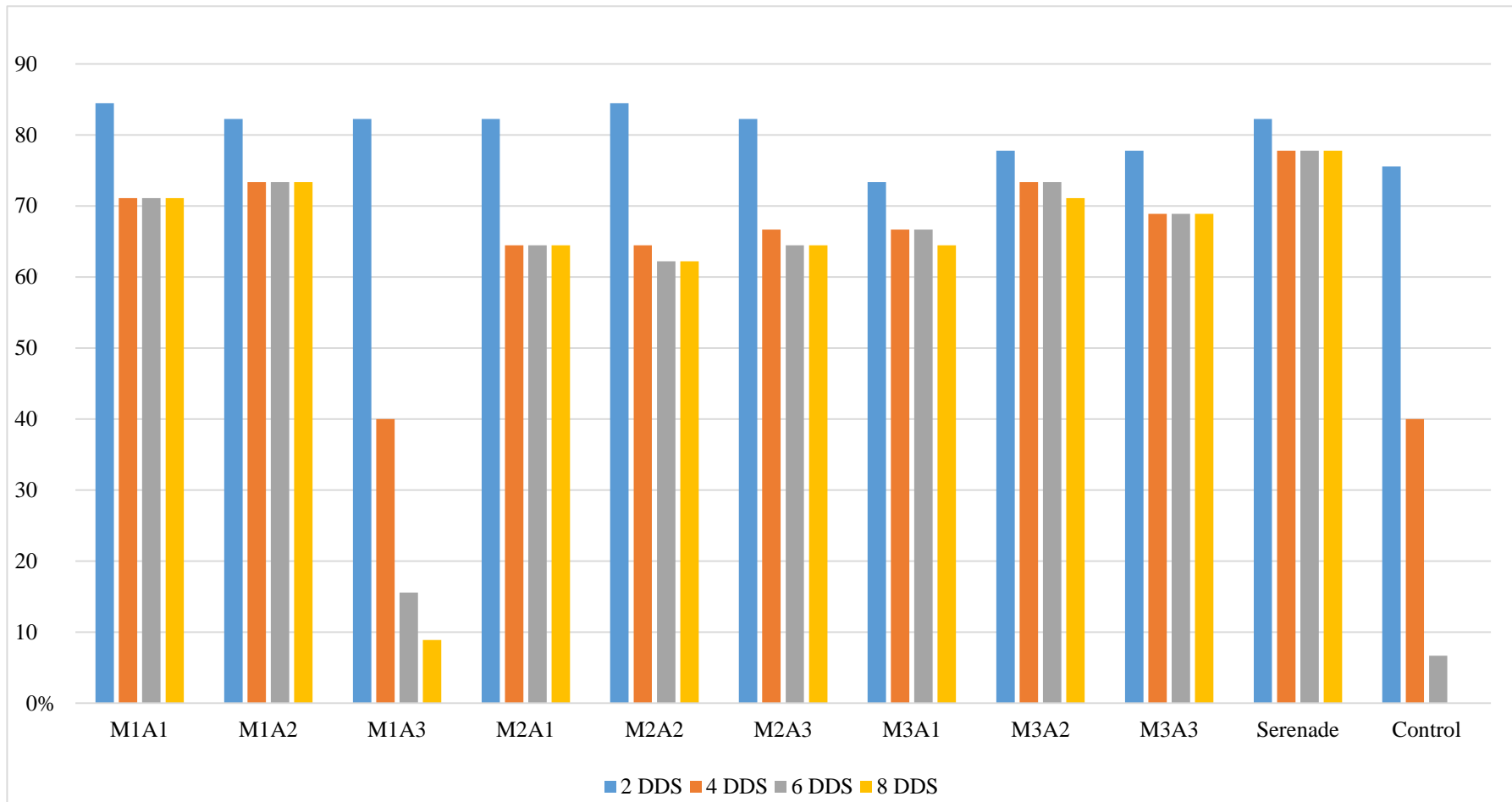


Figura. 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* frente a las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo A a los 2, 4, 6 y 8 días.

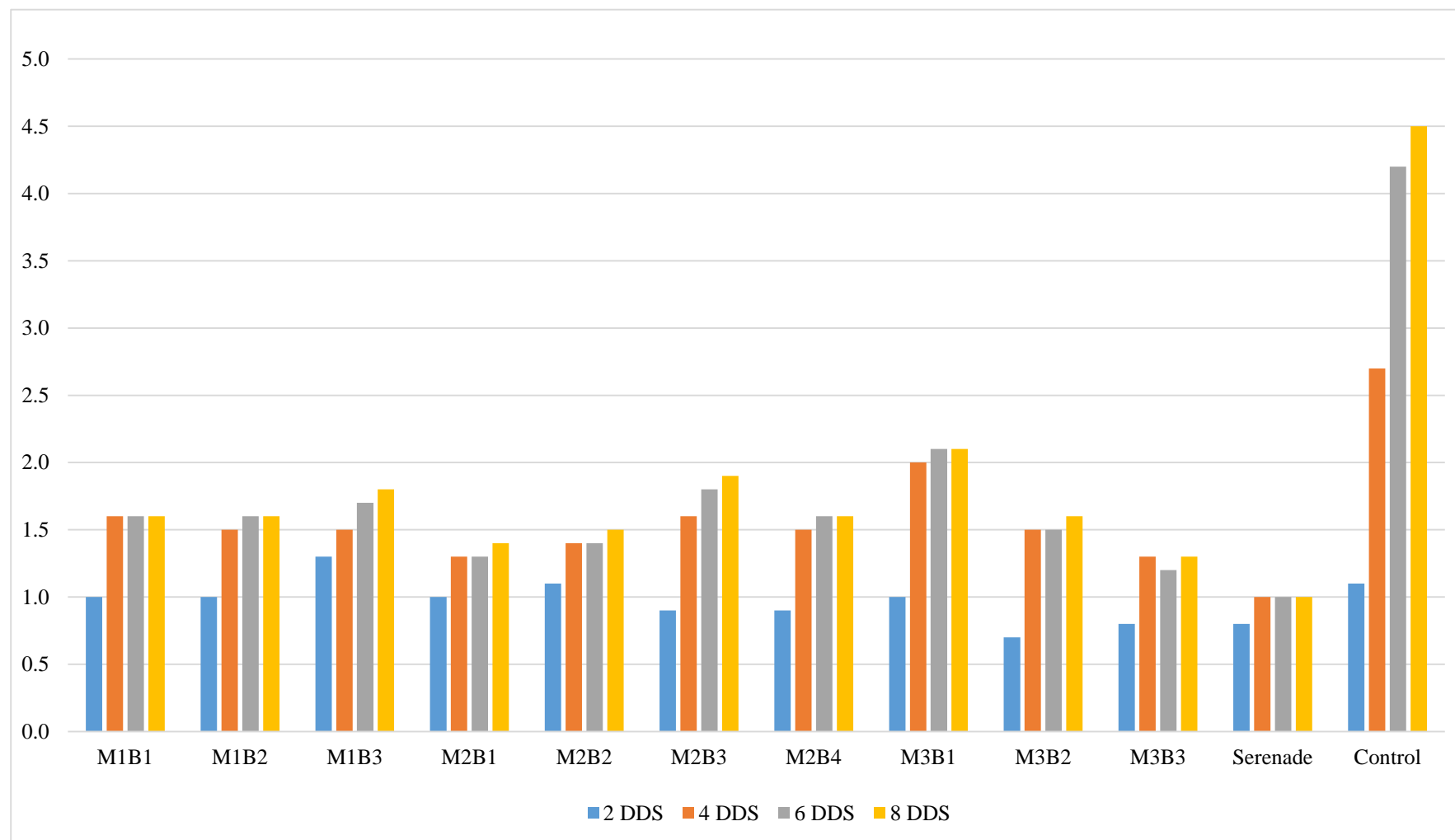


Figura 5. Medidas de los radios de crecimiento de *B. cinerea* frente a las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo B a los 2, 4, 6 y 8 días.

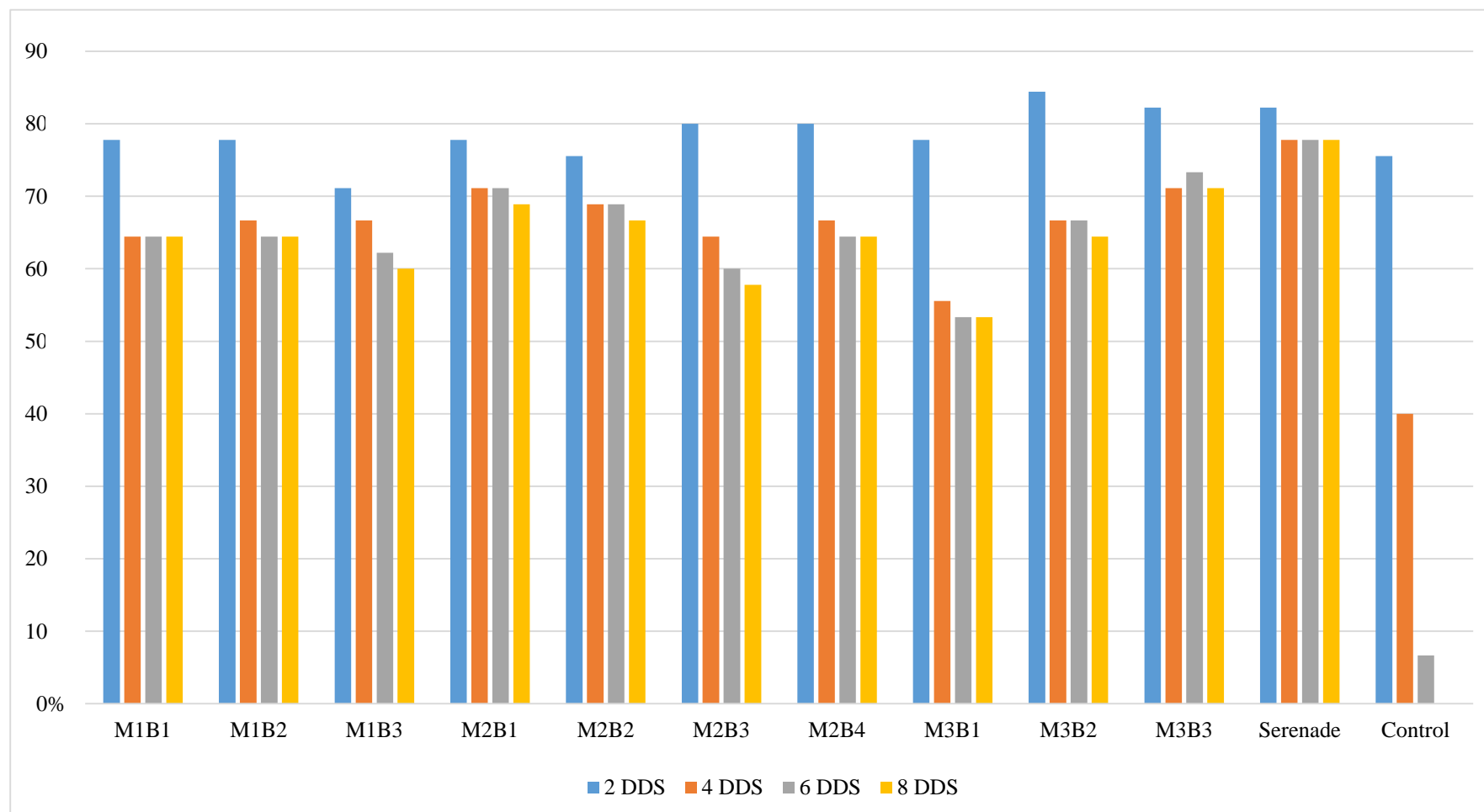


Figura. 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* frente a las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo B a los 2, 4, 6 y 8 días.

Tabla 2. Capacidad antagónica por competencia de sustrato de las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo A frente a *B. cinerea* .

Cepas de <i>Bacillus spp.</i>	Grado de escala
Serenade	4
M1A1	4
M1A2	4
M2A1	2
M2A2	2
M2A3	2
M3A1	2
M3A2	4
M3A3	3

Escala de Ezziyyani et al.

Grado 2: $\frac{1}{2}$ Invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol deficiente.

Grado 3: Total invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol bueno.

Grado 4: Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella. Potencial controlador biológico es muy bueno.

Tabla 3. Capacidad antagónica por competencia de sustrato de las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo B frente a *B. cinerea* .

Cepas de <i>Bacillus spp.</i>	Grados de escala
Serenade	4
M1B1	2
M1B2	2
M1B3	2
M2B1	3
M2B2	3
M2B3	2
M2B4	3
M3B1	2
M3B2	2
M3B3	4

Escala de Ezziyyani et al.

Grado 2: $\frac{1}{2}$ Invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol deficiente

Grado 3: Total invasión de la superficie de la cepa patógena. Potencial biocontrol bueno

Grado 4: Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella. Potencial controlador biológico es muy bueno.

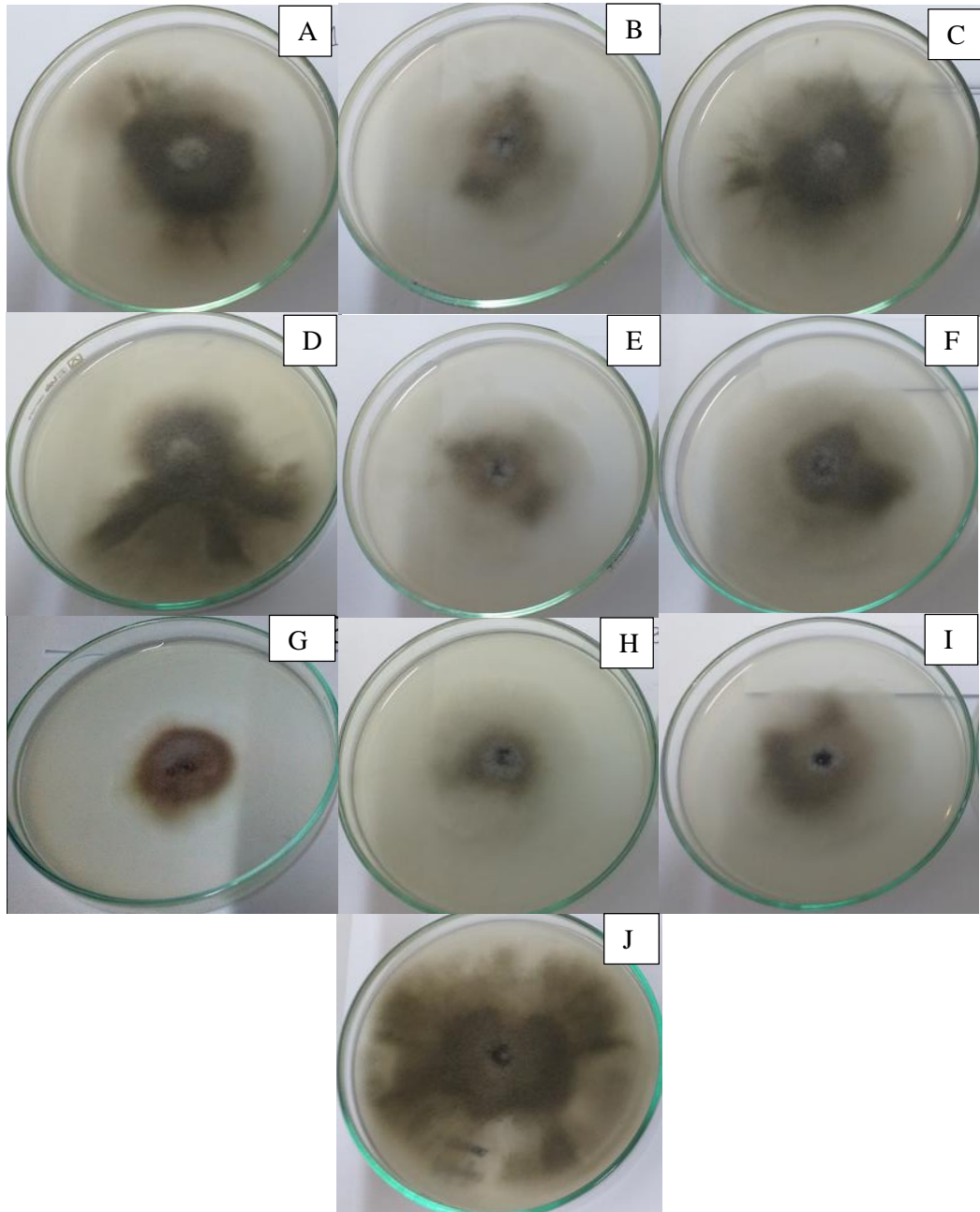


Figura. 7. Cambios macroscópicos e inhibición del crecimiento radial por la producción de metabolitos volátiles de las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo A frente *B. cinerea*. A: M1A1, B: M2A1, C: M3A1, D: M1A2, E: M2A2, F: M3A2, G: Cepa comercial Serenade, H: M2A3, I: M3A3 y J: Control de *B. cinerea*.

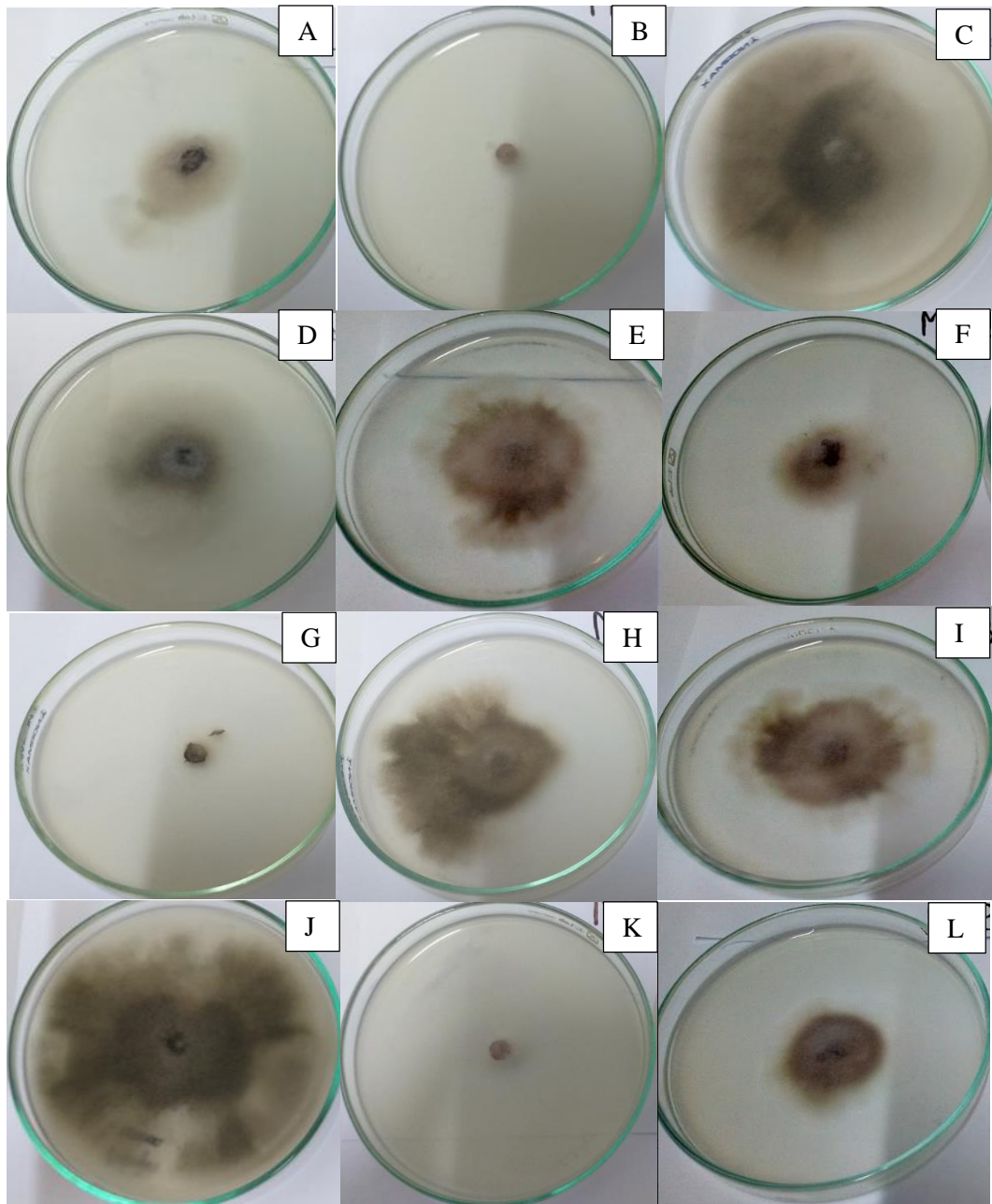


Figura. 8. Cambios macroscópicos e inhibición del crecimiento radial por la producción de metabolitos volátiles de las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo B frente *B. cinerea*. A: M1B1, B: M2B1, C: M3B1, D: M1B2, E: M2B2, F: M3B2, G: M1B3, H: M2B3, I: M3B3, J: Control de *B. cinerea*. K: M2B4 y L: Cepa comercial Serenade.

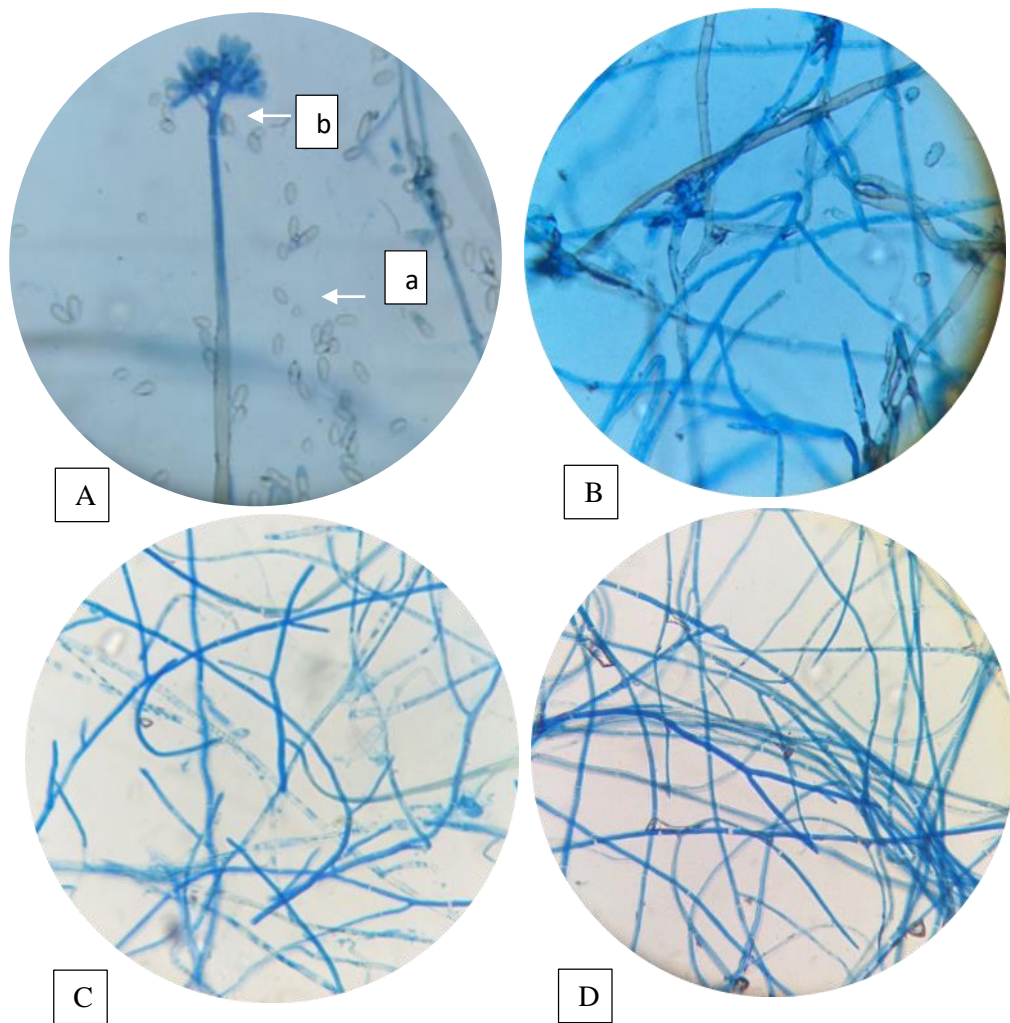


Figura. 9. Cambios micromorfológicos de la acción antagonista de las cepas de *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea* mediante la tinción azul de lactofenol (400 X). A: Control *B. cinerea* se identifica las estructuras de conidios (a) y conidióforo (b), B, C y D: Filamentos malformados y ausencia de conidióforos.

Tabla 4. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo A con actividad antagonista.

Cepas de <i>Bacillus spp.</i>	Observación macroscópica y microscópica		
	Observación macroscópicas	Tinción Gram	Tinción Shaeffer- Fulton
M1A1	Colonias pequeñas, transparente, consistencia mucosa, forma irregular, elevación convexa y margen lobulado.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes cuadrados en cadenas.	Esporas terminales
M1A2	Colonias pequeñas, transparente, consistencia cremosa, forma irregular, elevación plana y margen lobulada.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados en cadenas.	Esporas terminales
M2A1	Colonias medianas, transparente, consistencia mucosa, forma irregular, elevación umbilicado y margen lobulada.	Bacilos pequeños con cadenas cortas Gram (+), con bordes cuadrados.	Esporas subterminales
M2A2	Colonias medianas, transparente, consistencia mucosa, forma irregular, elevación umbilicado y margen lobulada.	Bacilos medianos que forman cadenas cortas Gram (+).	Esporas terminales
M2A3	Colonias grandes, transparente, consistencia mucosa, forma irregular, elevación convexa y margen ondulada.	Bacilos pequeños con bordes rectos Gram (+).	Esporas terminales
M3A1	Colonias grandes, trasparente, consistencia cremosa, forma irregular, elevación umbilicado y margen lobulado.	Bacilos pequeños Gram (+), con bordes rectos en cadenas cortas.	Esporas terminales
M3A2	Colonias grandes, transparente, consistencia mucosa, elevación elevada y margen lobulado.	Bacilos pequeños Gram (+) en cadenas cortas y bordes redondeados.	Esporas subterminales
M3A3	Colonias grandes, transparente, consistencia cremosa, elevación umbilicado y margen lobulado.	Bacilos pequeños Gram (+), en cadenas cortas y con bordes rectos.	Esporas terminales

Tabla 5. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del campo B con actividad antagonista.

Cepas de <i>Bacillus spp.</i>	Observación macroscópica y microscópica		
	Observación Macroscópicas	Tinción Gram	Tinción Shaeffer- Fulton
M1B1	Colonias pequeñas, transparente, consistencia cremosa, forma irregular, elevación convexa y margen lobulado.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados.	Esporas terminales
M1B2	Colonias pequeñas, transparente, consistencia cremosa, forma irregular, elevación convexa y margen lobulada.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados.	Esporas subterminales
M1B3	Colonias medianas, transparente, consistencia mucosa, forma irregular, elevación elevado y margen lobulado.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados.	Esporas terminales
M2B1	Colonias pequeñas, opacas, consistencia cremosa, forma irregular, elevación plano y margen lobulado.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados.	Esporas terminales
M2B2	Colonias medianas, opacas, consistencia mucosa, forma irregular, elevación umbilicado y margen lobulado.	Bacilos medianos Gram (+) con bordes redondeados.	Esporas terminales
M2B3	Colonias medianas, transparente, consistencia mucosa, forma irregular, elevación convexo y margen filamentosos.	Bacilos pequeños Gram (+) con bordes redondeados.	Esporas subterminales
M2B4	Colonias pequeñas, opacas, consistencia cremosa, forma irregular, elevación elevada y margen ondulado.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados en cadenas.	Esporas terminales
M3B1	Colonias medianas, transparente, consistencia cremosa, elevación umbilicado y margen ondulado.	Bacilos medianos Gram (+), con bordes redondeados en cadenas cortas.	Esporas terminales
M3B2	Colonias medianas, transparente, consistencia mucosa, elevación umbilicado y margen ondulado.	Bacilos medianos Gram (+) con bordes redondeados en cadenas.	Esporas terminales
M3B3	Colonias grandes, transparente, consistencia mucosa, elevación elevado y margen lobulado.	Bacilos pequeños Gram (+), en cadenas cortas.	Esporas terminales

Tabla 6. Pruebas bioquímicas parciales de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A con actividad antagonista.

Cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i>	Pruebas Bioquímicas			
	Catalasa	Oxidasa	Hidrólisis de almidón	Movilidad
M1A1	+	+	+	+
M1A2	+	+	+	+
M2A1	+	+	+	+
M2A2	+	+	+	+
M2A3	+	+	+	+
M3A1	+	+	+	+
M3A2	+	+	+	+
M3A3	+	+	+	+

+: Positivo a la prueba bioquímica

Tabla 7. Pruebas bioquímicas parciales de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo B con actividad antagonista.

Cepas aisladas de <i>Bacillus spp.</i>	Pruebas Bioquímicas			
	Catalasa	Oxidasa	Hidrólisis de almidón	Movilidad
M1B1	+	+	+	+
M1B2	+	+	+	+
M1B3	+	+	+	+
M2B1	+	+	+	-
M2B2	+	+	+	+
M2B3	+	+	+	+
M2B4	+	+	+	+
M3B1	+	+	+	+
M3B2	+	+	+	+
M3B3	+	+	+	+

+: Positivo a la prueba bioquímica

-: Negativo a la prueba bioquímica

Tabla 8. Diferencia significativa de la actividad antagónica de las cepas aisladas de los campos A y B de *Bacillus spp.* vs Serenade (cepa comercial) frente a *B. cinerea* a los 8 días .

Cepas de <i>Bacillus spp.</i>	Actividad antagónica a los 8 días
Serenade	1,1 a
M1A1	1,3 a b c
M1A2	1,2 a b
M2A1	1,6 d e f g
M2A2	1,7 d e f g
M2A3	1,6 b c d e f
M3A1	1,6 c d e f g
M3A2	1,3 a b c
M3A3	1,4 a b c d e
M1B1	1,6 c d e f g
M1B2	1,6 c d e f g
M1B3	1,7 f g h
M2B1	1,4 a b c d
M2B2	1,5 b c d e f
M2B3	1,9 g h
M2B4	1,6 c d e f g
M3B1	2,1 h
M3B2	1,6 c d e f
M3B3	1,3 a b c

H₀: Las cepas aisladas de *Bacillus spp.* presentan diferencia significativa frente al producto comercial Serenade.

H₁: Al menos una de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* no presenta diferencia significativa frente al producto comercial Serenade.

Grado de confianza: 95%

Anexo (Tabla 10)

Tabla 9. Cepa de *Bacillus spp.* con mejor actividad antagónica frente a *B. cinerea* a los 8 días.

Cepas de <i>Bacillus spp.</i>	Actividad antagónica a los 8 días
Serenade	1,1 a
M1A1	1,3 a b c
M1A2	1,2 a b
M3A2	1,3 a b c
M3A3	1,4 a b c d e
M2B1	1,4 a b c d
M3B3	1,3 a b c

IV. DISCUSIÓN

Se conoce hoy en día que el género *Bacillus* tiene mecanismos de acción contra las enfermedades de las plantas, causadas por bacterias y hongos⁴⁰, siendo usado como un principal controlador biológico, por consiguiente al analizar el suelo procedente de la rizósfera de los campos A y B de *V. vinifera* de la Cooperativa Huacachina “Sector Hato”, se aislaron 19 cepas a las cuales se denominaron con las siglas; M1A1, M1A2, M1A3, M2A1, M2A2, M2A3, M3A1, M3A2, M3A3 (9 cepas), M1B1, M1B2, M1B3, M2B1, M2B2, M2B3, M2B4, M3B1, M3B2, M3B3 (10 cepas), de las cuales la cepa M1A3 no tuvo actividad antagónica. Tabla 1

Las 18 cepas de *Bacillus spp.* mostraron actividad antagonista frente a *B. cinerea*, esta actividad puede deberse a diferentes mecanismo de acción como su gran capacidad de producir una variedad de antibióticos, que son capaces de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos entre estos, los más estudiados son los lipopéptidos cíclicos no ribosomales⁴¹; la producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes patógenos de origen fúngico⁴²; también la capacidad de sintetizar sideróforos, lo que regula la concentración de hierro en el medio, esto ocasiona que este metal no se encuentre disponible para los microorganismos patógenos¹⁰ y el mecanismo de resistencia sistémica inducida (ISR), que son activados por elicitores durante la interacción con agentes patógenos haciendo que se active no solo en el sitio de la infección, sino de manera sistémica en otros tejidos que no están haciendo afectados¹². Fig. 1 y 2

Al evaluar el efecto antagónico mediante el porcentaje de inhibición radial, se demuestra un efecto antagónico frente al hongo fitopatógeno *B. cinerea*, en caso de las cepas del campo A oscilaron entre los porcentajes 62 – 73%, siendo la mejor cepa M1A2 con 73 % y en caso de las cepas del campo B oscilaron entre los porcentajes 53-71%, siendo la mejor cepa M3B1 con 71%, datos similares se obtuvo entre los rangos de porcentajes de inhibición del campo B como lo que se reportaron en aislamientos de cepas de *Bacillus spp.* de la rizósfera de *V. vinifera* var. Moscato de Alejandria frente *B. cinerea*²²; así mismo los resultados obtenidos en el efecto antagónico de *B. subtilis* sobre el crecimiento de *B. cinerea* que son datos más cercanos entre los rangos de inhibición de los campos A y B²⁰.

Este mecanismo de defensa frente a los hongos se debe posiblemente a la producción de compuestos antimicrobianos producidos por el género *Bacillus* en lo que destacan tres familias de lipopéptidos como las surfactinas, iturinas y fengicinas, donde han sido ampliamente estudiadas su actividad antimicrobiana, que tiene una interacción con la membrana citoplasmática de células fúngicas, esto provoca la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que ocasiona la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos^{43,44}. Fig. 3, 4, 5 y 6. Anexo (Tabla 10)

Se evaluó además la competencia por sustrato utilizando la tabla propuesta por Ezziyyani et al. de acuerdo a los grados 0-4, dando como resultado para las cepas del campo A y B rangos de 2 (½ invasión de la superficie de la cepa patógena), 3 (total invasión de la superficie de la cepa patógena) y 4 (total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella), esto es debido que este género coloniza más rápido en el sustrato, donde asimila los nutrientes necesarios para su desarrollo, lo que causa que se establezca en el medio en un menor tiempo, a comparación con el hongo fitopatógeno que no tiene espacio para crecer en el sustrato⁴⁵; así mismo se conoce que *B. subtilis* tiene un rápido crecimiento el cual inhibe la formación de conidios en hongos fitopatógenos, los cuales se ven afectados por la falta de espacio y nutrientes para su desarrollo, esto causa que sea incapaces de competir con la bacteria⁴⁶. Tabla 2 y 3

En cuanto a la actividad antifúngica el género *Bacillus* produce metabolitos difundidos como volátiles que protegen directamente a las plantas contra los fitopatógenos, estos compuestos pueden ser grupos de ésteres, alcanos, alquenos, alquinos, alcoholes, terpenoides, aldehídos y cetonas⁴⁷, en los que se destacan el benzotiazol, el benzaldehído, el fenilacetaldehído, el ciclohexanol, 2-etil-1hexanol, el 2,3-butanodio, entre otros de los que se ha comprobado que poseen actividad antimicrobiana⁴⁸. Donde es posible que cualquiera de estos compuestos estén presentes en las cepas del campo A y B las cuales presentaron metabolitos volátiles, que se observa cambios macroscópicamente como menos algodonosa, disminución de la coloración e inhibición del crecimiento radial respecto al control. Fig. 5 y 6 Así mismo se observó cambios micromorfológicos en donde se observa que las hifas tenían unos aspectos tortuosos, y no presentaron conidióforos ni esporas, esto concuerda con la investigación donde dice que diferentes especies de *Bacillus spp.* poseen proteínas con actividad antifúngica que causa lisis y alteraciones morfológicas en las hifas⁴⁹. Fig.7

A las 18 cepas aisladas con capacidad antagónica se procedió a realizar su identificación parcial (caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica), donde se observa características macroscópicas típicas del género *Bacillus* como son su forma irregular, margen lobulado u ondulada y elevaciones de las colonias con una consistencia mucosa o cremosa similares y en la características microscópicas presentaron una tinción Gram positivo, presencia de endospora central y subterminal resultados descritos por el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Estos resultados obtenidos son similares a la investigación donde describen las características macroscópicas de las colonias de *Bacillus* como su forma irregular y con bordes de las colonias que varía entre aserrada, lobulada u ondulada y las elevaciones que suelen ser planas o acuminadas⁵⁰, en otra investigación describe las características microscópicas del género *Bacillus* de presentar bacilos Gram positivos con bordes redondeados y esporas esféricas⁵¹. Anexo (Fig.19, 20, 21, Tabla 4 y 5)

En cuanto a las pruebas parciales bioquímicas la prueba de catalasa, oxidasa, hidrólisis de almidón y movilidad fueron positivas en todas las pruebas, para todas las cepas campo A y B, a excepción de la cepa M1A3 que no presentó movilidad, sin embargo esta característica podría deberse al *B. anthracis* que tiene como característica la inmovilidad⁵², en otra investigación obtuvieron un resultado similar en sus pruebas bioquímicas donde describen a las cepas de *B. subtilis*, y *B. firmus*⁵³. Tabla 6 y 7, Anexo (Fig. 22)

Al evaluar las diferencias significativas con la prueba Tukey con la cepa comercial Serenade con las cepas aisladas del campo A y B en las comparación de medias, con la significación 0,05 se obtuvo como resultado que a 2 días después del enfrentamiento frente a *B. cinerea*, la mayoría de las cepas no tienen diferencia significativa con Serenade, a los 4 y 6 días se pudo observar que la *B. amyloliquefaciens* (cepa comercial Serenade), tiene un mejor crecimiento que las cepas de *Bacillus spp.* M2A1, M2A2, M2A3, M3A1, M1B1, M1B2, M1B3, M2B2, M2B3, M2B4, M3B1, M3B2 ya que mostraron diferencia significativa. Finalmente a los 8 días, se pudo observar que la cepa de *Bacillus spp.* M1A2 los promedios del crecimiento radial son los cercanos a la cepa comercial, sin embargo estadísticamente las cepas M1A1, M1A2, M3A3, M3A2, M2B1 y M3B3 tienen tal e igual crecimiento que la cepa comercial Serenade. Tabla 8, Anexo (Tabla 11, 12, 13, 14, 15)

Como conclusión se encontró 6 cepas de *Bacillus spp.* nativas con mejor capacidad antagónica tan igual que la cepa comercial Serenade frente a *B. cinerea*. Cabe resaltar que el aislamiento de estas cepas fueron en campos donde no se utilizó algún tipo de producto biológico, por lo tanto es una alternativa de poder utilizarlo como biofungicida, tan igual como una cepa comercial y que están adaptadas mucho mejor al medio ambiente. Tabla 9

V. CONCLUSIONES

- Se aisló cepas de *Bacillus spp.* de la rizósfera de *V. vinifera* con capacidad antagónica frente a *B. cinerea*.
- De las 9 cepas de *Bacillus spp.* del campo A solo 8 presentaron actividad antagonista y de las 10 cepas de *Bacillus spp.* del campo B todas presentaron actividad antagonista frente a *B. cinerea* mediante la técnica de la cámara dual.
- La capacidad antagónica de acuerdo a los grados mediante la escala utilizada por Ezziyyani et al. fueron para las cepas de *Bacillus spp.* del campo A y B entre 2, 3 y 4 grados.
- Todas las cepas de *Bacillus spp.* evaluadas del campo A y B, presentaron metabolitos volátiles frente a *B. cinerea*.
- Las características macromorfológicas, micromorfológicas e identificación parcial bioquímica de las cepas aisladas del campo A y B, correspondieron a las cepas de *Bacillus spp.*

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una prueba identificación molecular a las cepas aisladas de *Bacillus spp.* para la identificación de la especie.
- Realizar un estudio más amplio de los metabolitos volátiles que presenta las cepas de *Bacillus spp.* para tener una identificación del compuesto que es responsable de la inhibición frente a *B. cinerea*.
- Determinar los principales mecanismos de inhibición de las cepas aisladas *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea*.
- Proseguir estos estudios de estas cepas evaluadas con capacidad antagónica frente a condiciones de invernadero.
- Evaluar la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas de *Bacillus spp.* con otros hongos fitopatógenos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tejera-Hernández B, Rojas-Badía M, Heydrich-Pérez M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC* [Internet]. Sep- Dic 2011[consultado 4 de Julio 2021]; 42(3):131-138. Disponible en : <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
2. Ting L, Ling F, Ju C, Hiroaki H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol.* [Internet]. 2007 Aug [cited 2021 Jan]; 57(8): 1846-50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17684269/>
3. Shafi J, Tian H, Ji M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol Biotechnol Equip.* [Internet]. 2017 Feb [cited 2021 Jan]; 31(3):446-459. Available from: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
4. Mc Spadden G. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus spp.* in Agricultural Systems. *Phytopathol.* [Internet]. 2004 Nov [cited 2021 May]; 94(11):1252- 1258. Available from: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>
5. Corrales L, Caycedo L, Gómez M, Ramos S, Rodríguez J. *Bacillus spp.* alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova.* [Internet]. Dic 2016 [consultado 3 de Enero 2022]; 15 (27):65-46. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00046.pdf>
6. Raaijmakers J, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev of Phytopathol.* [Internet]. 2012 Jun [cited 2021 Jun]; 50(11):403-424. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurevphyto-081211-172908>
7. Layton C, Maldonado E, Monroy L, Corrales L, Sánchez LC. *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Noa.* [Internet]. 15 Dic 2011 [consultado 2 de Marzo de 2022]; 9(16):177-187. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/501>
8. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* [Internet].2008 Mar [cited 2021 Jan]; 16(3):115-125. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
9. Mota M, Gomes C, Souza I, Moura A. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Braz J Microbiol.* [Internet].2017 Jan-Mar [cited 2021 Oct]; 48(1):62-70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>
10. Scharf D, Heinekamp T, Brakjage A. Human and plant fungal pathogens: The role of secondary metabolites. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2014 Jan [cited 2022 Jun]; 10(12): e1003859. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003859>

11. Ahmed E, Holmstron S. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Bioetchnol.* [Internet]. 2014 May [cited 2021 Jun]; 7(3):196-208. Available from: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
12. Pieterse C, Zamioudis C, Berendsen R, Weller D, Van S. Bakker P. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* [Internet]. 2014 Jun [cited 2022 Feb]; 52:347-375. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
13. Xie S, Zang H, Wu H, Uddin F, Gao X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Pathol.* [Internet]. 2018 Jan [cited 2022 Feb]; 19(1):49-58. Available from: <https://doi.org/10.1111/mpp.12494>
14. Benito E., Arranz M., Eslava A. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev Iberoam Micol.* [Internet]. 2000 [consultado 4 de Diciembre 2021]; 17: S43-S46. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/242773956_Factores_de_patogenicidad_de_Botrytis_cinerea
15. Velásquez O. Aislamiento, selección y evaluación de microorganismos controladores biológicos de *Botrytis sp.* [tesis]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. 2018. [consultado Mayo 2021]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21043>
16. Memenza Zegarra M. Control biológico in vitro de *Botrytis cinerea* (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas , en vid (*Vitis vinifera*) [tesis] Lima (Perú): Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2009. 18 p.
17. Latorre B, Rioja M. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. [tesis] Santiago (Chile): Pontificia Universidad Católica de Chile; 2002, 29:67-72.
18. Kookana R, Simpson B. Pesticide fate in farming systems: Research and monitoring. *Commun Soil Sci Plant Anal.* [Internet]. 2008 Nov [cited 2021 Dec]; 31: 1641 – 1659. Available from: <https://doi.org/10.1080/00103620009370530>
19. Salinas J, Warnaar F, Verhoeff K. Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea* in vitro. *J Phytopathol.* [Internet]. 1986 Aug [cited 2020 Nov]; 299-307. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1986.tb00924.x>
20. Vásquez E, Soria L, Chávez M. 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: Aprovechamiento integral y calidad microbiológica de los alimentos.* [Internet]; 2019 [cited 2020 Nov]. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/332098793_Analisis_del_efecto_antagonista_de_los_compuestos_organicos_volatiles_COV's_producidos_por_Trichoderma_spp_y_Bacillus_subtilis_de_manera_individual_y_en_co-cultivo_sobre_el_crecimiento_de_Botrytis_cin

21. Jaramillo K. Evaluación del uso combinado de té de compost, *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* en el control de *Botrytis cinerea* en flores de arándanos. [tesis]. Valdivia (Chile): Universidad Austral de Chile, 2018. 38 p.
22. Diaz R., Cubas A. Efecto de *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* nativos aislados de *Vitis vinifera* var. Moscato de Alejandria sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* en condiciones de laboratorio. [tesis].Trujillo (Perú): Universidad Nacional de Trujillo, 2019.77p.
23. Olmos J, Paniagua J. *Bacillus subtilis* A potential probiotic bacterium to formulated functional feeds for aquaculture. J Microb Biochem Technol. [Internet]. 2014 Oct [cited 2020 Jan]; 6(7): 361- 365. Available from: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
24. Villarreal M, Villa E, Cira L, Estrada M, Parra F, Santos S. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Rev mex fitopatol. [Internet].Ene-Abr 2018. [consultado 3 enero 2022]; 36(1):95-130. Disponible en: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
25. Mendoza R., Espinosa A. Guía técnica para muestreo de suelos. [Internet]. Nicaragua. Universidad Nacional Agraria y Catholic Relief Services. 2017 Agos [consultado Diciembre 2020]. 56p. Disponible en: <https://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>
26. American public Health Association. Standart Methods for Examination of wáter and wastewater. [Internet]. Washington. 2017[cited 2020 Nov]. Available from: http://srjctstaff.santarosa.edu/~oraola/Assets/APHA_SM_20.pdf
27. Badía M, Hernández B, Murrel J. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev Bras de Agroecología. [Internet] .2011. [consultado diciembre 2020]; 6(1), 90-99. Disponible en: https://orgprints.org/id/eprint/23097/1/Bad%C3%ADa_Aislamiento.pdf
28. Bell D, Well H, Markham C. In vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens. Phytopathol. [Internet]. EE.UU. 1982. [cited Nov 2020]; 72: 379-382. Available from: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF
29. Acosta T, Avellaneda A, Cuervo J, Sánchez L. Evaluación de microbiota de tomillo (*Thymus vulgaris*) como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos, Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales [tesis]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia; 2007. 138p.
30. Ezziyyani M, Pérez S, Requena M, Rubio L. Candela M. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales Biol [Internet]. 2012[consultado Mayo 2020]; 26: 69-78.

Disponible en: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>

31. Montealegre J, Reyes R, Pérez L, Herrera R., Silva P, Besoain X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Electron.J.Biotechnol [Internet]. 2003 [consultado Junio 2020]; 6(2): 115-126. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582003000200006&script=sci_abstract
32. Luz M. Identificación de Bacilos Gram negativo no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en bioremediación. Centro de investigación en materiales avanzados [Internet].2012. [consultado Mayo 2021]; 2-71. Disponible en: <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/394/1/Tesis%20Luz%20Carmen%20Castillo%20Mart%C3%ADnez.pdf>
33. Barnett L, Hunter B. Illustrated Genera of imperfect Fungi. The American Phytopathological Society Minnesota. USA.4° Ed 2000.
34. Bergey D., John H., Bergey's manual of determinative bacteriology, Philadelphia, .9th Ed, 787 pág., 2000.
35. Claus D, Berkeley C. Genus Bacillus Cohn 1872. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore pp.1105-1139
36. Merck E. Manual de medios de cultivo, Datmstadt, Alemania. 364 p., 1994.
37. Isenberg H, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology; 2004. pp. 3.17.10
38. Emilia C, Rafael C. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica; 2020. 27p.
39. Metabolismo bacteriano, identificación y taxonomía. Hidrolisis de almidón. Facultad de Ciencias; 2016. 47 p. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/07-Metabolismo-Identificacion-y-taxonom%C3%ADa.pdf>
40. Pedraza L, López C, Uribe-Vélez D. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. Acta biol. Colomb. 2020; 25(1):112-125. Available from: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>
41. Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis T. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. J. Chem.Ecol. 2013 Jul. 39 (7):869- 878. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
42. Bowman S, Free S. The structure and synthesis of the fungal cell wall. [Internet]. Bioessays; 2006 [consultado Enero 2022] 28:799-808. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20441>

43. Aranda F, Teruel J, Ortiz A. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. [Internet]. *Biochim Biophys Acta*; 2005 [consultado Enero 2022] 1713:51-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.00>.
44. Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, Lu XF, Pei Y, Cheng JQ. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in vitro and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). [Internet] *Acta Biochim Biophys Sin*; 2006 [consultado Enero de 2022] 38:233–240. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
45. Sosa L, Pazos V, Torres D. Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. [Internet]. Centro Agrícola; 2005 [consultado enero 2022] 32p. Disponible en: <https://1library.co/document/yn7rlg0z-aislamiento-selecci%C3%B3n-bacterias-pertenecientes-bacillus-potencialidades-biol%C3%B3gico-semilleros.html>
46. Lisboa M. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en *Vitis vinífera*. [tesis] Talca (Chile): Universidad de Talca. 49 p.
47. Avalos M, van Wezel G, Raaijmakers J, Garbeva P. Healthy scents: microbial volatiles as new frontier in antibiotic research?. *Curr Opin Microbiol*. [Internet]. 2018 Oct [consultado Enero 2022]; 45:84-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.011>.
48. Effmert U, Kalderás J, Warnke R, Piechulla B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol*. [Internet]. 2012 Jun [consultado Enero 2022]; 38(6):665-703. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5>.
49. Sansinenea E, Ortiz A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2011 Aug [consultado Enero 2022]; 33: 1523–1538. DOI: 10.1007/s10529-011-0617-5.
50. Calvo P, Zuñiga D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecol. apl*. [Internet]. 2010 Ene [consultado Enero 2022]; 9 (1):31-39. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004&lng=es
51. Realpe M, Hernandez A, Aguedelo C. Especies del genero *Bacillus*: morfología, macroscópica y microscópica. *Rev Nacional de Salud Bogotá* [Internet]. 2002 Jun [consultado Enero 2022]; 106-109. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/843/84322204.pdf>.
52. Duery O. *Bacillus anthracis*. *Rev chil infectol*. [Internet]. 2014 Ago [consultado Diciembre 2020]; 31(4):457-458. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182014000400012&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000400012>.

53. Calderón C. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp.* fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestra biofertilizantes comerciales [tesis]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia; 2010.35 p.

VIII. ANEXOS

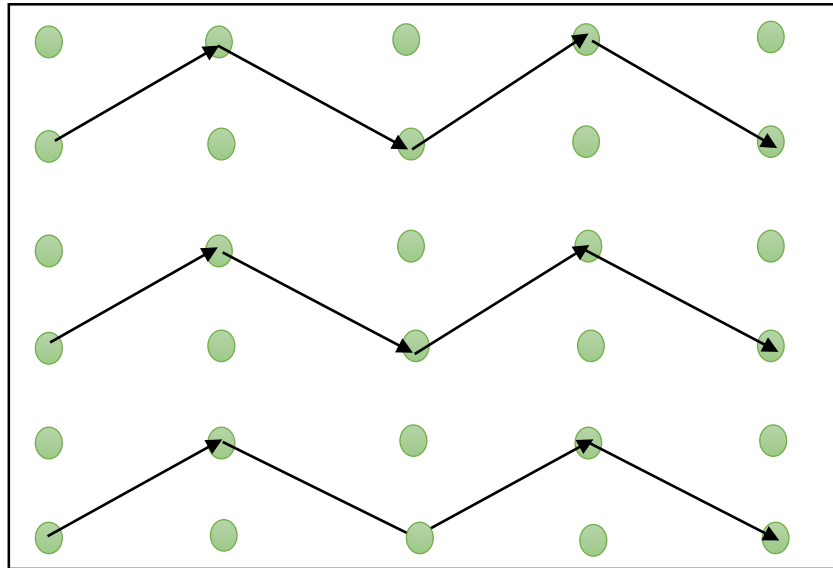


Figura. 10. Muestreo en zigzag para la toma de muestra de la rizósfera de *V. vinifera*.



Figura. 11. Toma de muestra de la rizósfera de *V. vinifera* del campo A.



Figura. 12. Toma de muestra de la rizósfera de *V. vinifera* del campo B.



Figura. 13. Toma de muestra de la rizósfera de *V. vinifera* con una profundidad de 20 cm.

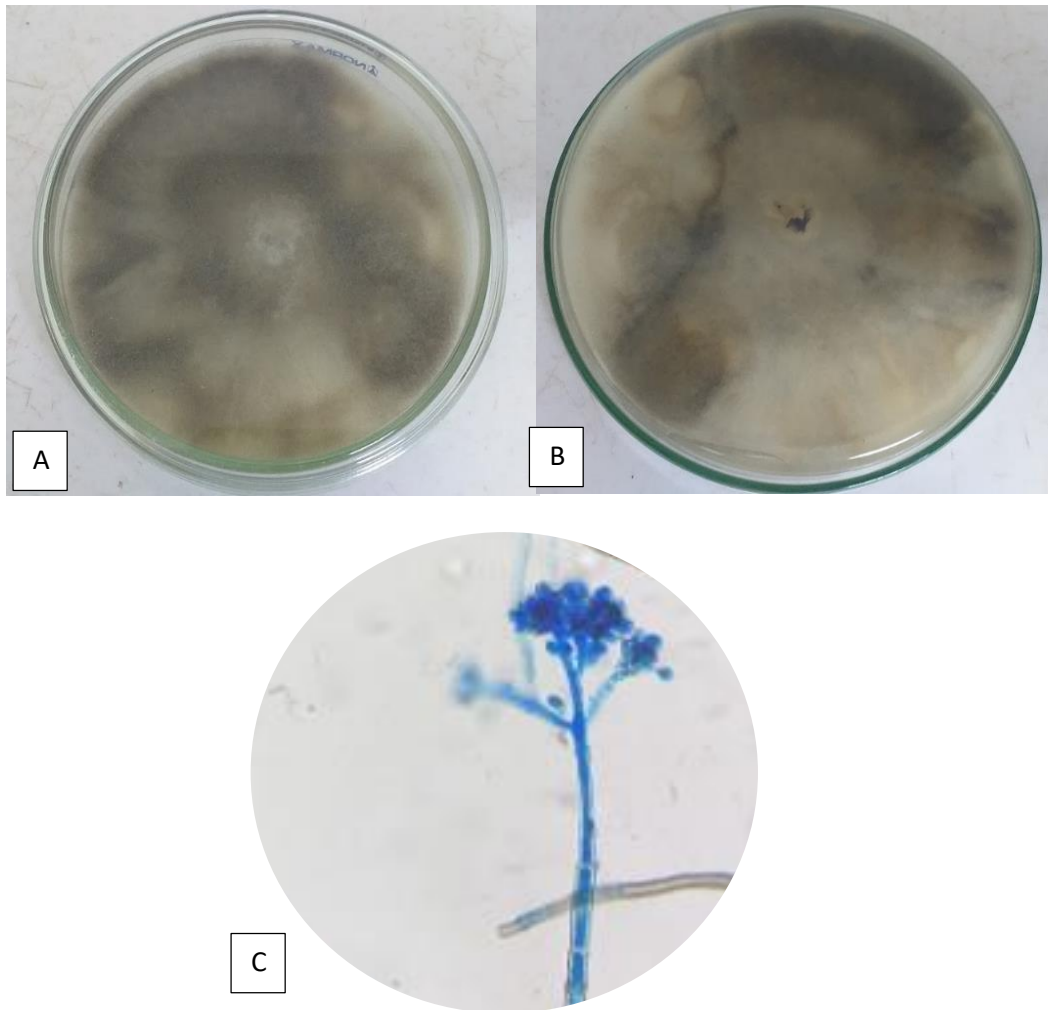


Figura. 14. Características de la cepa de *B. cinerea*. A: Observación macroscópica de la colonia de *B. cinerea* anverso de la placa, B: Observación macroscópica de la colonia de *B. cinerea* en reverso de la placa y C: Observación microscópica de *B. cinerea*.

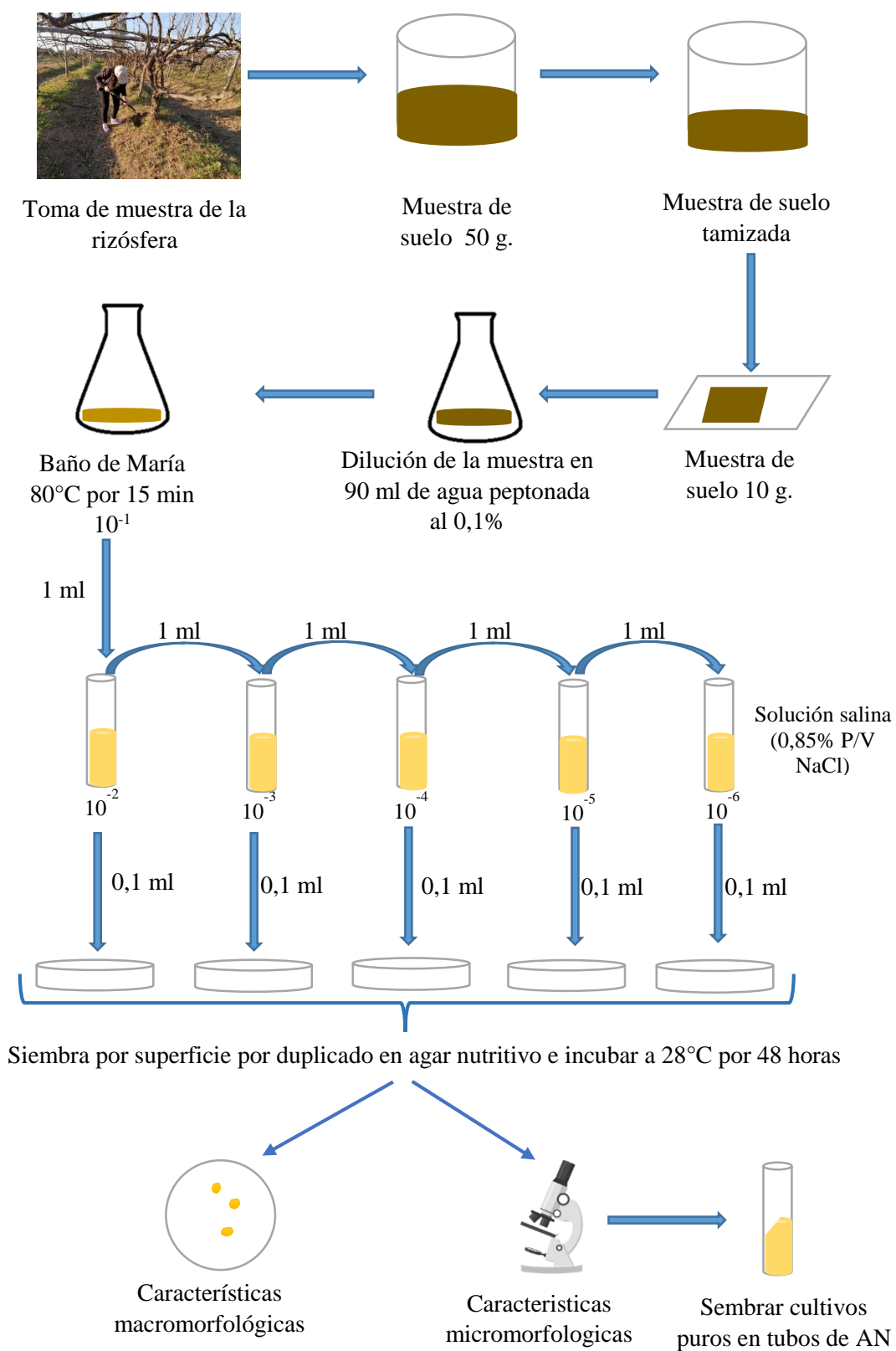


Figura. 15. Flujograma del procedimiento del aislamiento de las cepas de *Bacillus spp.* de la rizósfera de *V. vinifera*.

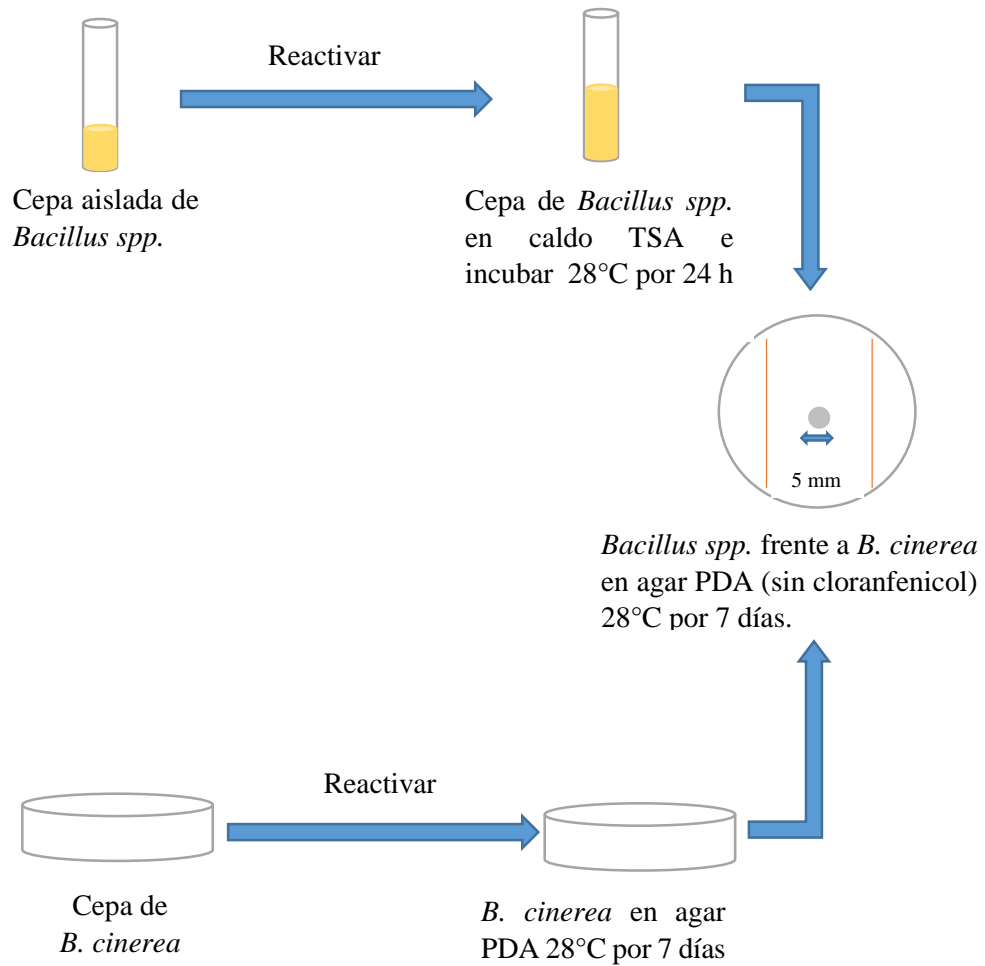


Figura. 16. Flujograma del procedimiento de la prueba antagonista radial de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea*.

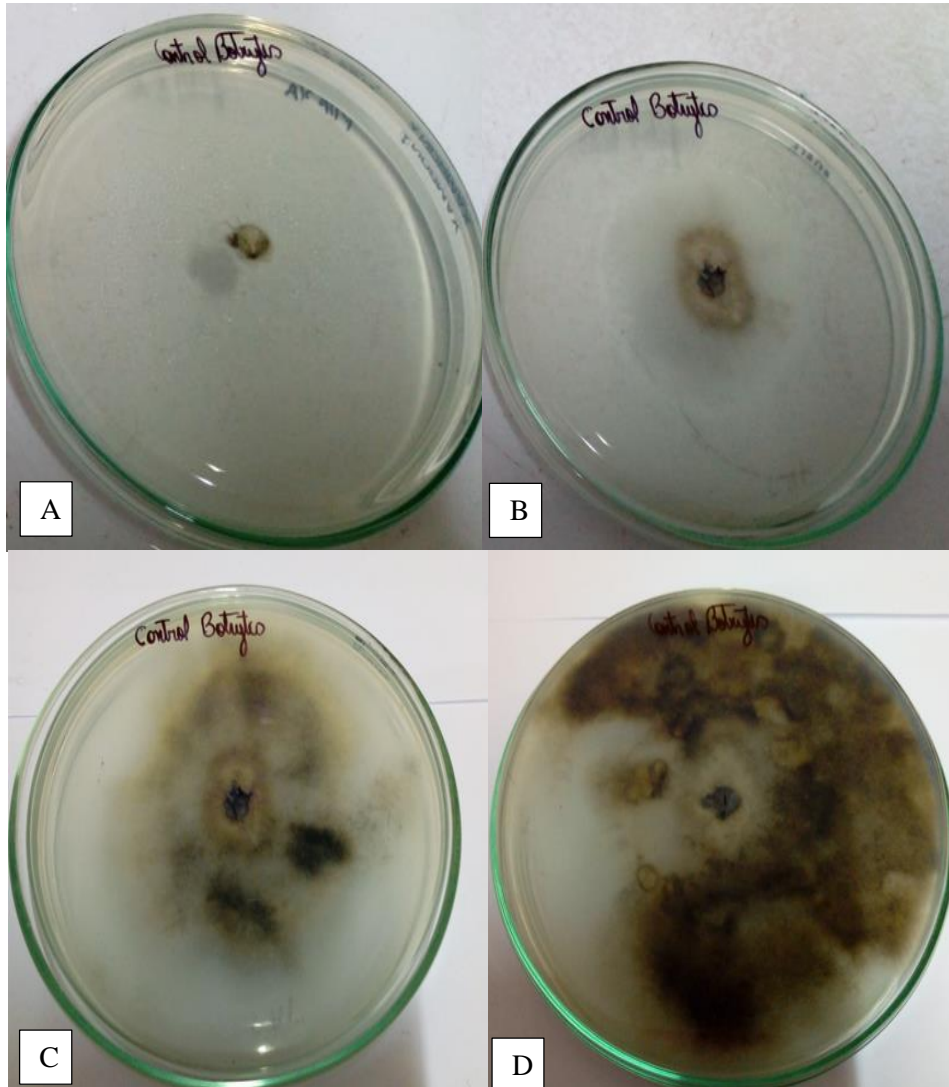


Figura. 17. Crecimiento radial del control de *B. cinerea*. A: A los 2 días, B: A los 4 días, C: A los 6 días y D: A los 8 días.

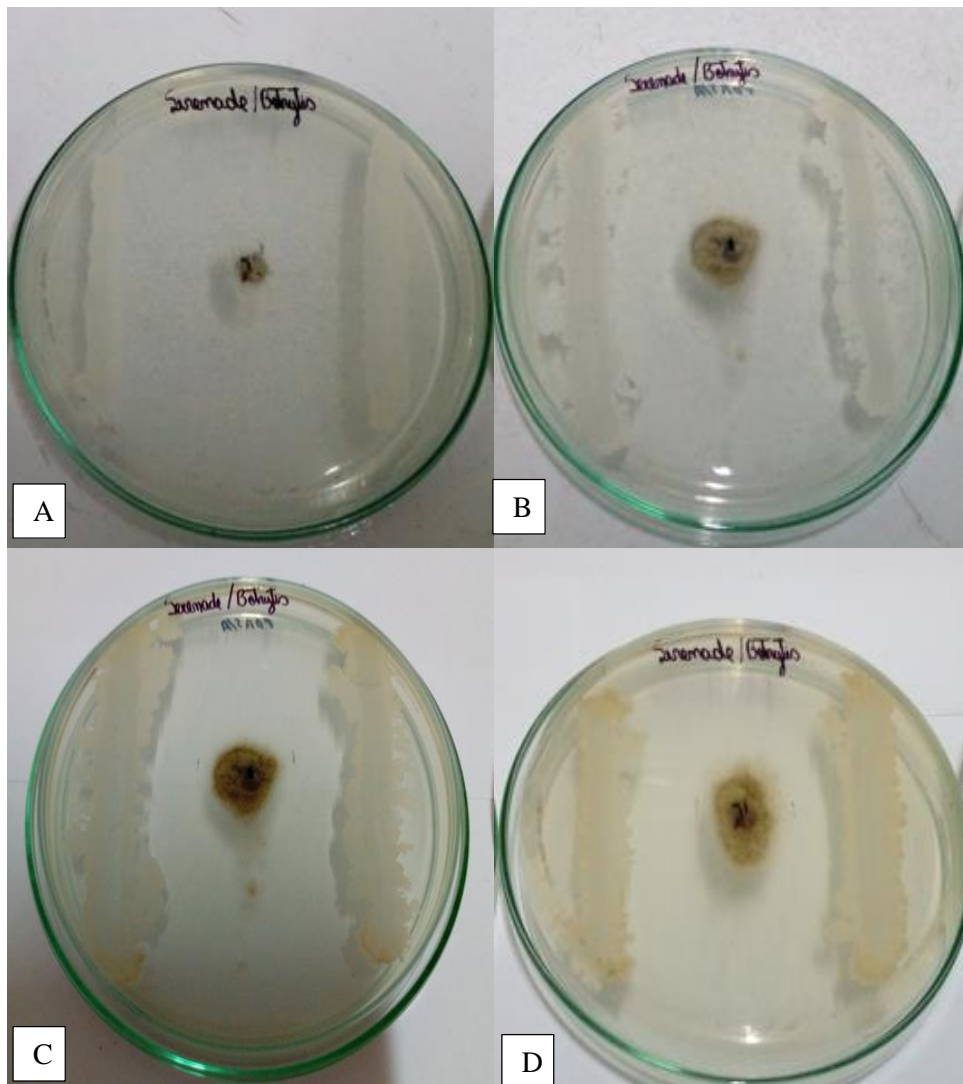


Figura. 18. Inhibición del crecimiento radial de la cepa comercial Serenade frente *B. cinerea*. A: A los 2 días, B: A los 4 días, C: A los 6 días y D: A los 8 días.

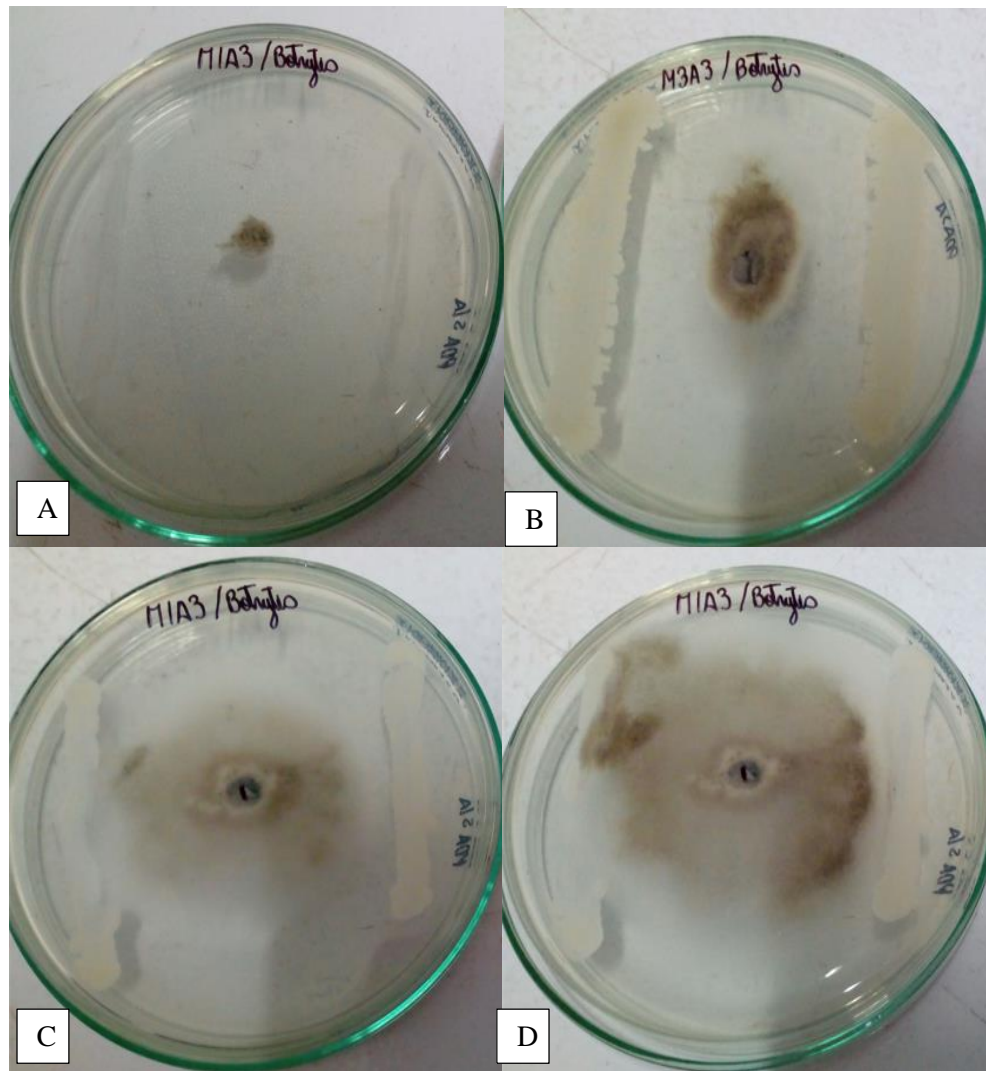


Figura. 19. Inhibición del crecimiento radial de la cepa M1A3 frente *B. cinerea*. A: A los 2 días, B: A los 4 días, C: A los 6 días y D: A los 8 días

Tabla 10. Medición del crecimiento radial (cm /día) de *B. cinerea* frente a las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A y B a los 2, 4,6 y 8 días.

Cepas aisladas	Repeticiones	2DDS	4DDS	6DDS	8DDS
M1A1	1	0.8	1.2	1.2	1.2
	2	0.7	1.2	1.3	1.3
	3	0.6	1.3	1.3	1.3
	4	0.5	1.2	1.2	1.2
	5	0.6	1.2	1.2	1.2
	6	1.0	1.6	1.6	1.6
M1A2	1	0.7	1.3	1.3	1.3
	2	0.6	1.2	1.2	1.2
	3	1.0	1.2	1.2	1.2
	4	1.0	1.4	1.4	1.4
	5	1.0	1.3	1.3	1.3
	6	0.8	1.0	1.0	1.0
M2A1	1	0.9	1.7	1.7	1.7
	2	0.8	1.7	1.7	1.7
	3	0.9	1.5	1.5	1.5
	4	0.7	1.6	1.7	1.7
	5	0.6	1.7	1.7	1.7
	6	0.8	1.5	1.5	1.5
M2A2	1	0.7	1.5	1.6	1.6
	2	0.8	1.7	1.7	1.7
	3	0.7	1.9	1.9	1.9
	4	0.6	1.5	1.7	1.7
	5	0.6	1.5	1.5	1.5
	6	0.8	1.7	1.7	1.7
M2A3	1	0.9	1.7	1.7	1.7
	2	0.9	1.4	1.5	1.5
	3	0.8	1.5	1.5	1.5
	4	1.0	1.4	1.4	1.4
	5	0.8	1.5	1.5	1.5
	6	0.6	1.5	1.7	1.7
M3A1	1	1.0	1.5	1.5	1.6
	2	1.2	1.6	1.6	1.7
	3	1.5	1.5	1.5	1.6
	4	1.5	1.5	1.5	1.6
	5	1.2	1.4	1.4	1.5
	6	1.0	1.4	1.4	1.5
M3A2	1	0.9	1.3	1.3	1.3
	2	0.6	1.1	1.1	1.3
	3	0.7	0.9	1.0	1.1
	4	1.3	1.3	1.3	1.4
	5	1.2	1.4	1.5	1.5

	6	1.0	1.0	1.2	1.2
	1	0.8	1.4	1.4	1.4
	2	1.1	1.4	1.4	1.4
M3A3	3	1.6	1.6	1.6	1.6
	4	0.9	1.3	1.3	1.3
	5	0.7	1.2	1.2	1.3
	6	1.0	1.2	1.2	1.3
	1	1.1	1.6	1.6	1.6
	2	1.0	1.9	1.9	1.9
M1B1	3	1.0	1.4	1.5	1.5
	4	1.2	1.5	1.5	1.6
	5	0.7	1.6	1.6	1.6
	6	1.0	1.5	1.5	1.5
	1	1.2	1.7	1.7	1.7
	2	1.2	1.3	1.7	1.7
M1B2	3	1.1	1.5	1.5	1.5
	4	0.7	1.5	1.5	1.5
	5	1.0	1.7	1.7	1.7
	6	1.0	1.5	1.5	1.6
	1	1.5	1.1	1.7	1.8
	2	1.4	1.5	1.7	1.8
M1B3	3	1.2	1.7	1.8	1.8
	4	1.2	1.6	1.6	1.8
	5	1.1	1.5	1.6	1.8
	6	1.2	1.6	1.7	1.7
	1	1.2	1.5	1.5	1.5
	2	0.9	1.1	1.2	1.2
M2B1	3	1.0	1.3	1.3	1.3
	4	0.9	1.3	1.4	1.4
	5	0.7	1.3	1.3	1.3
	6	1.0	1.3	1.3	1.4
	1	1.3	1.6	1.6	1.7
	2	1.0	1.2	1.2	1.2
M2B2	3	1.4	1.5	1.5	1.5
	4	1.0	1.5	1.5	1.5
	5	1.1	1.5	1.5	1.5
	6	1.0	1.2	1.3	1.4
	1	1.2	1.8	1.9	2.0
	2	1.1	1.6	2.0	2.0
M2B3	3	0.9	1.8	2.1	2.1
	4	0.9	1.4	1.5	1.6
	5	0.8	1.5	1.7	1.8
	6	0.7	1.5	1.7	1.9
	1	0.8	1.6	1.6	1.6
M2B4	2	0.8	1.5	1.5	1.5
	3	1.0	1.6	1.6	1.7

	4	0.7	1.5	1.5	1.5
	5	1.2	1.3	1.6	1.7
	6	0.9	1.5	1.5	1.5
	1	0.7	1.9	2.0	2.0
	2	0.8	1.7	1.7	1.7
M3B1	3	0.9	1.9	1.9	1.7
	4	1.2	2.2	2.2	2.2
	5	1.5	2.2	2.3	2.5
	6	1.0	2.2	2.3	2.5
	1	0.5	1.2	1.2	1.3
	2	0.5	1.6	1.6	1.6
M3B2	3	1.1	1.9	1.9	1.9
	4	0.6	1.4	1.4	1.5
	5	1.0	1.4	1.4	1.5
	6	0.5	1.6	1.7	1.7
	1	0.9	1.3	1.3	1.5
	2	0.6	1.3	1.3	1.3
M3B3	3	0.8	1.3	1.1	1.2
	4	0.7	1.3	1.3	1.4
	5	0.9	1.3	1.2	1.3
	6	0.7	1.3	1.2	1.3
	1	0.8	1.1	1.1	1.1
	2	0.7	1.1	1.1	1.1
Serenade	3	0.8	1.0	1.0	1.1
	4	0.7	0.9	1.0	1.1
	5	0.8	1.1	1.1	1.1
	6	0.7	1.1	1.1	1.1

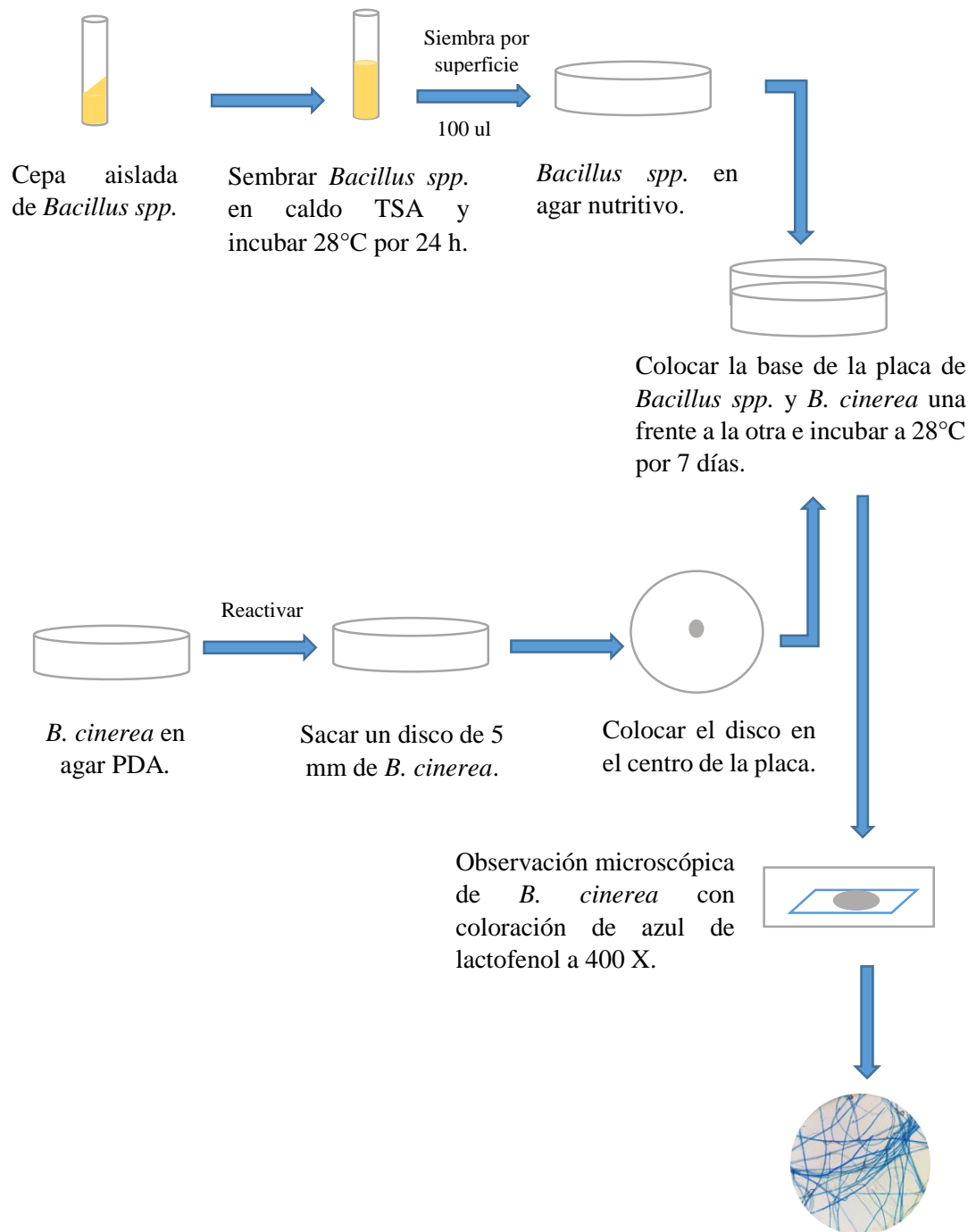


Figura. 20. Flujograma del procedimiento de metabolitos volátiles de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* frente a *B. cinerea*.

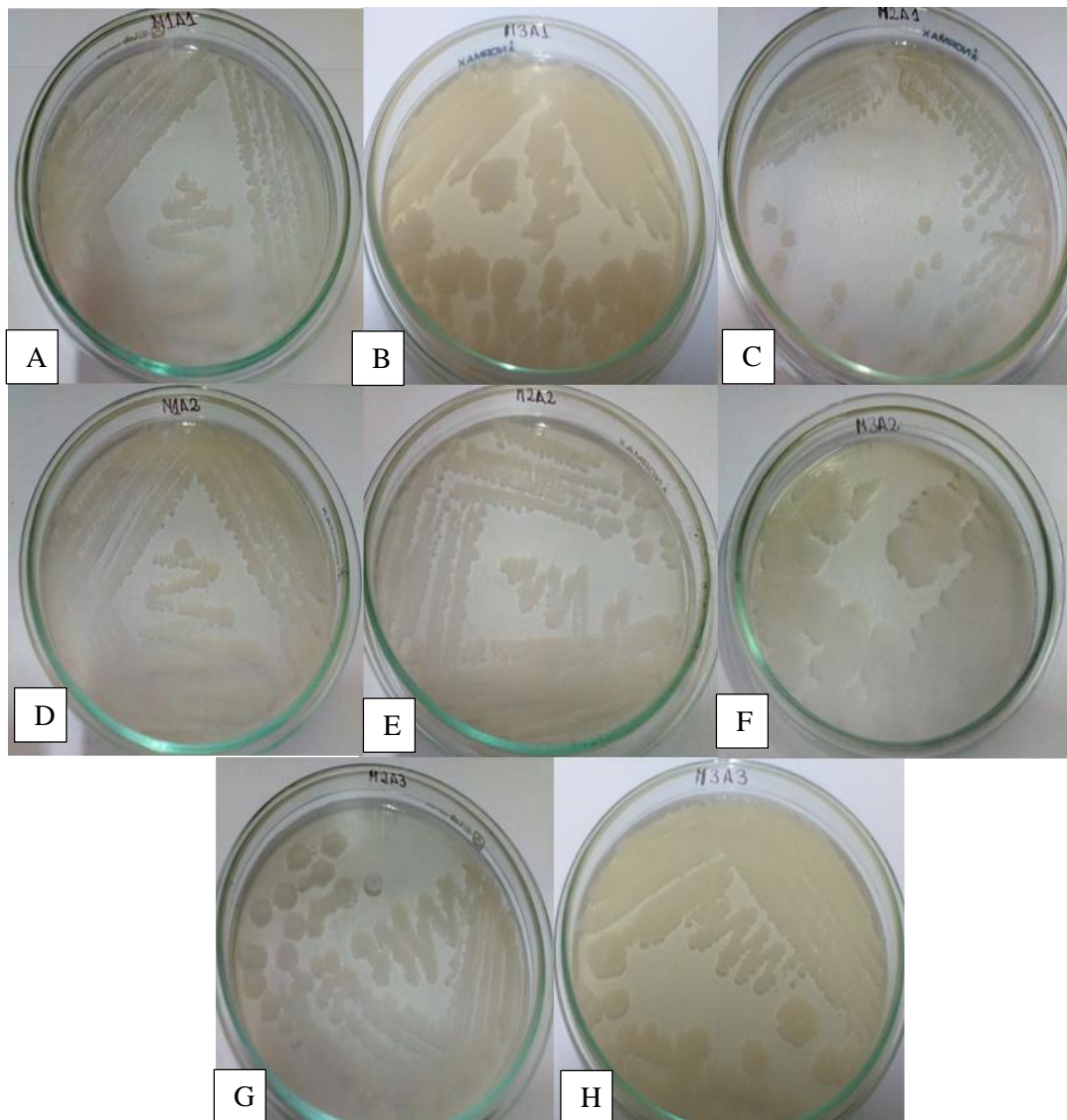


Figura. 21. Morfología de las cepas seleccionadas de *Bacillus spp.* del campo A. A: M1A1, B: M2A1, C: M3A1, D: M1A2, E: M2A2, F: M3A2, G: M2A3 y H: M3A3.

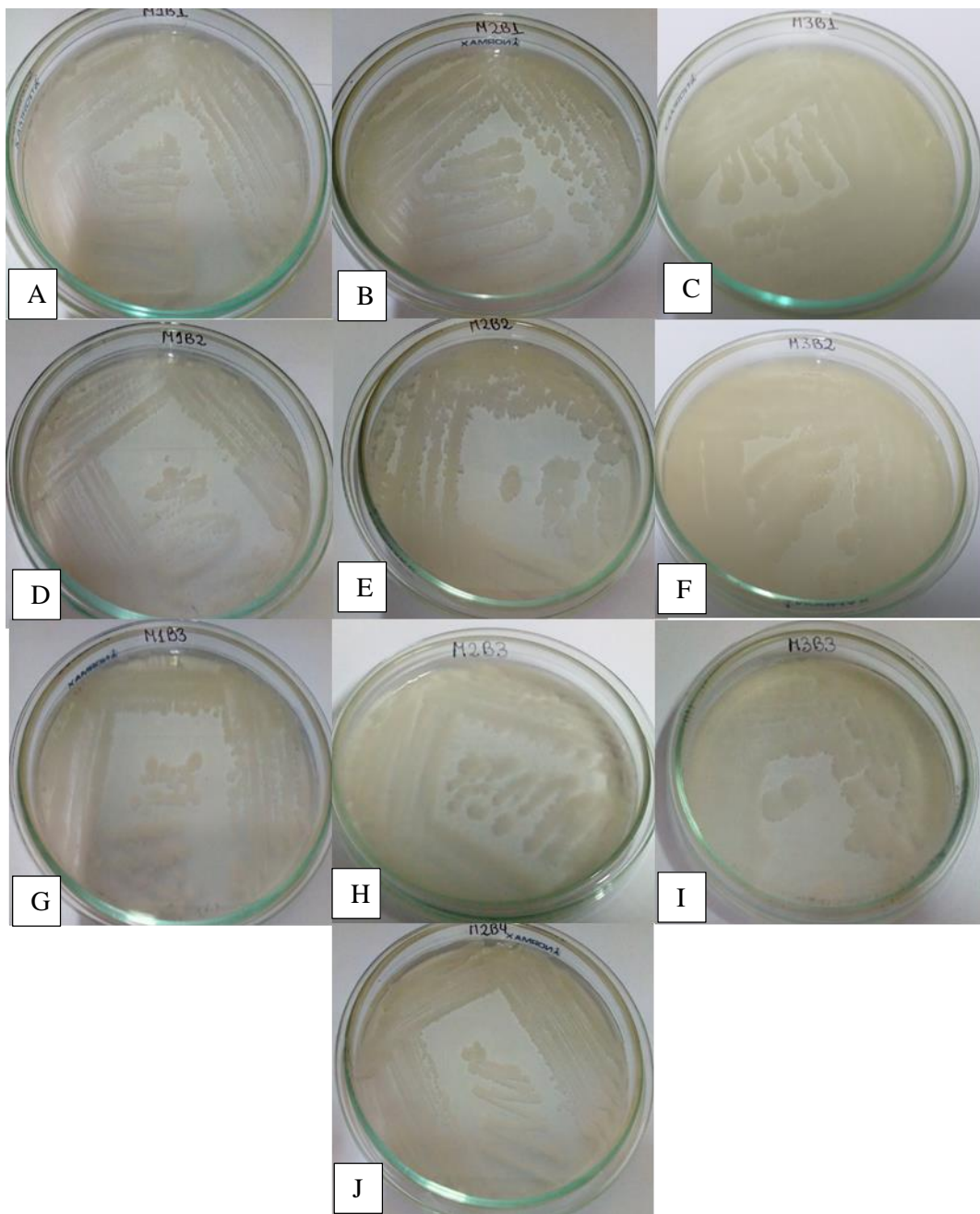


Figura. 22. Morfología de las cepas seleccionadas de *Bacillus spp.* del campo B. A: M1B1, B: M2B1, C: M3B1, D: M1B2, E: M2B2, F: M3B2, G: M1B3, H: M2B3, I: M3B3 y J: M2B4.

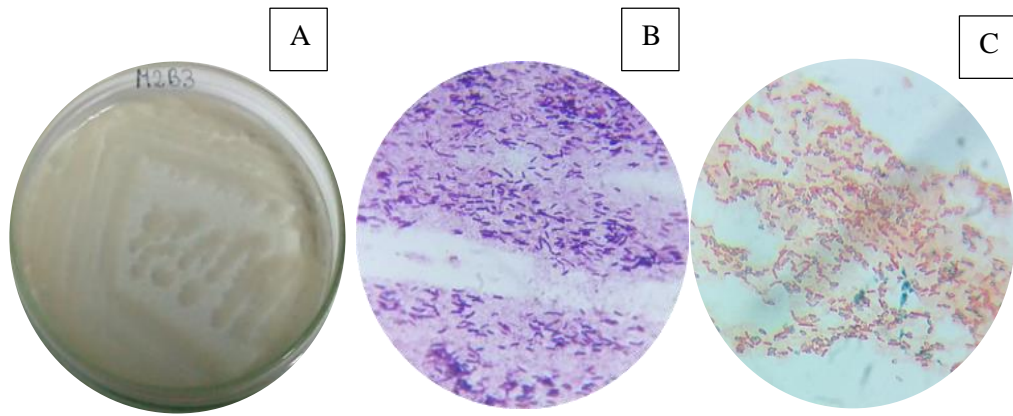


Figura. 23. Características macroscópica y microscópica de la cepa de *Bacillus spp.*, A: Características macroscópicas B: Características microscópicas mediante la tinción Gram (1000 X) y C: Características microscópicas mediante la tinción de esporas de Shaeffer Fulton (1000 X).

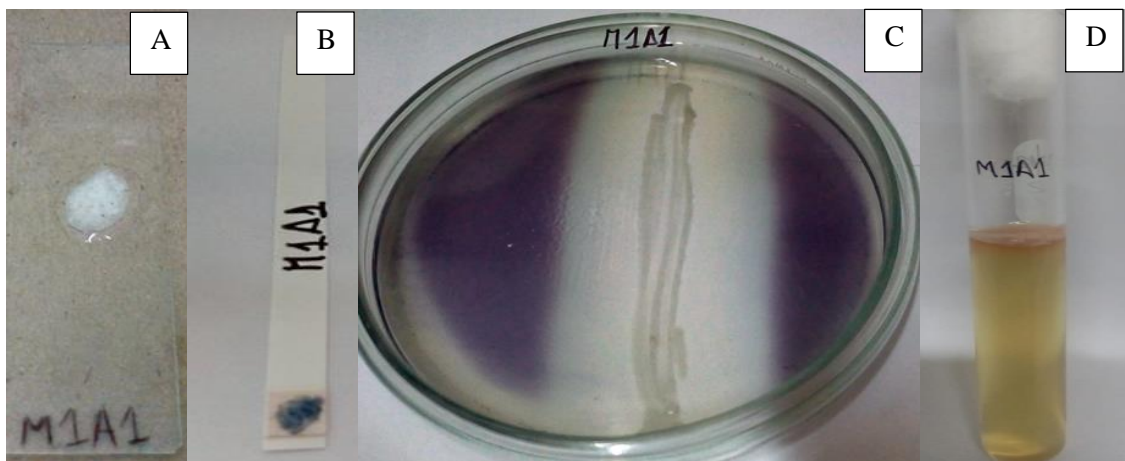


Figura. 24. Pruebas bioquímicas de la cepa de *Bacillus spp.* A: Prueba de catalasa (positiva), B: Prueba de oxidasa (positiva), C: Prueba de hidrolisis de almidón (positiva) y D: Prueba de movilidad (positiva).

Tabla 11. Análisis de varianza de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A y B después de 2 días de enfrentamiento frente a *B. cinerea* .

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	3.40964912	0.14824561	3.95	<.0001
Error	90	3.37982456	0.03755361		
Total corregido	113	6.78947368			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.502196	21.03979	0.193788	0.921053

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
bloq	5	0.19684211	0.03936842	1.05	0.3945
trat	18	3.21280702	0.17848928	4.75	<.0001

Tabla 12. Análisis de varianza de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A y B después de 4 días de enfrentamiento frente a *B. cinerea* .

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	4.94342105	0.21493135	8.79	<.0001
Error	90	2.20122807	0.02445809		
Total corregido	113	7.14464912			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.691905	10.77254	0.156391	1.451754

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
bloq	5	0.06043860	0.01208772	0.49	0.7798
trat	18	4.88298246	0.27127680	11.09	<.0001

Tabla 13. Análisis de varianza de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A y B después de 6 días de enfrentamiento frente a *B. cinerea* .

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	6.20359649	0.26972159	12.25	<.0001
Error	90	1.98210526	0.02202339		
Total corregido	113	8.18570175			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.757858	9.934186	0.148403	1.493860

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
bloq	5	0.03622807	0.00724561	0.33	0.8943
trat	18	6.16736842	0.34263158	15.56	<.0001

Tabla 14. Análisis de varianza de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A y B después de 8 días de enfrentamiento frente a *B. cinerea* .

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	6.38157895	0.27745995	11.98	<.0001
Error	90	2.08473684	0.02316374		
Total corregido	113	8.46631579			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.753761	9.937222	0.152196	1.531579

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
bloq	5	0.02526316	0.00505263	0.22	0.9539
trat	18	6.35631579	0.35312865	15.24	<.0001

Tabla 15. Separación de medias de la actividad antagonista de las cepas aisladas de *Bacillus spp.* del campo A y B frente a *B. cinerea*.

Cepas aisladas	2 DIAS	4 DIAS	6 DIAS	8 DIAS
Serenade	0,8 0,7 a b	1,0 1,0 a	1,0 1,0 a	1,0 1,1 a
M1A1	0,7 0,7 a	1,2 1,2 a b c d	1,3 1,3 a b c	1,3 1,3 a b c
M1A2	0,8 0,8 a b c	1,2 1,2 a b c	1,2 1,2 a b	1,2 1,2 a b
M2A1	0,7 0,8 a b	1,6 1,6 e f	1,6 1,6 d e f	1,6 1,6 d e f g
M2A2	0,7 0,7 a	1,6 1,6 f	1,6 1,6 e f	1,6 1,7 d e f g
M2A3	0,8 0,8 a b c	1,5 1,5 c d e f	1,6 1,6 c d e f	1,5 1,6 a b c d e
M3A1	1,2 1,2 c d	1,4 1,4 b c d e f	1,5 1,5 b c d e	1,5 1,6 c d e f g
M3A2	0,9 0,9 a b c d	1,1 1,2 a b	1,2 1,2 a b	1,3 1,3 a b c
M3A3	1,0 1,0 a b c d	1,3 1,3 a b c d e f	1,4 1,4 a b c d	1,3 1,4 a b c d e
M1B1	1,0 1,0 a b c d	1,6 1,6 d e f	1,6 1,6 c d e f	1,6 1,6 c d e f g
M1B2	1,0 1,0 a b c d	1,5 1,5 c d e f	1,6 1,6 e f g	1,6 1,6 c d e f g
M1B3	1,3 1,2 d	1,5 1,5 c d e f	1,7 1,6 d e f	1,8 1,7 f g h
M2B1	1,0 0,9 a b c d	1,3 1,3 a b c d	1,3 1,3 b c d	1,4 1,4 a b c d
M2B2	1,1 1,1 b c d	1,4 1,4 b c d e f	1,4 1,4 b c d e	1,5 1,5 b c d e f
M2B3	0,9 0,9 a b c d	1,6 1,6 d e f	1,8 1,8 f g	1,9 1,9 g h
M2B4	0,9 0,9 a b c d	1,5 1,5 c d e f	1,6 1,6 c d e f	1,6 1,6 c d e f g
M3B1	1,0 1,0 a b c d	2,0 2,0 g	2,1 2,0 g	2,1 2,1 h
M3B2	0,7 0,7 a	1,5 1,5 c d e	1,5 1,5 b c d e f	1,6 1,6 c d e f
M3B3	0,8 0,7 a b	1,3 1,3 b c d e f	1,2 1,2 a b	1,3 1,3 a b c d