



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**DISEÑO DEL PROCESO E INGENIERÍA CONCEPTUAL PARA
LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A BASE DE *Bacillus*
sp.**

Por:

Jorge Alberto Peralta Mendoza

TESIS APROBADA POR LA:

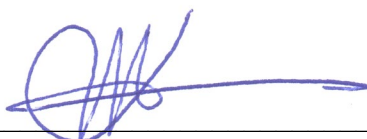
COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la propuesta de tesis de Jorge Alberto Peralta Mendoza la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



Dra. Mayra de la Torre Martínez
Directora de Tesis



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Integrante de comité de Tesis



Dr. Alfonso García Galaz
Integrante de comité de Tesis



Dr. Victor Eric López Y López
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Diseño del Proceso e Ingeniería Conceptual para la Producción de un Biofungicida a Base de *Bacillus* sp.” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jorge Alberto Peralta Mendoza, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para los estudios de maestría y el proyecto FORDECYT 296368.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por proporcionar un entorno agradable, haciendo posible mis estudios de maestría y por el apoyo otorgado para una estancia de investigación nacional.

Al Centro de Investigación en y Desarrollo en Agrobiotecnología Alimentaria (CIDEA) por recibirme y permitirme desarrollar la etapa experimental de este trabajo de tesis y por todo el apoyo durante mi estancia.

A la Dra. Mayra de la Torre, por sus aportaciones y su guía durante el desarrollo de esta tesis. Agradezco el tiempo, la dedicación y la orientación durante el proyecto.

Al Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada por su apoyo e ideas para experimentos.

A mis asesores Dra. Gabriela Clamont Montfort, Dr. Alfonso García Galaz y al Dr. Eric López Y López por sus sugerencias, aportaciones y revisiones.

A Gaby, por su ayuda, compañía, apoyo y por todos esos buenos momentos dentro y fuera del lab.

A mis nuevos amigos (Cn'F) Carlos, Daniel, Héctor, Jannel, Josep, Leo, Martín, Melissa, Michel y Omar por los buenos momentos que compartimos y compartiremos.

A mis padres, gracias por el apoyo e impulsarme a siempre ser mejor. Gracias los amo.

DEDICATORIA

A mis padres Jorge y Luz.

A mis hermanas Carolina y Paulina

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS.....	11
LISTA DE ECUACIONES.....	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Importancia del Control Biológico	17
2.2. Control Biológico	17
2.2.1. El Género <i>Bacillus</i> como Agente de Control Biológico.....	18
2.2.1.1. Familia surfactina.....	19
2.2.1.2. Familia iturina.....	20
2.2.1.3. Familia fengicina.....	20
2.3. Diseño de Bioprocesos	21
2.3.1. Etapa Río Arriba	22
2.3.2. Biorreactor	23
2.3.3. Etapa Río Abajo	24
2.4. Formulación de Productos Agrícolas a Base de Microorganismos	25
2.5. Análisis Económico de Bioprocesos	26
2.5.1. Estimación de Costos de Operación	26
2.5.2. Capital de Inversión Total.....	28
2.5.3. Análisis de Factibilidad Económica	29
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVO	32
4.1. Objetivo General.....	32
4.2. Objetivos Particulares.....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1. Microorganismos	33
5.2. Medios de Cultivo	33
5.3. Selección de Cepas de <i>Bacillus</i> spp. y Medio de Cultivo	34
5.3.1. Selección con Base a Desafíos en Placas de Petri	34

CONTENIDO (continuación)

5.3.1.1. Selección con base a desafíos en placa de petri.....	34
5.3.1.2. Combinaciones de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	35
5.3.1.3. Segundo cribado.....	35
5.3.2. Selección de las Cepas de <i>Bacillus</i> sp. con Base en la Promoción del Crecimiento de <i>Cicer arietinum</i>	36
5.4. Localización de la Actividad Inhibitoria del Crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	37
5.4.1. Cultivo Puro de <i>Bacillus</i> sp. AcX.....	37
5.4.2. Cocultivo de <i>Bacillus</i> sp. AcX y <i>F. oxysporum</i>	37
5.5. Efecto de la Adición de Elementos Traza al Medio Farrera Sobre la Esporulación de <i>Bacillus</i> sp.....	38
5.6. Cinéticas de Crecimiento de la Cepa AcX	38
5.6.1. Cinéticas de Crecimiento en Matraz.....	38
5.6.2. Cinéticas de Crecimiento en Biorreactor	39
5.6.3. Estudio de Vida de Anaquel	39
5.6.4. Síntesis del Proceso	40
5.7. Determinación de la Capacidad de la Planta y Especificaciones Técnicas de los Equipos Principales.	40
5.8. Análisis Económico	40
5.9. Medición de la Inhibición del Crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	41
5.10. Cuantificación de Esporas, Unidades Formadoras de Colonias y Cuenta Total	42
5.10.1. Cuenta Total.....	42
5.10.2. Unidades Formadoras de Colonias	43
5.10.3. Esporas.....	43
5.10.4. Análisis Estadístico.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	44
6.1. Selección de Cepa de <i>Bacillus</i> sp. y Medio de Cultivo de Producción.....	44
6.1.1. Primer Cribado.....	44
6.1.2. Segundo Cribado.....	49
6.1.3. Efecto Promotor de Crecimiento de las Cepas AcX y AcB en <i>Cicer arietinum</i>	51
6.2. Etapa de Fermentación del Proceso.....	56
6.2.1. Localización de la Actividad Inhibitoria del Crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	56
6.3. Efecto de la Adición de Elementos Traza al Medio Farrera Sobre la Esporulación de <i>Bacillus</i> sp.....	58
6.3.1. Cinéticas de Crecimiento de la Cepa AcX en Matraz.	60
6.3.2. Cinéticas de Crecimiento en Biorreactor	61
6.4. Vida de Anaquel del Biofungicida en Presentación Líquida.....	67
6.5. Ingeniería Conceptual de la Planta de Producción de un Biofungicida a base de <i>Bacillus</i> sp.	72
6.5.1. Base de cálculo para la capacidad de producción de la planta	72
6.5.2. Dimensionamiento del biorreactor.....	72
6.6. Síntesis del Proceso	72
6.6.1. Etapa Río Arriba	73

CONTENIDO (continuación)

6.6.2. Etapa de Fermentación.....	74
6.6.3. Etapa Río Abajo	75
6.7. Análisis Económico	76
6.7.1. Inversión	76
6.7.2. Costos de Operación	78
6.7.3. Retorno de la Inversión.....	79
7. CONCLUSIONES.....	82
8. RECOMENDACIONES.....	83
9. BIBLIOGRAFÍA.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura básica de las tres familias de lipopéptidos producidos por bacterias del género <i>Bacillus</i> .	20
2. Diagrama de un bioproceso para la producción de <i>B. thuringiensis</i> a escala comercial	22
3. Ejemplificación de las mediciones realizadas de halos de inhibición con el software Adobe® Photoshop CS4 ver. 11 2008.	42
4. Prueba cualitativa para la identificación de las cepas con actividad antifúngica	45
5. Análisis cualitativo del control de <i>Fusarium oxysporum</i> de las siete cepas de <i>Bacillus</i> spp. en tres medios de producción distintos	46
6. Combinaciones séxtuples de las siete cepas de <i>Bacillus</i> spp. en los tres medios de producción	48
7. Combinaciones dobles de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en medio KSHA	47
8. Combinaciones dobles de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en medio Farrera	48
9. Combinaciones dobles de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en medio Heins	49
10. Pruebas cualitativas para la determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de las cepas AcX y AcB en tres medios de producción	50
11. Evolución de la germinación y el desarrollo de las plántulas de <i>Cicer arietinum</i>	53
12. Fotografías de los sistemas radiculares y partes aéreas de las plantas de garbanzo	54
13. Comparación de medias de las propiedades biométricas medidas en las plantas de garbanzo	55
14. El efecto antifúngico de las cepas AcX sólo estar presente cuando las células bacterianas están en contacto con el fitopatógeno.	57
15. Efecto del sobrenadante del co-cultivo en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	58
16. Cinética de crecimiento en matraz de la cepa AcX en medio FarreraB	61
17. Cinética de la cepa AcX en medio FarreraSM en Biorreactor de 3 L	63
18. Cinética de la cepa AcX en medio Farrera150 en Biorreactor de 3 L	65
19. Cinética de la cepa AcX en medio Farrera150 con suplementación de oxígeno en Biorreactor de 3 L	66
20. Evolución de diferentes parámetros medidos por el Biorreactor durante la cinética en medio Farrera 150 con suplementación de oxígeno	68

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
21. Gráfico con la evolución de las poblaciones totales en las diferentes formulaciones a cuatro distintas temperaturas.....	69
22. Gráfico con la evolución de la cuenta de esporas en los diferentes tratamientos a cuatro distintas temperaturas.....	70
23. Biopelícula formada por <i>Bacillus</i> sp. AcX.....	72
24. Diagramas para dos diferentes configuraciones de proceso.....	74
25. Comparativo de proyección a 15 años de las plantas de producción para producto en presentaciones líquida o como polvo humectable.....	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Ejemplos de especies bacterianas con actividad antifúngica	19
2. Análisis de costos anuales de proceso presentado por Rowe y Margaritis (2004).....	28
3. Capital de inversión total presentado por Rowe y Margaritis (2004)	29
4. Medios de cultivo	34
5. Índice de inhibición de <i>F. oxysporum</i> por <i>Bacillus</i> spp.	51
6. Influencia de la adición de minerales en la cuenta celular total y de esporas	59
7. Aporte de minerales al medio Farrera	59
8. Estimación de capital fijo de la planta de producción.....	78
9. Equipos principales de producción.....	78
10. Costos de operación.....	80

LISTA DE ECUACIONES

1. Cálculo de coeficiente de inhibición	41
---	----

RESUMEN

Anualmente las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos generan pérdidas importantes en los cultivos a nivel global. En los últimos años el mercado ha restringido el uso excesivo de pesticidas. Como respuesta a los nuevos requerimientos del mercado y para minimizar las pérdidas causadas por hongo fitopatógenos se ha incrementado el uso de agentes de control biológico. El género *Bacillus* encabeza el mercado de agentes bacterianos utilizados para control biológico, debido a la resiliencia de las esporas que produce y a la capacidad que tienen diferentes cepas para producir metabolitos con actividad bactericida o antifúngica. En este estudio se identificó una cepa de *Bacillus* spp. con potencial para el diseño de un producto para el control biológico de *Fusarium oxysporum*. La cepa *Bacillus* sp. AcX mostró tener efecto *in vitro* para la inhibición de crecimiento de *F. oxysporum* en diferentes medios de producción, de los cuales el medio Farrera fue en el cual esta cepa tuvo un mejor desempeño. Se realizaron diversas cinéticas de crecimiento, dónde se identificó que la cepa AcX tiene una gran demanda de oxígeno durante el crecimiento exponencial cuando se cultiva con una alta concentración de nutrientes ($150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Pueden alcanzarse densidades celulares de hasta $3.3 \times 10^9 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ después de 30 h de cultivo en medio Farrera 150 suplementado con oxígeno con una eficiencia de esporulación promedio del 81% desde las 30 hasta las 72 h de cultivo. Se calculó que es necesaria la producción de 32 lotes anuales de 200L (volumen nominal) para satisfacer la demanda anual de 2500 Ha y es posible recuperar la inversión en un periodo de entre 3 a 5 años, dependiendo del precio de venta del producto.

Palabras clave: Bioprocesos, *Bacillus*, Control Biológico, Biofungicida

ABSTRACT

Annually diseases caused by phytopathogenic fungi account for important losses on productivity across the globe. In recent years, the market has restricted the excessive use of pesticides and other agrochemicals. As a response to the market requirements shift, the usage of biocontrol agents has increased in order to satisfy the new market requirements and minimizing losses caused by phytopathogenic fungi. The *Bacillus* genus leads the market of bacteria used as biological control agents, due to the resilience of the spores produced, and the capability of various strains to produce metabolites with bactericidal and fungicidal activity. In this study a *Bacillus* spp. strain was identified to have a potential as a commercial biocontrol product to mitigate the effects of *Fusarium oxysporum*. When *Bacillus* spp. AcX was produced in various production culture media, the product inhibited *in vitro* assays the growth of *F. oxysporum*. The AcX strain gave the best results in where obtained when the strain was produced in the Farrera media. The results from multiple growth kinetics showed that the AcX strain had a high oxygen demand during the exponential growth when cultured at a high nutrient concentration ($150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Cellular densities of $3.3\times 10^9 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ were achieved after 30 h of fermentation with an average sporulation efficiency (from 30 – 72 h of fermentation) of 81%, when oxygen was supplied. To satisfy the market demand for 2500 Ha, it was calculated that 32 batches of 200L (nominal volume) were needed, and the investment associated with fixed and operation costs can be recovered on a period between 3 – 5 years, according to the sale price of the product.

Key words: Bioprocess, *Bacillus*, Biocontrol, Biofungicide

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades por hongos fitopatógenos son una de las mayores amenazas para la producción global de alimentos y otros productos derivados de cultivos agrícolas (Godfray *et al.* 2016). Se estima que anualmente las enfermedades causadas por estos hongos destruyen un tercio de la producción global de productos agrícolas (Fausto *et al.* 2019). En México se han reportado pérdidas considerables en diferentes cultivos por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos como fresa (Pérez-Rodríguez *et al.* 2019) e incluso existen reportes de pérdidas de hasta el 100% en ajo (Pérez-Moreno *et al.* 2015).

En un estudio realizado por Fierros-Leyva, *et al.* (2019), se estimó que en cerca del 75% de la superficie agrícola de la Costa de Hermosillo (correspondiente a 112 866 ha) se encuentran cepas de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* con capacidades para infectar a los cultivos entre moderadas y altas. De acuerdo a la Agenda Técnica Agrícola de Sonora, publicada por el INIFAP en 2017, *F. oxysporum* causa pérdidas significativas en cultivos de exportación cultivados en Sonora, tales como sandía, espárrago y garbanzo. Tradicionalmente, para enfrentar este problema, los productores se ven obligados a utilizar agroquímicos que han mostrado tener un impacto ambiental grave, además de efectos adversos a la salud humana y animal (Mahmood *et al.* 2016).

Actualmente existe un interés global para la utilización de productos agrícolas amigables con el medio ambiente, no tóxicos y biodegradables, incluyendo el uso de bacterias en campo y postcosecha (Rasmann *et al.* 2016; Toral *et al.* 2018). Por ejemplo, diversas especies de *Bacillus* spp. han mostrado tener la capacidad de sintetizar metabolitos con actividad fungicida de amplio espectro, como péptidos y lipopéptidos (Shafi *et al.* 2017). El lanzamiento de la familia de productos de Bayer®, Serenade desde el 2013 y el registro en China durante los años 2013-2015 de más de 30 productos de control biológico que tienen como ingrediente activo a *Bacillus* spp. (Ma *et al.* 2015), prueba que existe un interés por parte del mercado para resolver el problema de hongos fitopatógenos haciendo uso de microorganismos como ingrediente activo.

Para la producción comercial de biofungicidas, además de la selección de la o las cepas, es necesario el diseño del bioproceso, que incluye las condiciones de operación de las etapas: río arriba, fermentación y río abajo. Las tres etapas deben tener un rendimiento aceptable, además, los costos de operación y la inversión deben permitir que el proceso sea rentable para la capacidad de producción deseada. Por lo tanto, en este estudio se buscó seleccionar una cepa de *Bacillus* sp. con potencial para el control biológico de *Fusarium oxysporum* y se diseñó el proceso y la ingeniería conceptual para la producción comercial de un biofungicida en presentación líquida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del Control Biológico

Las pérdidas en cultivos agrícolas ocasionadas por patógenos, animales y hierbas, disminuyen la productividad global de estos productos entre 20 y 40% (Savary *et al.* 2012). Las enfermedades por hongos fitopatógenos son una de las mayores amenazas para la producción de alimentos, piensos y fibras textiles, ya que pueden afectar distintas partes de las plantas, tales como la raíz, tallo, hojas, frutos, etc. (Godfray *et al.* 2016; Heydary y Mohammad, 2010).

La mayoría de los productores dependen de plaguicidas, fungicidas y fertilizantes químicos para proteger su inversión y asegurar su cosecha. Sin embargo, su uso indiscriminado ha ocasionado daños severos al medio ambiente, así como el desarrollo de plagas y patógenos resistentes y efectos negativos en la salud de animales y humanos (Mahmood *et al.* 2016; Pérez-Rodríguez *et al.* 2019). Además, del uso de agroquímicos para el control, los productores también se valen de variedades comerciales resistentes a fitopatógenos específicos, pero estos patógenos evolucionan para superar la resistencia de las variedades (Godfray *et al.* 2016). Históricamente se ha observado que cuando se reduce la variabilidad genética de los cultivos, por ejemplo, al utilizar la misma variedad en todo el cultivo, se aumenta el riesgo de sufrir pérdidas importantes cuando los patógenos superan la resistencia del cultivo, como ha ocurrido en cultivos de vid (Benheim *et al.* 2012) y plátano (Aguilar-Barragan *et al.* 2014).

2.2. Control Biológico

El control biológico es un método para el control de plagas, enfermedades y malezas, que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo. (Bale *et al.* 2008; Marieke *et al.* 2019). Debido a las pérdidas agrícolas ocasionadas por hongos fitopatógenos,

se ha puesto especial interés en el estudio de microorganismos con actividad antifúngica para el desarrollo de biofungicidas microbianos, entre los que destacan los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*. En el Cuadro 1 se muestran algunos ejemplos de reportes relacionados a estos géneros y su efecto como agentes de control biológico.

2.2.1. El Género *Bacillus* como Agente de Control Biológico

Bacillus es un género de bacterias Gram positivas, que forman endosporas (Madigan *et al.* 2012) y producen metabolitos con efecto antifúngico de amplio espectro, lo que lo hace atractivo como agente de control biológico (Shafi *et al.* 2017). Además, *B. subtilis* es reconocido como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS), por sus siglas en inglés) (Denner y Gillanders 1996), lo que facilita su comercialización.

En algunas cepas de *Bacillus* sp. entre el 4 y 8% de su genoma codifica para rutas metabólicas de antibióticos (Fira *et al.* 2018; Ongena y Jacques 2008), entre los que se encuentran péptidos y lipopéptidos que pueden tener grupos acilo, metilo o estar glicosilados. (Fira *et al.* 2018). Además de producir antibióticos, algunos miembros del género *Bacillus* producen enzimas líticas, tales como quitinasas (Wang *et al.* 2018) y β -1,3-glucanasas (Leelasuphakul *et al.* 2006) que degradan la pared celular de los hongos (Saber *et al.* 2015).

Los lipopéptidos producidos por bacterias del género *Bacillus* se clasifican en tres familias: iturina, surfactina y fengicina, las estructuras de estas moléculas se ejemplifican en la Figura 1. Los lipopéptidos tienen estructuras cíclicas y entre 7 y 10 residuos de aminoácidos unidos a un derivado de ácido graso, pudiendo variar los aminoácidos presentes, la longitud de la cadena hidrocarbonada y presentan isoformas (Cawoy *et al.* 2015; Ongena y Jacques, 2008).

Cuadro 1. Ejemplos de especies bacterianas con actividad antifúngica

Bacteria	Hongo contra el que muestra efecto	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Palyzová <i>et al.</i> 2019
<i>Pseudomonas</i> sp. RU47	<i>Rhizoctonia solani</i>	Schreiter <i>et al.</i> 2018
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Verticillium dahliae</i>	Cabanás <i>et al.</i> 2018
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Wallace <i>et al.</i> 2017
<i>Pseudomonas</i> sp. CMR12a	<i>Pythium myriotylum</i>	Oni <i>et al.</i> 2019
<i>Streptomyces</i> spp	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Law <i>et al.</i> 2017
<i>Streptomyces</i> sp. DHV3-2	<i>Verticillium dahlia</i>	Cao <i>et al.</i> 2016
<i>Streptomyces goshikiensis</i> YCXU	<i>Fusarium oxysporum</i>	Faheem <i>et al.</i> 2015
<i>Streptomyces</i> sp. UPMRS4	<i>Pyricularia oryzae</i>	Awla <i>et al.</i> 2017
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SD-32	<i>Podosphaera fusca</i>	Tanaka <i>et al.</i> 2017
<i>Bacillus subtilis</i> IAB/BS03	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Bremia lactucae</i>	Hinarejos <i>et al.</i> 2016

Cuadro elaborado a partir de literatura consultada, presenta ejemplos de las especies bacterianas con mayor número de reportes para el control biológico de hongos fitopatógenos.

2.2.1.1. Familia surfactina. Las surfactinas están constituidos por un heptapéptido unido a una cadena grasa de 13 a 15 carbonos (Fig. 1A); son agentes con alta capacidad tensoactiva. Por ejemplo, a una concentración 20 μmol pueden reducir la tensión superficial del agua a $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (c. Las surfactinas interactúan con la bicapa lipídica de la membrana celular alterando su estructura, por lo que tienen efecto antimicrobiano en bacterias Gram positivas, Gram negativas y micoplasma; inclusive se ha reportado que tienen actividad antiviral y antitumoral (Hamley 2015). También, a altas concentraciones de surfactina se forman canales iónicos en las membranas bacterianas (Ongena y Jacques 2008) .

Las surfactinas pueden inhibir a algunos fitopatógenos bacterianos como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas axonopodis* y a algunos hongos, entre ellos a *Sclerotinia sclerotium*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

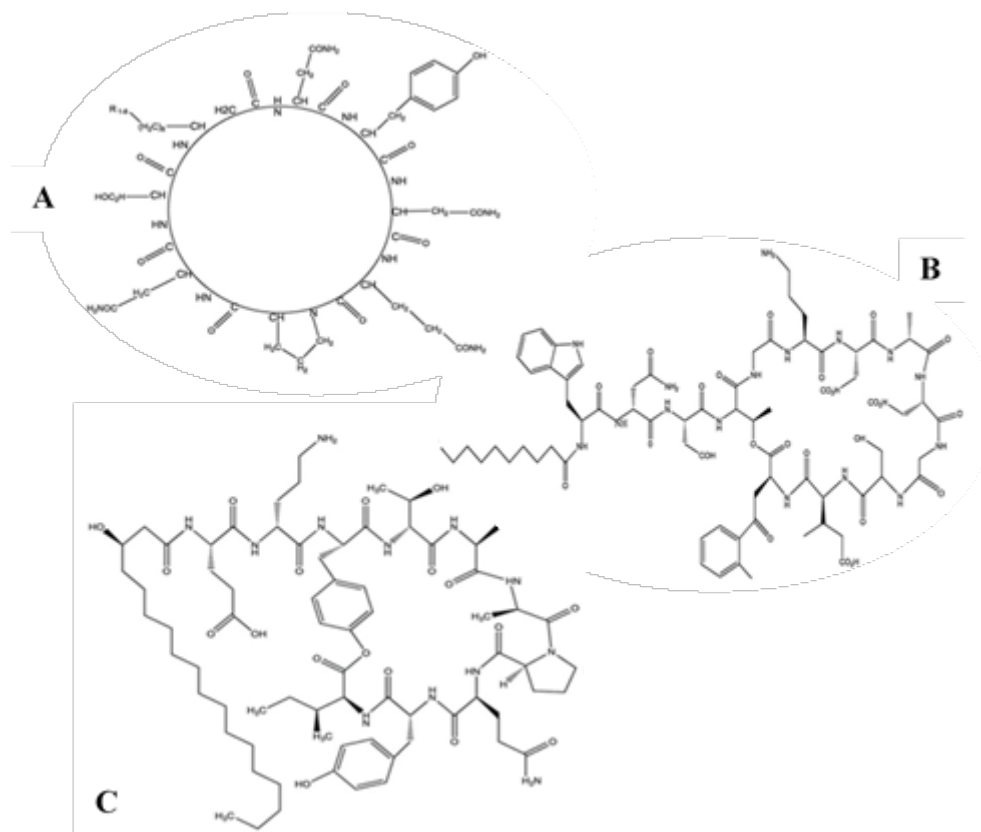


Figura 1. Estructura básica de las tres familias de lipopéptidos producidos por bacterias del género *Bacillus*. **A.**Surfactina, **B.** Iturina y **C.** Fengicina. Modificada de Beltrán-García *et al.* 2017.

2.2.1.2. Familia iturina. Las iturinas están compuestas de un anillo de siete aminoácidos, incluyendo una d-Tyr², los cuales tienen una secuencia quiral LDDLLDL que se cierra con un β-aminoácido alifático con una cadena de 14-17 carbonos (Beltran-Garcia *et al.* 2017), (Fig. 1B). Esta familia se caracteriza por ser lipopéptidos cíclicos con actividad fungicida. La variabilidad en la secuencia de aminoácidos ocasiona polimorfismos que dan lugar a Iturina A, Iturina C, Iturina D, Iturina E, Bacilomicina D, Bacilomicina F, Bacilomicina LC y Micosubtilisina (Ali *et al.* 2014). Se ha demostrado que las iturinas forman canales conductores de iones potasio y tienen actividad antifúngica, como resultado de su interacción con los esteroides de la membrana de los hongos (Shafi *et al.* 2017).

2.2.1.3. Familia fengicina. Estas moléculas, también llamadas plipastinas, tienen un anillo lactona entre el fenol de la Tyr-3 y el C- terminal (Fig. 1C). La fracción peptídica está unida a un β—

hidroxilípido de 14-18 carbonos, esta cadena grasa puede ser saturada o insaturada (Ongena y Jacques 2008). Las fengicinas reaccionan rápidamente con la bicapa lipídica de la membrana celular, afectando su estructura y la permeabilidad (Beltran-Garcia *et al.* 2017).

2.3. Diseño de Bioprocesos

El diseño de procesos (sean químicos o biológicos) es un trabajo conceptual que se realiza para llevar a cabo un proceso específico, antes de construir, expandir o reequipar una planta. Consiste en dos actividades básicas que están íntimamente relacionadas, la síntesis y el análisis de proceso. La síntesis de proceso se refiere a la selección y ordenamiento de una serie de operaciones unitarias (etapas), para llevar a cabo la transformación de la materia prima en un producto específico con una calidad y costo aceptables. El análisis de proceso es la comparación de posibles soluciones para cada fase del proceso. Esta actividad se lleva a cabo después de cada etapa, es lo que da pie a la etapa subsecuente y deben de considerarse las etapas previa y sucesivas (Petrides *et al.* 2015).

Un bioproceso se define como cualquier proceso en el que se utilicen células completas o sus componentes, para producir un cambio físico o químico en los materiales (Sindhu *et al.* 2016). Se divide en tres etapas: río arriba, biorreactor y río abajo. En la Figura 2 se muestra el diagrama de flujo de un bioproceso para la producción de un biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* (Rowe y Margaritis 2004).

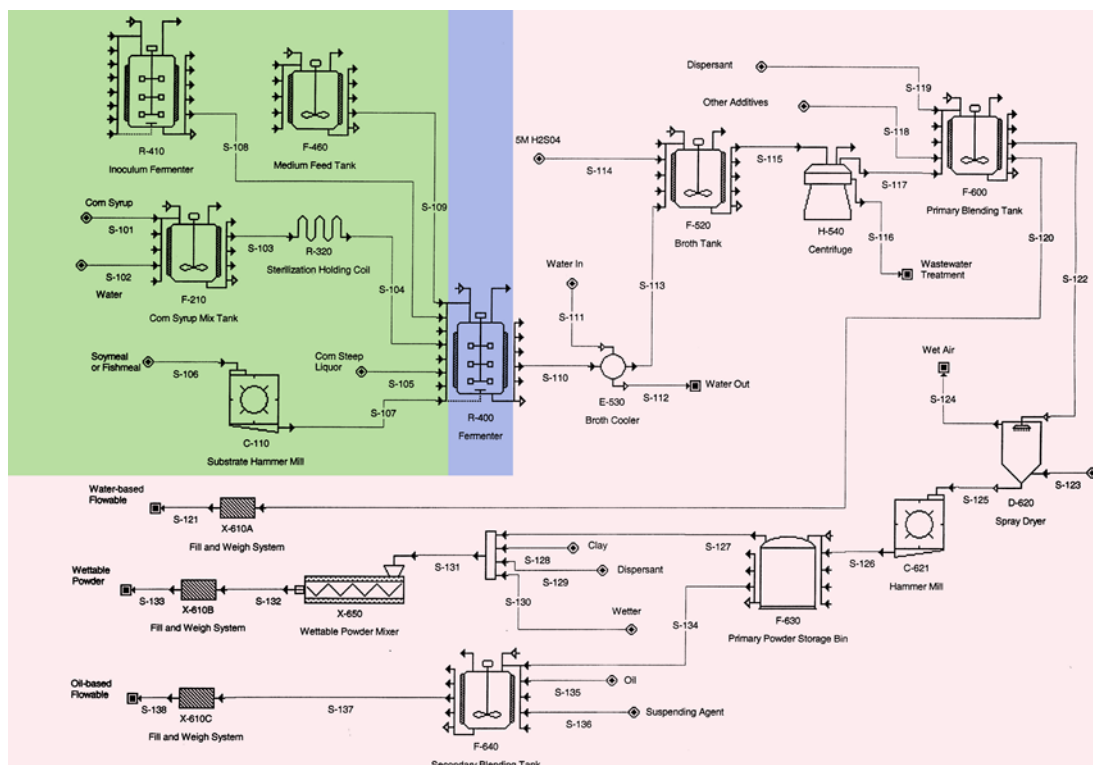


Figura 2. Diagrama de un bioproceso para la producción de *B. thuringiensis* a escala comercial, representando en color verde las etapas río arriba, en azul el biorreactor y en rosa la etapa río abajo. Modificada de Rowe y Margaritis (2004).

2.3.1. Etapa Río Arriba

La etapa río arriba del bioproceso, involucra todos los pasos previos al biorreactor, tales como preparación del inóculo y del medio de cultivo, esterilización del reactor y del medio. Algunos autores incluyen también la investigación relativa al mejoramiento genético y la optimización de la cinética de crecimiento (Verma *et al.* 2014).

Una parte fundamental para un bioproceso es la conservación del material biológico (DTU Food, 2014), por lo que resulta imprescindible contar con un suministro de células u organismos estables y bien caracterizadas como punto de partida, para tener un proceso robusto y un producto de calidad constante (Hunter-Cervera y Belt 1996). Para evitar la pérdida de características del material biológico por los cultivos repetidos o por un mal manejo, éste se conserva mediante lotes de

siembra en dos niveles: 1) lote de siembra de referencia y 2) lote de siembra de trabajo (Puerto *et al.* 2004). En el lote de siembra de referencia se tiene almacenada la cepa por un largo período y es utilizada para confirmar la identidad, pureza y disponibilidad del microorganismo en caso de ser necesario, pueden utilizarse diversas metodologías para el almacenado, tales como la conserva en tubos de agar inclinado (Hunter-Cervera y Belt 1996) o el más reciente, congelamiento en glicerol a -80°C (Alonso 2018). El lote de siembra de trabajo se prepara a partir del lote de siembra de referencia y a partir del lote de trabajo se prepara el inóculo para el inicio del proceso. En el caso de organismos esporulados puede emplearse como lotes de trabajo discos de papel filtro con una cantidad conocida de esporas, (Farrera *et al.* 1998; López-y-López y De la Torre, 2005).

Una vez conservada la cepa, es necesario el desarrollo o selección del medio de cultivo con el que se va a trabajar. La selección de la fuente de carbono y nitrógeno durante un bioproceso está directamente relacionada con el rendimiento en la producción, debido a que afectan directamente la biomasa y la generación de los metabolitos secundarios (Singh *et al.* 2017). La elección de los sustratos dependerá de cuanto contribuyen las materias primas al costo unitario del producto, la pureza requerida para que el producto final cumpla con las especificaciones demandadas por el mercado, ya que la eliminación de impurezas durante las operaciones de purificación puede incrementar sustancialmente tanto la inversión como los costos de operación y por ende el costo unitario. Según el análisis económico realizado por Rowe y Margaritis (2004), los costos de materia prima corresponden al 17% de los gastos anuales para la producción comercial de *B. thuringiensis* por lote alimentado en un reactor de 300 m³ y representan el segundo gasto más importante después de los servicios (agua, electricidad, gas, etc.), la suma de ambos conceptos contribuyen al 46.18% de los gastos anuales.

2.3.2. Biorreactor

El biorreactor es el elemento central del proceso, es donde se lleva a cabo la transformación de la materia prima en producto, que puede ser la producción de biomasa, la síntesis de metabolitos o una biocatálisis (Tejeda *et al.* 2011). En el caso de procesos con microorganismos, los procesos

más comunes son el cultivo en lote o lote alimentado. En un régimen por lote la fermentación se lleva a cabo en un sistema cerrado, donde todas las materias primas se colocan en el reactor, se esterilizan y se procesan, lo único que entra al reactor una vez esterilizado son gases y soluciones para regular el pH; en un régimen por lote alimentado uno o más nutrientes se adicionan al reactor durante el proceso de fermentación (Sindhu *et al.* 2016).

Para obtener altas densidades celulares, que generalmente conllevan a altos rendimientos del producto deseado y altas productividades volumétricas, es común en la industria utilizar un régimen por lote alimentado, pero el estudio realizado por López-y-López y de la Torre (2005) utilizando *B. thuringiensis* sugiere que a alta densidad celular no se mantiene la relación células vegetativas: esporas. Estos autores reportaron que la eficiencia de esporulación en régimen por lote fue del 93%, mientras que la mayor eficiencia en el sistema por lote alimentado fue de 76%; estos resultados fueron similares a los reportados por Monteiro *et al.* (2014), donde utilizando un régimen por lote alimentado obtuvieron una eficiencia de esporulación de 31%, mientras que en el régimen por lote la eficiencia fue cercana al 50%. Por lo tanto, cuando el producto son las esporas la selección del régimen y las condiciones de fermentación se deben seleccionar con base al rendimiento de esporas y no a la densidad celular, tomando en cuenta que la esporulación es un mecanismo complejo de diferenciación celular que depende de diversos factores (Gauvry *et al.* 2019).

2.3.3. Etapa Río Abajo

En ésta última etapa es donde se procesa el producto para cumplir los estándares de calidad del producto final (Sindhu *et al.* 2016; Verma *et al.* 2014). Los requerimientos dependerán de la naturaleza del producto y el mercado blanco (Petrides *et al.* 2015; Tejeda *et al.* 2011), por ejemplo, un producto para la industria farmacéutica requiere una mayor pureza que un producto para uso agrícola, aun cuando el principio activo sea el mismo, como es el caso de los lipopéptidos (Alajlani *et al.* 2016).

Dentro de los estándares de calidad se encuentra la presentación del producto, que es dependiente

del modo de aplicación y es determinante para la selección de las operaciones unitarias. Por ejemplo, en el caso de productos para el control de fitopatógenos será necesario un secado si el producto es un polvo humectable (Zhang *et al.* 2014) y una emulsificación cuando el producto se formule como una suspensión oleosa (Rhodes 1993).

Comúnmente la primera operación unitaria es la recuperación del producto del mosto. Cuando el producto son las células o las esporas, éstas se recuperan utilizando una centrífuga (Lalloo *et al.* 2010) y esta operación unitaria es generalmente precedida por una floculación para aumentar el tamaño de partícula (Luna *et al.* 2002; Luna *et al.* 2005), en el caso de hongos y levaduras se pueden utilizar filtros rotatorios o filtros prensa (Atkinson *et al.* 2010). En particular para *Bacillus* sp. es importante analizar si el medio de cultivo gastado es relevante para la efectividad del producto, ya que los lipopéptidos con actividad fungicida son excretados. Wang *et al.* (2014) utilizaron el medio de cultivo gastado de la fermentación de *B. amyloliquefaciens* para microencapsular los lipopéptidos producidos durante la fermentación, utilizando una mezcla de maltodextrina con almidón modificado enzimáticamente, en una relación 9:1, observando que el sobrenadante en polvo conservó 81.5% de la potencia antimicrobiana después del secado.

2.4. Formulación de Productos Agrícolas a Base de Microorganismos

El éxito de un producto microbiano depende de dos factores: la cepa utilizada y la formulación del producto (Sahu y Brahmaprakash 2016). La formulación de un bioproducto debe permitir el fácil transporte, una vida de anaquel de al menos seis meses (preferentemente a temperatura ambiente) y la efectividad del producto (Gotor-Vila *et al.* 2017; Stojanović *et al.* 2019). Los productos para el control biológico de plagas y enfermedades agrícolas se comercializan como suspensiones líquidas en agua o aceite, polvos humectables, microencapsulados, pellets, etc. (Jeep *et al.* 2015).

Es común que para formulaciones de polvos humectables se utilicen arcillas o talco como acarreadores (Mareeswaran y Radhakrishnan 2016; Stojanović *et al.* 2019), pero éstos pueden presentar problemas cuando son suministrados por el sistema de riego, como el taponamiento de

las boquillas y/o una distribución ineficiente del producto (Ramyabharthi *et al.* 2016). Por ello se prefieren las formulaciones líquidas, las cuales se pueden aplicar con mayor facilidad y también como pretratamiento a las semillas (Mahanty *et al.* 2016). El principal problema de los formulados microbianos líquidos es que la vida de anaquel tiende a ser menor que la de productos formulados en sólido (Gotor-Vila *et al.* 2017; Rhodes 1993). En el caso de un producto a base de esporas de *Bacillus* sp. se requiere una formulación que mantenga a las esporas viables y evite que germinen. Para estabilizar al microorganismo durante la etapa río abajo, el almacenaje y la distribución, así como para facilitar el manejo y aplicación se utilizan estabilizadores, emulsificantes, adherentes y antioxidantes, según sea necesario para la formulación y/o modo de aplicación (Thompson *et al.* 2014; Wigley *et al.* 2017). Además, es común encontrar en formulaciones líquidas polímeros de alto peso molecular, solubles en agua y no tóxicos como povidona, polietilenglicol, goma xantana y carbometilcelulosa, entre otros (Dheskali *et al.* 2017; Jabs *et al.* 2014; Ramyabharthi *et al.* 2016; Sahu y Brahmaprakash, 2016; Thompson *et al.* 2014).

2.5. Análisis Económico de Bioprocesos

El análisis económico de un proyecto para la manufactura de un producto biológico involucra la estimación del capital de inversión total, los costos de operación y el análisis de rentabilidad (Petrides *et al.* 2015). El análisis puede hacerse a partir de datos reportados en la literatura, experimentos previos o información de otros proyectos relacionados, esto permite identificar cuellos de botella y observar la viabilidad del proyecto en etapas tempranas antes de realizar cualquier tipo de inversión, así como determinar en donde se deben enfocar los esfuerzos para reducir costos de operación e inversión.

2.5.1. Estimación de Costos de Operación

El costo para operar una planta es la suma de los gastos asociados a la manufactura y los gastos

generales. Los gastos de manufactura incluyen elementos que afectan directamente los costos de producción (operacionales, gastos fijos y de la planta). Los gastos operacionales están en función del volumen de producción, estos incluyen: 1) el costo de la materia prima, 2) la mano de obra, 3) servicios (vapor, electricidad, gas, etc.) y 4) consumibles. En los gastos fijos se agrupan a la planta física, la depreciación, impuestos y seguro. Los gastos de planta incluyen cargos de servicios que no afectan directamente el costo del producto, como el servicio de limpieza, contabilidad, personal, etc. Finalmente los gastos generales, incluyen los cargos por mercadotecnia, administración general e investigación (Asaff-Torres y Torre-Martinez, 2003).

Rowe y Margaritis (2004) realizaron un análisis económico para la producción de *B. thuringiensis* como agente de control biológico. La planta tenía una capacidad de producción anual de 9.67×10^{17} esporas viables·mL⁻¹. En el Cuadro 2 se presenta el análisis de costos de manufactura, donde se aprecia que más del 50% de los costos de operación corresponden a gastos operacionales, siendo los que más contribuyen los servicios y las materias primas, con un 28.96 y 17.28% respectivamente. Para este análisis los autores se basaron en el rendimiento y procesos de estudios previos, llegando a la conclusión de que el mejor régimen de fermentación era el de un cultivo por lote alimentado a baja densidad celular (23.8 g·L⁻¹), debido a que se obtenía una mayor eficiencia de esporulación, obteniendo un rendimiento de 3.9×10^{10} de esporas·mL⁻¹ y una toxicidad de 1.21 BIU.

Cuadro 2. Análisis de costos anuales de proceso presentado por Rowe y Margaritis (2004)

Tipo de gasto	Estimado anual (Dólares Canadienses)	Porcentaje que representa	Porcentaje de categoría de gasto
Gastos Operacionales			
Materia prima	\$ 1,516,000.00	17.28%	
Mano de obra de operación	\$ 640,000.00	7.30%	
Consumibles de operación	\$ 147,000.00	1.68%	55.22%
Servicios (gas, vapor, electricidad, etc.)	\$ 2,540,000.00	28.96%	
Gastos fijos			
Depreciación (15 años)	\$ 1,304,000.00	14.87%	19.77%
Impuestos y seguro	\$ 430,000.00	4.90%	
Gastos de planta			
Almacenamiento	\$ 521,000.00	5.94%	
Análisis de laboratorio	\$ 96,000.00	1.09%	19.55%
Mano de obra administrativa	\$ 120,000.00	1.37%	
Mantenimiento y reparaciones	\$ 978,000.00	11.15%	
Gastos Generales			
Distribución y desarrollo de mercado	\$ 349,000.00	3.98%	5.46%
Administración general	\$ 130,000.00	1.48%	
Total	\$ 8,771,000.00		

Costos de operación para la manufactura de 3×10^7 BIU·Año⁻¹ en un proceso por lote alimentado de baja densidad (23.8 g·L⁻¹).

2.5.2. Capital de Inversión Total

El capital de inversión total es el presupuesto requerido para construir y equipar la planta (capital fijo), más el capital necesario para comenzar a operar (capital de trabajo). El capital fijo incluye el terreno, la construcción del edificio y la ingeniería. El capital de trabajo es el fondo utilizado para el inventario de materias primas, consumibles y herramientas de almacén, además del equivalente a los salarios de los primeros tres meses de operación (Asaff-Torres y Torre-Martinez, 2003).

El punto inicial para estimar los costos de operación y costos de capital de producción es la producción anual de la planta, aunada al diagrama de flujo del proceso, más los balances de materia y energía. (Asaff-Torres y Torre-Martinez, 2003; Petrides, 2015). Para el proceso propuesto por

Rowe y Margaritis (2004) el capital de inversión total se resume en el Cuadro 3, se observa que el 69% del capital es para equipo e instalación.

Cuadro 3. Capital de inversión total presentado por Rowe y Margaritis (2004)

Tipo de Gasto	Costo (Dólares Canadienses)	Porcentaje que representa
Capital fijo		
Equipo e Instalación	\$ 12,904,600.00	68.92%
Construcción de Planta	\$ 3,637,100.00	19.42%
Capital de trabajo		
Contingencia y Cargos	\$ 2,182,300.00	11.66%
Total	\$ 18,724,000.00	

Capital de inversión total para la manufactura de 3×10^7 BIU·Año⁻¹ en un proceso por lote alimentado de baja densidad (23.8 g·L⁻¹), los costos están agrupados por tipo de gastos

2.5.3. Análisis de Factibilidad Económica

El conocer un estimado del precio de venta del producto, en conjunto con los dos puntos anteriores, permite el cálculo de diferentes parámetros económicos, como la tasa de retorno de inversión, el tiempo de recuperación, el valor actual y la tasa interna de retorno. Conociendo estos parámetros es posible determinar si el proyecto es atractivo desde un punto de vista de inversión (Asaff-Torres y de la Torre-Martínez, 2003) y también ayuda a discernir entre alternativas en el proceso. Rowe y Margaritis (2004) para evaluar la factibilidad económica de los procesos para producción de *B. thuringiensis* por lote, lote alimentado a baja y alta densidad celular variaron conjuntamente la escala de producción y el precio de venta (en dólares canadienses). Para el proceso por lote, el análisis antes mencionado arrojó como resultado en dólares canadienses un mínimo de venta de 9.67×10^{17} esporas·año⁻¹ a un precio de venta de \$0.45 por 3.22×10^{10} esporas·mL⁻¹ en dólares canadienses (C\$) para cubrir solamente el costo de la depreciación (\$ 1,304,000.00, C\$). Este precio es elevado, ya que los precios en el mercado oscilaban entre \$0.35 y \$0.45 por 3.22×10^{10} esporas·mL⁻¹ (C\$). En cuanto a los procesos por lote alimentado de baja (LABD) y alta densidad (LAAD), vendiendo la misma cantidad anual de producto, se estimó una tasa de retorno de inversión del 12 y 13.9%. Conociendo estos valores de retorno de inversión, los autores descartaron

el proceso LAAD y seleccionaron la fermentación LABD, aun cuando el proceso LAAD tuvo una ventaja económica del 2% en cuanto a retorno de inversión. La decisión se debió a los problemas con la alimentación y para satisfacer la demanda de oxígeno del sistema reportados por de Liu *et al.* (1994), que fue el estudio del cual tomaron los rendimientos de biomasa y unidades internacionales de toxicidad. Sin embargo, para que el análisis de factibilidad económica sea más realista es necesario utilizar rendimientos y concentraciones del proceso en las condiciones que se va a llevar a cabo, de preferencia de cada una de las operaciones unitarias.

3. HIPÓTESIS

La producción de un biofungicida en formulación líquida a base de esporas de *Bacillus* sp. es económicamente factible.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo General

Diseñar el proceso y la ingeniería conceptual para una empresa que produzca un fungicida a base de *Bacillus sp* en presentación líquida.

4.2. Objetivos Particulares

1. Seleccionar una cepa de *Bacillus sp.* y el medio de cultivo para el proceso.
2. Determinar la localización de la actividad inhibitoria del crecimiento de *Fusarium oxysporum*.
3. Estudiar la cinética de la fermentación.
4. Sintetizar el bioproceso para la producción de esporas de *Bacillus sp.*
5. Determinar la capacidad de la planta.
6. Determinar la factibilidad económica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de viales de conserva de la cepa *Bacillus subtilis* BD2-22, una bacteria endófito de semillas de *Agave angustifolia* procedente del estado de Sonora, México (Peralta-Mendoza, 2017). Se observaron siete morfologías de colonia distintas, las cuales se aislaron y preservaron en glicerol a -80°C y en discos de papel filtro. La cepa fitopatógena de *Fusarium oxysporum* fue aislada de la raíz de un limonero infectado en la costa de Hermosillo, esta cepa fitopatógena fue donada por CBN: Soluciones Biológicas C.V. La cepa de *F. oxysporum* se resembró a partir de la muestra donada y se conservó en discos de papel filtro hasta su uso.

5.2. Medios de Cultivo

Para el cultivo y la producción de inóculo de *F. oxysporum* se utilizó el medio agar papa dextrosa (PDA) (BD Difco®, EUA). Las cepas de *Bacillus* spp. se propagaron en agar tripticaseína de soya (TSA) (BD Bioxon®, EUA) o caldo tripticaseína de soya (TSB) (BD Bioxon®, EUA) y en los medios de producción formulados Farrera (Farrera *et al.* 1998), Heins modificado (se sustituyó la sacarosa por glucosa) y KSAH-modificado, se sustituyó el NH_4HCO_3 por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Mejía-Farfán 2008). La composición de los medios de producción se muestra en el cuadro 4.

Además de los tres medios descritos, se utilizaron modificaciones de los medios Farrera y Heins: HeinsB (sin agar); FarreraB (sin agar); sin las sales minerales presentadas en el cuadro 4 (FarreraSM); Farrera150, sin las sales minerales y ajustando los sólidos totales iniciales (STI) a 150 g·L⁻¹.

Cuadro 4. Medios de cultivo

	Farrera	Heins	KSHA
C:N	6.5	2.6	11.6
Materia prima	g·L ⁻¹		
Glucosa	13.42	11.6	40
Harina de soya	5.6	-	12
Sólidos de cocimiento de maíz	4.05	-	-
Extracto de levadura	2.59	6.71	0.5
MgSO ₄	0.2	1.6	0.5
MnSO ₄	0.04	-	0.05
ZnSO ₄	0.0058	-	0.0058
CuSO ₄	.0075	0.02	0.0075
KCl	3	-	-
FeSO ₄	0.00135	-	0.00135
CoCl ₂	0.03	-	0.00135
H ₃ PO ₄ (mL)	7	-	7
K ₂ HPO ₄	-	3.39	-
KH ₂ PO ₄	-	3	10.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	9.6	1.5
CaCl ₂	-	1.07	-
FeCl ₂	-	0.16	-
MnCl ₂	-	0.011	-
Peptona de soya	-	4.58	-
Pasta de soya	-	8.24	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-
Agar	15	15	15

Composición y relación C:N de los medios de cultivo de producción evaluados

5.3. Selección de Cepas de *Bacillus* spp. y Medio de Cultivo

5.3.1. Selección con Base a Desafíos en Placas de Petri

5.3.1.1. Primer cribado con cultivos puros. A partir de un cultivo de siete días de *F. oxysporum* en PDA, se cortó un círculo de 1 cm de diámetro de agar con micelio para ser utilizado como inóculo. El círculo se colocó en el centro de una placa de PDA y a 2.5 cm de distancia, alrededor del círculo,

se inocularon 5 μ L de cada una de las siete cepas de *Bacillus* spp., previamente suspendidas en agua destilada estéril. Como testigo se utilizó una placa de PDA inoculada con *F. oxysporum* sin los inóculos bacterianos. Ambas placas se incubaron a 30°C durante cuatro días.

5.3.1.2. Combinaciones de las cepas de *Bacillus* spp. Se cultivaron cada una de las siete cepas de *Bacillus* sp. en matraces de 125 mL (volumen nominal, VN) con en 12.5 mL del medio TSB (10% VN) durante 24 h, a 30°C y 200 RPM en un agitador orbital (Thermo Scientific MAXQ 8000, EUA). Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada uno de los cultivos, las cuales se centrifugaron a 11270 x g (Eppendorf centrifuge 5424, Alemania), durante 5 min; se descartó el sobrenadante y se lavaron las pastillas celulares con 1 mL de solución salina estéril al 0.9%. Este proceso se repitió tres veces para eliminar el medio de cultivo gastado. Después del tercer lavado, las células lavadas se suspendieron en 1 mL de solución salina estéril al 0.9%. En microplacas de 96 pozos se mezclaron 50 μ L de las suspensiones bacterianas en partes iguales, para tener un total de 21 combinaciones dobles, siete combinaciones de seis cepas y una combinación de las siete bacterias. Una suspensión de micelio de *F. oxysporum* se inoculó de manera masiva sobre la superficie de placas Petri de 13.5 cm de diámetro con los medios Farrera, Heins o KSHA. Las placas se dejaron secar 30 min en la campana de flujo laminar. Cada placa se inoculó con 21 gotas de 5 μ L de las combinaciones bacterianas o de las siete cepas individuales, y se incubaron durante 4 días a 30°C, para evaluar la presencia de halos de inhibición.

5.3.1.3. Segundo cribado. Se evaluaron las cepas AcX y AcB en los medios de cultivo, Farrera, Heins, y KSHA, utilizando una modificación de la metodología presentada por Zhao *et al.* (2016). 100 μ L de suspensión de micelio de *F. oxysporum* se esparcieron de manera masiva con ayuda de perlas de vidrio estériles sobre las placas inoculadas durante 30 min en la campana de flujo laminar. Sobre el agar previamente inoculado con el fitopatógeno, se inocularon 5 μ L de cada una de las cepas de *Bacillus* sp. que mostraron actividad antifúngica en la prueba cualitativa y se incubaron a 30°C durante 4 días para medir los halos de inhibición con Adobe® Photoshop CS4 ver. 11 (2008).

5.3.2. Selección de las Cepas de *Bacillus* sp. con Base en la Promoción del Crecimiento de *Cicer arietinum*

Se germinaron 50 semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) en un semillero de 50 pozos, en el cual se colocó al fondo de cada pozo 20 cm³ de gravilla fina de origen volcánico (sustrato para suculentas #1, Bazar de Bonsai, México) para ayudar a la filtración. Sobre la gravilla se colocaron 75 cm³ de sustrato preparado (Tierra Preparada PREMIUM, Nutrigarden, México). En cada pozo se hizo un pequeño agujero de aproximadamente 2.5 cm de profundidad, sobre el que se introdujo una semilla y se cubrió con el sustrato circundante. De manera independiente se cultivaron en matraces de 250 mL con 25 mL de medio de cultivo las cepas AcX (FarreraB), AcB (FarreraB y HeinsB) y AcX+AcB (FarreraB) durante 48 h a 30°C y 200 RPM en un agitador orbital. Después se realizaron diluciones seriadas y se contabilizaron las células totales en la cámara de Neubauer para ajustar la concentración bacteriana a 1×10^6 células·mL⁻¹ con agua destilada.

Se dividió el semillero en 5 secciones (dos columnas con diez pozos cada columna) y a cada sección se le aplicaron 15 mL por pozo del tratamiento correspondiente, se utilizó el mismo volumen de agua como testigo. El semillero se cubrió con plástico transparente para evitar la pérdida excesiva de humedad. Quince días después de la siembra se determinó el porcentaje de germinación, a los veinte días las plántulas se trasplantaron a macetas de 473 cm³, a cada maceta se le colocaron 50 cm³ de gravilla fina de origen volcánico y se cubrió con sustrato (Tierra Negra Especial, Garden's®, México) Se aplicó un segundo tratamiento de 10 mL de las suspensiones bacterianas a una concentración de 1×10^6 células·mL⁻¹ al momento del trasplante. Pasados 45 días desde la siembra de las semillas en el semillero, se evaluaron las propiedades biométricas desarrollo de raíz, crecimiento de parte aérea y el peso seco de las plantas (secado a 50°C hasta tener un peso constante) (Suárez-Moreno *et al.* 2019). Se compararon los datos mediante ANOVA de una vía.

5.4. Localización de la Actividad Inhibitoria del Crecimiento de *F. oxysporum*

5.4.1. Cultivo Puro de *Bacillus* sp. AcX

Se cultivó a la cepa AcX en matraces de 125 mL (VN) con 12.5 mL de medio FarreraB durante 48 h a 30°C y 200 RPM en agitador orbital (Pretorius *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2014). De este cultivo se obtuvo: el sobrenadante libre de células, las células y el medio gastado. Para obtener el sobrenadante libre de células se tomó una alícuota del cultivo, se centrifugó a $11269 \times g$ durante 5 minutos, se separó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana Millipore® tipo GS estéril de 0.22 μm . La pastilla celular se resuspendió con solución salina estéril al 0.9%, se centrifugó a las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante, este proceso se llevó a cabo tres veces para eliminar los restos del medio de cultivo. La pastilla resultante de la tercera centrifugación se resuspendió con 1 mL de solución salina estéril al 0.9% y El contenido del matraz fue agitado para tomar 1 mL del medio gastado

En placas Petri con medio Farrera preinoculadas con el patógeno, cómo se describió anteriormente en el experimento de Segundo Cribado, se colocaron 6 discos de papel filtro, sobre los cuales se inocularon 5 μl de cada una de las muestras (células, sobrenadante y medio gastado) Las placas se incubaron a 30°C durante tres días y se midieron los halos de inhibición utilizando el método descrito previamente. Se hicieron tres réplicas por duplicado de cada muestra.

5.4.2. Cocultivo de *Bacillus* sp. AcX y *F. oxysporum*

Se hicieron los ensayos en medio de cultivo FarreraB. *F. oxysporum* y *Bacillus* sp. AcX como cultivos puros o en co-cultivo se cultivaron en matraces de 125 mL (VN) con un volumen de operación de 10% del VN. Los matraces para el cultivo de *F. oxysporum* o *Bacillus* sp. se inocularon con discos de conserva con 1×10^5 y 2×10^6 esporas. mL^{-1} respectivamente; y se

incubaron durante 48 horas a 30°C en agitación orbital a 200 RPM. El co-cultivo se inoculó inicialmente como el cultivo axénico de *F. oxysporum* e incubó durante 24 horas bajo las mismas condiciones, después se inoculó con 1 mL del cultivo axénico de *Bacillus* y se incubó 24 h más a las mismas condiciones. Terminado el periodo de incubación, se tomaron alícuotas de los cultivos para obtener el sobrenadante libre de células siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se inocularon 5 µL de cada uno de los filtrados por triplicado en discos de papel filtro estériles sobre placas con el medio de cultivo Farrera, previamente inoculadas con *F. oxysporum*. Las placas se incubaron durante cuatro días a 30°C y se determinó el índice de inhibición.

5.5. Efecto de la Adición de Elementos Traza al Medio Farrera Sobre la Esporulación de *Bacillus* sp.

La cepa AcX se cultivó por triplicado en matraces de 250 mL con 25 mL del medio de cultivo FarreraSM (sin la adición de las sales: MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, KCl, FeSO₄ y CoCl₂). Los matraces se incubaron a 30°C y 200 RPM durante 48 horas. Se utilizó el medio FarreraB como testigo. Se determinaron la cuenta total y la eficiencia de esporulación, los resultados se compararon con ANOVA de una vía.

5.6. Cinéticas de Crecimiento de la Cepa AcX

5.6.1. Cinéticas de Crecimiento en Matraz

La cepa AcX se cultivó en dos matraces de 500 mL (VN) con 50 mL del medio FarreraSM cada uno. Los matraces fueron inoculados con un disco de papel filtro con 6×10^6 esporas, e incubados a 30°C y 200 RPM en la agitadora orbital. Se tomaron muestras de 200 µL cada dos horas durante las primeras 24 h y a las 32, 48 y 72 h.

5.6.2. Cinéticas de Crecimiento en Biorreactor

Se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado con un volumen nominal de 3 L (Applikon ADI BioConsole 1010 / BioController ADI 1025, Holanda), las condiciones de operación fueron temperatura, aireación y agitación constantes a 30°C, 0.2 VVM (condiciones estándar de presión y temperatura) y 600 RPM respectivamente (Farrera *et al.* 1998). El inóculo se preparó a partir de dos discos de 2×10^6 esporas de la cepa AcX con los que se inoculó un matraz de 1 L con 100 mL del medio FarreraSM el cual se incubó a 30°C durante 8 h a 200 RPM. Cuando se utilizó el medio FarreraSM se muestreó cada hora durante las primeras 12 horas, después cada 2 h hasta las 24 h y posteriormente cada seis horas hasta las 48 h. El pH fue monitoreado, pero no controlado, se añadió antiespumante cuando fue necesario.

Se realizaron dos cinéticas de crecimiento utilizando el medio Farrera150. En la primera se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente y el régimen de muestreo fue también el mismo. En la segunda, se mantuvo un nivel de oxígeno disuelto mínimo de 40%, para lo cual se enriqueció el aire con oxígeno, cuando fue necesario se suministró oxígeno puro y también se varió la velocidad de agitación entre 500 y 1300 RPM, según se requirió. Para ambas cinéticas se añadió antiespumante cuando fue necesario, el pH se mantuvo por debajo de 7.5 utilizando H_3PO_4 4M y la temperatura se controló automáticamente a 30°C. La aireación se mantuvo constante a 1 VVM (volumen de aire bajo condiciones estándar por volumen de líquido por minuto).

5.6.3. Estudio de Vida de Anaquel

Se cultivó la cepa AcX en matraces con FarreraSM bajo las condiciones descritas anteriormente durante 48 horas y se utilizó el medio gastado (que contenía células vegetativas, esporas y metabolitos producidos durante la fermentación) como base para las distintas formulaciones ensayadas, las cuales fueron: Polividona (Biradar y Santhosh 2018), Glicerol (Singleton *et al.* 2002), Polividona + Glicerol (Dayamani 2010), Ácido acético (Reuter 2016) y Polividona +

Glicerol + Ácido acético; cada ingrediente se formuló al 2% v/v o m/v según fuese el caso. Las formulaciones se almacenaron a: 30, 25, 20 y 4°C. Se determinó la cuenta total y la cuenta de esporas a los 7, 14, 21, 28 y 38 días. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

5.6.4. Síntesis del Proceso

El proceso se sintetizó para formular un producto líquido directamente con el medio gastado tal y como se obtiene al final de la fermentación. Se consideró el rendimiento de esporas de la cepa AcX en medio Farrera150 propagada en el biorreactor sin limitación de oxígeno. Se diseñaron dos procesos, uno para la fabricación un producto líquido y el otro como un polvo humectable.

5.7. Determinación de la Capacidad de la Planta y Especificaciones Técnicas de los Equipos Principales.

La capacidad de producción de la planta y el dimensionamiento de los equipos principales se determinaron a partir de la producción requerida para proteger el 4.5% del total de hectáreas de alto riesgo de infección de *F. oxysporum* en la costa de Hermosillo (Fierros Leyva *et al.* 2019). La demanda se calculó con base en la dosis y aplicaciones del producto SERENADE® ASO de Bayer ($2 \text{ L} \cdot \text{Ha}^{-1}$, 2 aplicaciones·ciclo⁻¹).

5.8. Análisis Económico

Con los datos dados por los costos de materias primas, costos de equipos de proceso y las guías de Petrides *et al.* (2015) adaptadas a un proceso de menor escala, se calcularon los costos de capital fijo, costos de operación y se realizó el análisis de rentabilidad para la producción a pequeña escala

de un biofungicida a base de endosporas de *Bacillus* sp. en dos presentaciones (líquido y polvo humectable), utilizando el medio de cultivo Farrera150.

5.9. Medición de la Inhibición del Crecimiento de *F. oxysporum*

Para medir los halos de inhibición, se tomaron fotografías de las placas de Petri a la misma altura y con la misma cámara para conservar la densidad de pixeles. Se midió el área en pixeles con el software Adobe® Photoshop CS4 ver.11 2008 (Chun *et al.* 2015) utilizando la herramienta de lazo magnético para seleccionar el perímetro de los halos de inhibición más las colonias y el de solo las colonias (Fig. 3). El índice de inhibición se calculó utilizando la ecuación 1.

$$\text{Cálculo de coeficiente de inhibición} \quad I = \frac{H-C}{H}$$

Donde I representa el coeficiente de inhibición, H representa el área del halo de inhibición más el área de la colonia, C representa el área de la colonia

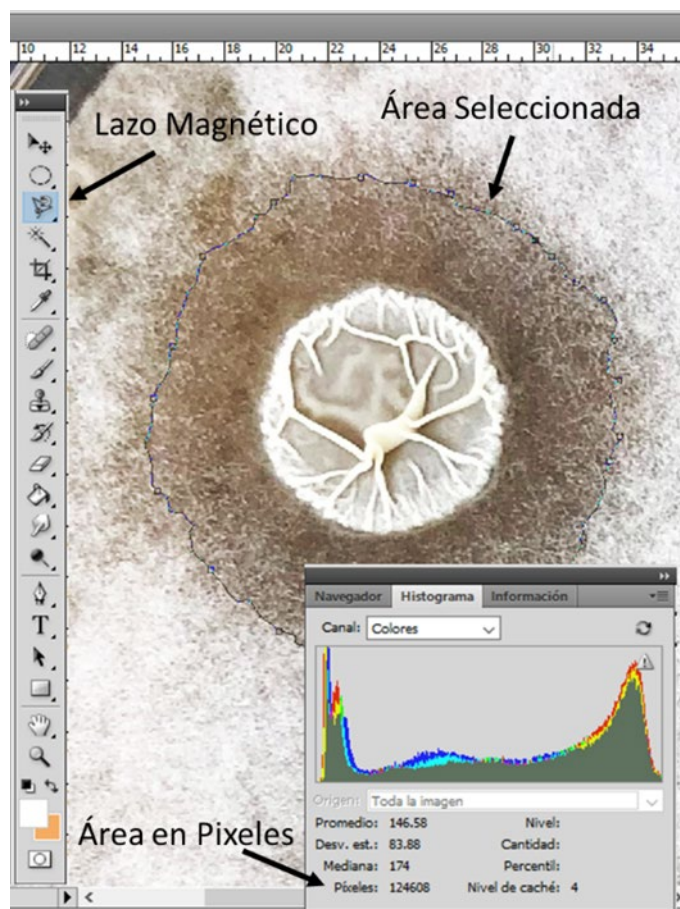


Figura 3. Ejemplificación de las mediciones realizadas de halos de inhibición con el software Adobe® Photoshop CS4 ver. 11 2008. Se utilizó la herramienta lazo magnético, para la selección del área de cada halo de inhibición. En la ventana de Histograma se puede observar el área en píxeles de la selección.

5.10. Cuantificación de Esporas, Unidades Formadoras de Colonias y Cuenta Total

5.10.1. Cuenta Total

Para la cuenta del número más probable de células totales, se realizaron diluciones seriadas en agua estéril del medio gastado, se tomó una alícuota de la dilución seleccionada (10 μ L) y se colocó en los extremos del cubre objetos de la cámara de Neubauer. Se observó con el objetivo 40X al microscopio (Zeiss, Axiostar plus, Alemania) y se contaron los bacilos y esporas presentes en

cuatro cuadros grandes de la esquina inferior izquierda.

5.10.2. Unidades Formadoras de Colonias

La determinación se hizo por dilución seriada por conteo en gota (Chen *et al.* 2003; Naghili *et al.* 2013). El medio de cultivo se diluyó por triplicado en factores de 10 en microplacas de 96 pozos a un volumen de 300 μ L. Las diluciones se inocularon por triplicado en placas de TSA (21 gotas de 5 μ L por placa) e incubaron de 16-24 h a 37°C, hasta observar microcolonias que pudieran ser contadas en un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi DV4, Alemania).

5.10.3. Esporas

Una alícuota del medio gastado se incubó a 80°C en un baño de agua (Thermo Scientific Precision 6P05, EUA) durante 15 min para inactivar a las células vegetativas (Monteiro *et al.* 2014). Posteriormente se utilizó el método de dilución seriada por conteo en gota por triplicado descrito para contar las unidades formadoras de colonias (UFC).

5.10.4. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab® ver. 19.2.0. Se consideró una diferencia significativa cuando $p < 0.05$, en caso de existir diferencias significativas, se utilizó una prueba de comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha=0.05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Selección de Cepa de *Bacillus* sp. y Medio de Cultivo de Producción

6.1.1. Primer Cribado

Se realizó un análisis cualitativo en placas de Petri con agar PDA para determinar cuál o cuáles de las siete cepas de *Bacillus* spp. controlaban el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro* (Fig. 4). En este experimento se observó que dos de las siete cepas (AcX y AcB) delimitaban el crecimiento del fitopatógeno, tras cuatro días de incubación en agar PDA. Para identificar si el medio de cultivo tenía algún efecto sobre la actividad antifúngica de las cepas de *Bacillus* spp., se probaron las siete cepas en los medios de producción: Farrera, KSHA y Heins (Fig.5). En primera instancia se pudo observar que se presentan dos tipos de halos de inhibición, uno donde se atenúa el crecimiento del hongo alrededor de la colonia, como el que presenta la cepa ToA2, y otro en donde no crece el patógeno alrededor de la colonia (cepas AcB y AcX).

En los mismos medios de producción se probaron combinaciones de las siete cepas. En la combinación de las siete bacterias (Fig. 5, columna C7) en lugar del halo transparente que presentaron las cepas AcB y AcX de forma individual se observó un halo de crecimiento atenuado, este fenómeno se observó en los tres medios de cultivo. Los resultados de las combinaciones sextuples se muestran en la Fig. 6, se observa en los medios Heins y KSHA que todas las combinaciones presentaron halos de inhibición con crecimiento atenuado del fitopatógeno. En el medio Farrera se mantuvo la característica del halo de inhibición transparente cuando las cepas AcB y AcX formaban parte de la combinación.

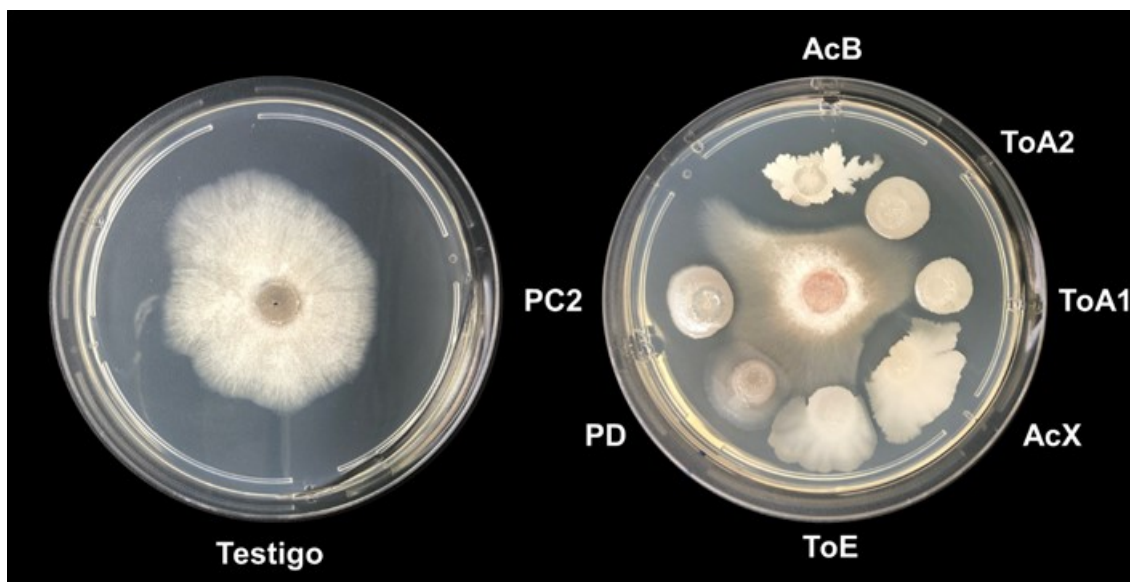


Figura 4. Prueba cualitativa para la identificación de las cepas con actividad antifúngica. Puede observarse el control del fitopatógeno ejercido por las cepas AcB y AcX tras cuatro días de incubación

En el caso de las combinaciones dobles, las combinaciones en las que se mantuvo el halo de inhibición transparente en los tres medios fueron: AcX-AcX, AcX-AcB y AcB-AcB. En el medio KSHA en la combinación AcX-PD también se mantuvo el halo transparente. En KSHA la morfología de la cepa AcB se modificó, de ser una colonia plana, irregular con borde lobular, pasó a ser una colonia con forma de papila circular con borde ondulado (Fig. 7).

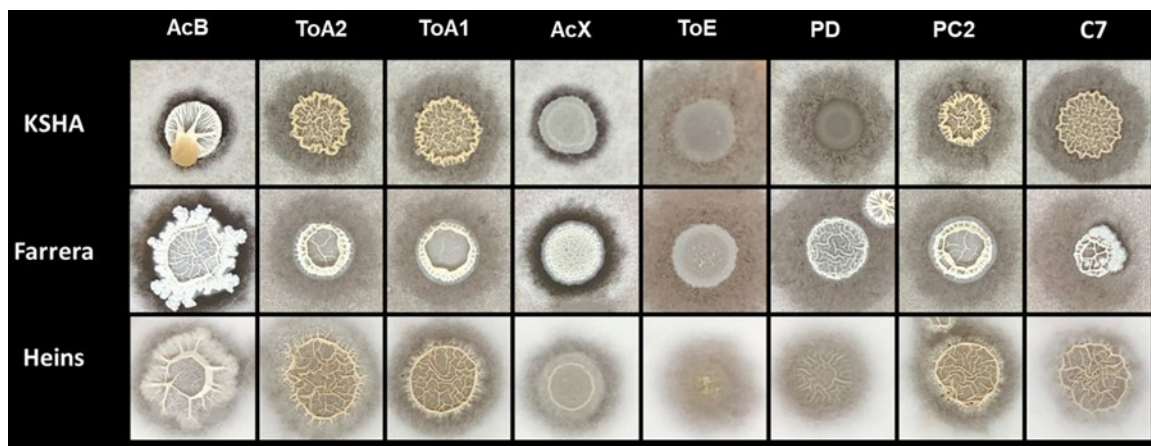


Figura 5. Análisis cualitativo del control de *Fusarium oxysporum* de las siete cepas de *Bacillus* spp. en tres medios de producción distintos. En la columna 8 de izquierda a derecha se muestra la combinación de las siete cepas contra el fitopatógeno (C7).

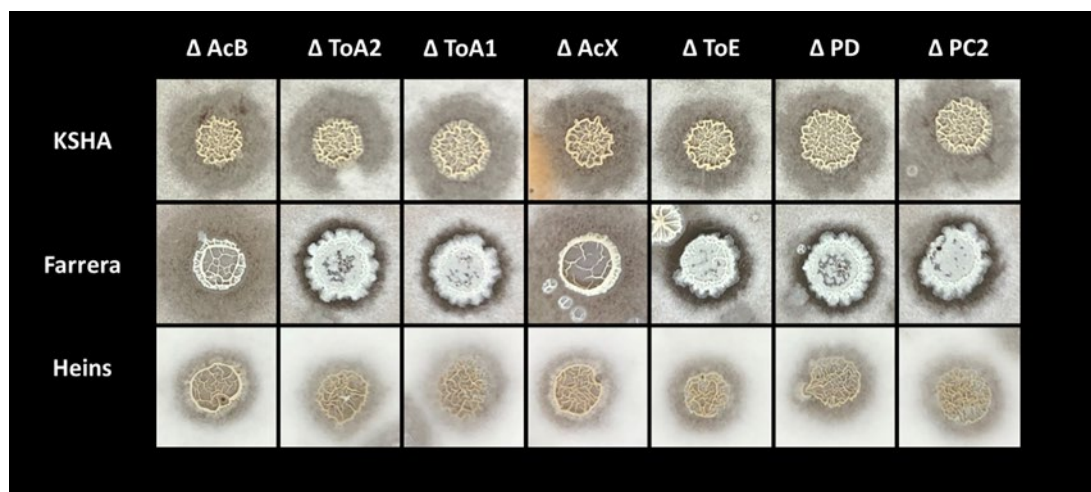


Figura 6. Combinaciones séxtuplas de las siete cepas de *Bacillus* spp. en los tres medios de producción. La mayoría de las combinaciones séxtuplas en los tres medios presentaron el mismo tipo de halo de inhibición que la combinación séptuple, excepto las combinaciones donde se podían encontrar a las cepas AcX y AcB juntas en el medio Farrera.

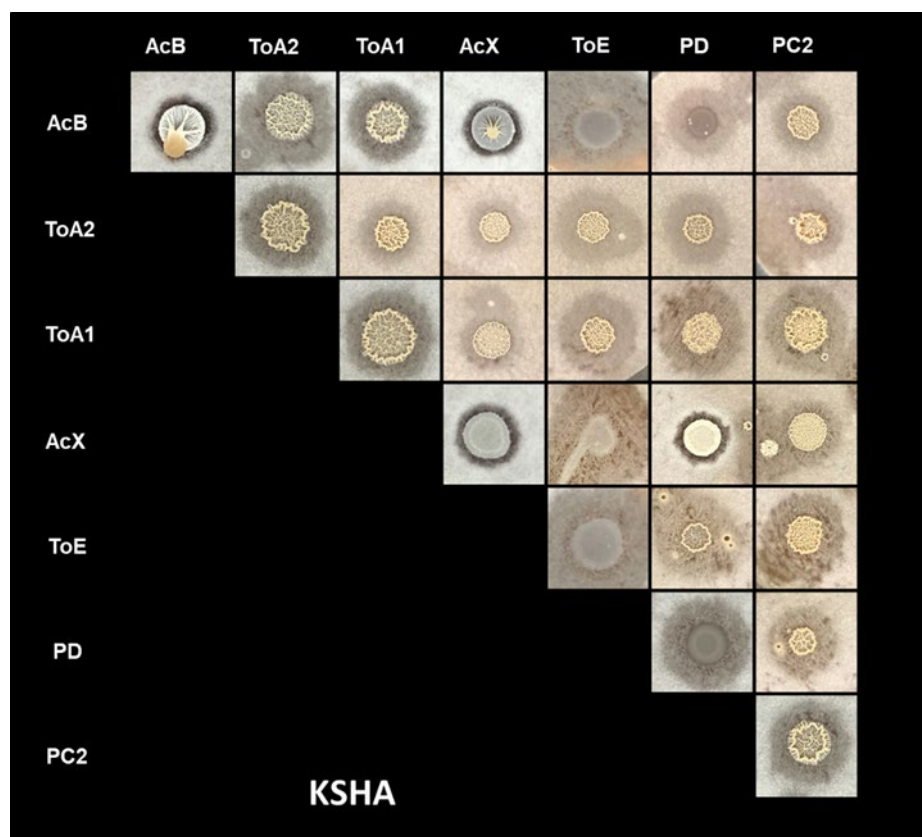


Figura 7. Combinaciones dobles de las cepas de *Bacillus* spp. en medio KSHA. Las cepas AcX y AcB pierden características de formar halos de inhibición transparentes al estar combinadas con otras cepas que no sean ellas mismas y el único caso de la combinación AcX-PD.

En el medio Farrera fue dónde se observaron la mayor cantidad de halos de inhibición transparentes, todas las combinaciones que involucraban a AcX y/o AcB mostraron el halo de inhibición transparente característico de estas dos cepas. En medio Heins, el patógeno produjo mucho micelio aéreo, lo que dificultó la apreciación de los halos de inhibición (Fig. 8).

La aplicación de microorganismos como consorcios ha probado ser efectiva y consistente para el control de hongos fitopatógenos y para la promoción de crecimiento (Palmieri *et al.* 2017; Sarma *et al.* 2015). Sin embargo, en los consorcios formados con las cepas de *Bacillus*

analizadas en este estudio no hubo un efecto mayor, ni siquiera aditivo, en la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*; e incluso algunas cepas que tuvieron efecto antifúngico de manera individual, lo perdieron en el consorcio. Algo similar puede observarse en el estudio de De Vrieze *et al.* (2018), donde la cepa de *Pseudomonas* sp. S49, que mostró tener un efecto protector significativo contra *Phytophthora* sp. al ser pareada con la cepa *Pseudomonas* sp. R47 perdió la capacidad de controlar al fitopatógeno.

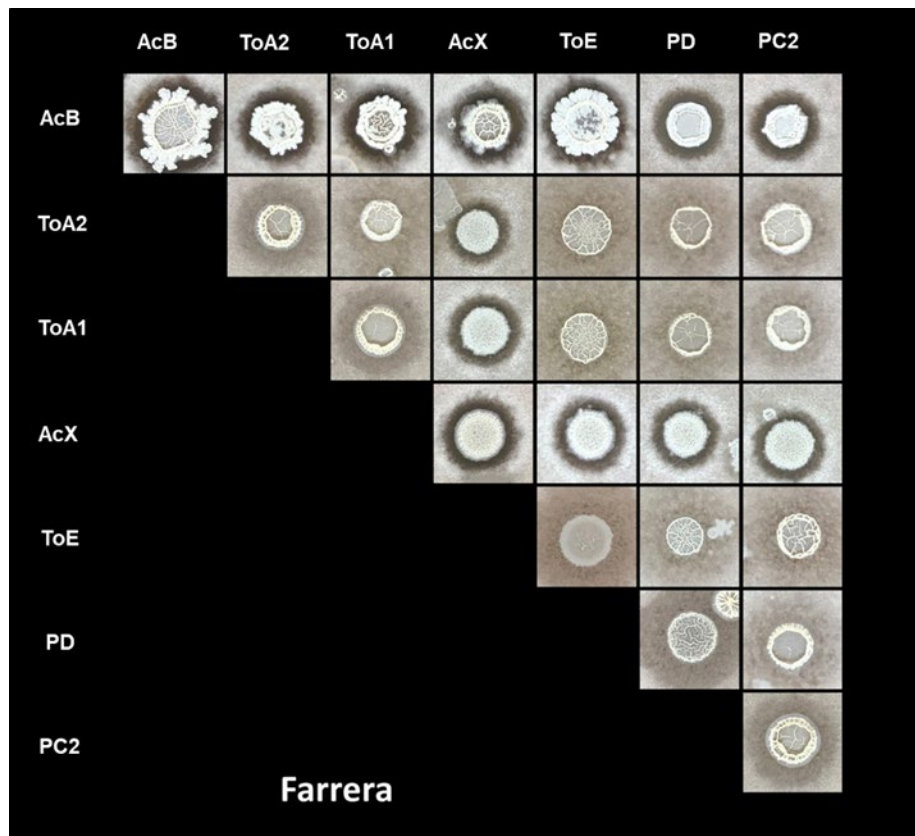


Figura 8. Combinaciones dobles de las cepas de *Bacillus* spp. en medio Farrera. Las combinaciones donde se encuentran presentes las cepas AcX y AcB conservan el halo de inhibición transparente.

Es importante destacar que en el presente estudio sólo se analizó la capacidad para controlar a *F. oxysporum*. Es posible que alguna de las cepas ya sea en solitario o en conjunto, puedan ejercer un control sobre otras especie fitopatógenas o que puedan promover el crecimiento vegetal, al producir

en el consorcio fitohormonas (Bilal *et al.* 2018), fijar nitrógeno (Minamisawa *et al.* 2004) o facilitar la solubilización de fosfatos (Emami *et al.* 2020; Nandimath *et al.* 2017).

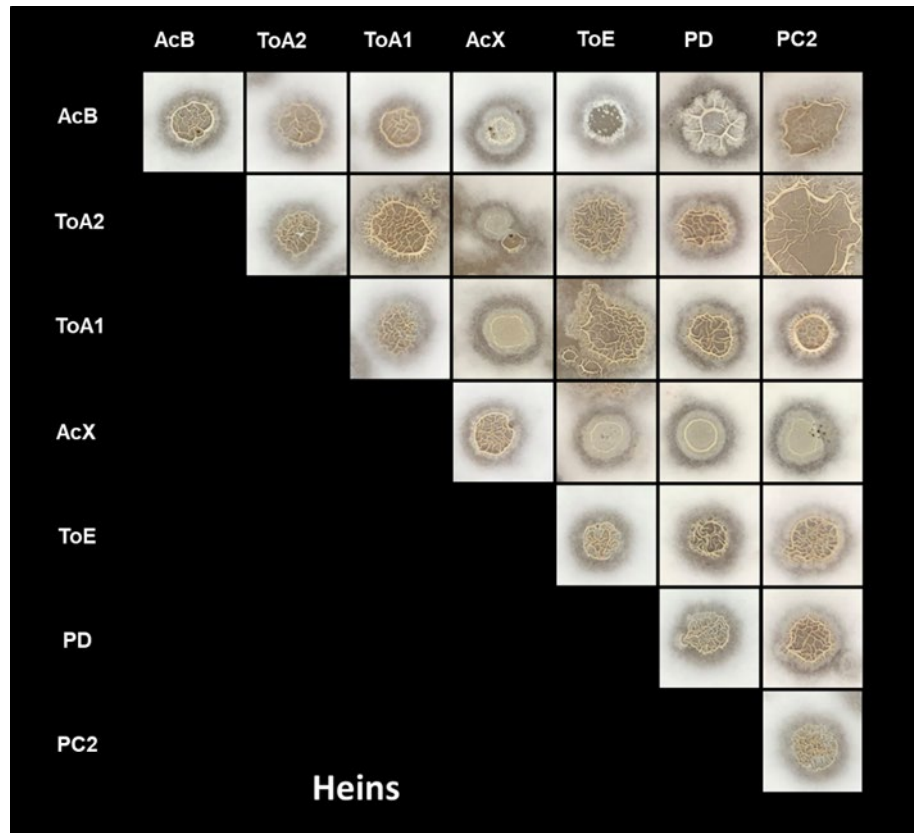


Figura 9. Combinaciones dobles de las cepas de *Bacillus* spp. en medio Heins. Se observaron halos de inhibición transparentes en todas las combinaciones de las cepas AcX y AcB, excepto en la combinación AcB-PC2.

6.1.2. Segundo Cribado

Habiendo observado en las pruebas cualitativas que las cepas AcB y AcX inhibieron el crecimiento del *F. oxysporum* en los tres medios de cultivo y que no hay un efecto sinérgico en las distintas combinaciones de las siete cepas, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se procedió a la cuantificación del efecto antifúngico de las AcB y AcX en forma individual en los tres medios de

cultivo de producción (Fig. 10). Esto con el propósito de seleccionar la mejor combinación de cepa y medio de cultivo para la producción del biofungicida. En el Cuadro 5 se observa que no hubo diferencias significativas entre la cepa AcB cultivada en los medios Heins o Farrera y la cepa AcX cultivada en el medio Farrera, aunque la cepa AcX muestra la media más alta del índice inhibición frente a *F. oxysporum* (Cuadro 5).



Figura 10. Pruebas cualitativas para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas AxX y AcB en tres medios de producción.

En virtud de que el comportamiento de las cepas AcX y AcB fue muy similar en las pruebas *in vitro* para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*, se realizó un ensayo *in vivo* con semillas de garbanzo para seleccionar sólo una de las dos cepas. El ensayo tenía la finalidad de evaluar si alguna de las dos cepas presentaba un efecto positivo sobre el crecimiento de garbanzo, para seleccionar la cepa que además de tener un efecto de control biológico *in vitro*, tuviera un efecto positivo o el mayor efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas de garbanzo.

Cuadro 5. Índice de inhibición de *F. oxysporum* por *Bacillus* spp.

Tratamiento	N	Media del índice de inhibición	Agrupación
AcX Farrera	18	0.393773	a
AcB Farrera	11	0.336076	a b
AcB Heins	12	0.25055	a b
AcB KSHA	18	0.260301	b c
AcX KSHA	15	0.222329	b c
AcX Heins	17	0.162306	c

Comparación de medias del índice de inhibición de *F. oxysporum* por *Bacillus* spp. Mediante la prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Literales diferentes indican diferencias significativas.

6.1.3. Efecto Promotor de Crecimiento de las Cepas AcX y AcB en *Cicer arietinum*

Se realizó el ensayo de germinación en garbanzo durante 15 días, cuatro de las semillas testigo y dos de las semillas tratadas con la cepa AcX germinaron a los 4 días de la siembra (Fig. 11B), al día 5 se observaron germinados en todos los tratamientos, encabezados por los tratamientos AcX y AcB en medio FarreraB con seis germinados. Al finalizar el experimento se observó una germinación de al menos el 90% de las semillas en todos los tratamientos (Fig. 11A). La germinación de las semillas depende de la viabilidad del embrión y de la disrupción de la dormancia de la semilla, que es generada por factores ambientales. Los agentes que promueven la germinación pueden influir en la disrupción de la dormancia reduciendo los niveles de acetileno debido a la actividad de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Kandel et al. 2017), a la producción de giberelinas (Taiz et al. 2014) y/o a la producción de ácido indol acético, que estimula la división celular promoviendo el desarrollo del embrión (Cabra Cendales et al. 2017). Se desconoce la antigüedad de las semillas de garbanzo utilizadas en el ensayo de germinación, sin embargo, los resultados obtenidos indican que el embrión no presentó problemas de viabilidad, pero debido a la alta tasa de germinación no se pudo determinar si las cepas AcX o AcB tienen un efecto sobre la promoción de la germinación.

Una vez terminado el ensayo de germinación, las plántulas de garbanzo se trasplantaron de semillero a macetas, se re-inocularon con los tratamientos correspondientes y se monitoreó el

crecimiento durante 30 días. Como puede observarse en la Figura 11 no todas las plántulas sobrevivieron al trasplante y los tratamientos: AcX ni AcB + AcX no tuvieron un efecto protector, ya que no sobrevivieron tantas plántulas como en los demás. En un estudio realizado por Danielsson *et al.* (2007) se analizó la tasa de supervivencia de semillas de *Brassica napus* tratadas con cinco cepas de *B. amyloliquefaciens* y se encontró que cuatro cepas tuvieron un efecto positivo en la supervivencia de las plántulas después del trasplante y una no.

En cuanto a las mediciones de las propiedades biométricas de las plántulas (Fig. 12 y Fig. 13), solo hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto a la longitud de la raíz entre el tratamiento AcX y el testigo (Fig. 13D), por lo que parece que esta cepa promueve el desarrollo radicular. Las principales funciones de la raíz en la planta son el anclaje, la absorción de agua y minerales (Taiz *et al.* 2014). En experimentos donde se han aplicado bacterias promotoras del desarrollo radicular, se han encontrado mayores cantidades de minerales como Ca, K, Mg, P, Fe y Zn en la raíz (Antoun y Kloepper 2001).

Los resultados obtenidos en todos los experimentos muestran que el desempeño de las cepas AcX (propagada en FarreraB) y AcB (propagada en FarreraB y HeinsB) fueron muy similares y que ambas cepas presentaron un índice de inhibición alto del crecimiento de *F. oxysporum* en los ensayos *in vitro*. Puesto que en los ensayos *in vivo* AcX tuvo un efecto positivo en la longitud del sistema radicular se seleccionó esta cepa y el medio de cultivo de FarreraB. Los consorcios se descartaron porque no hubo un sinergismo.

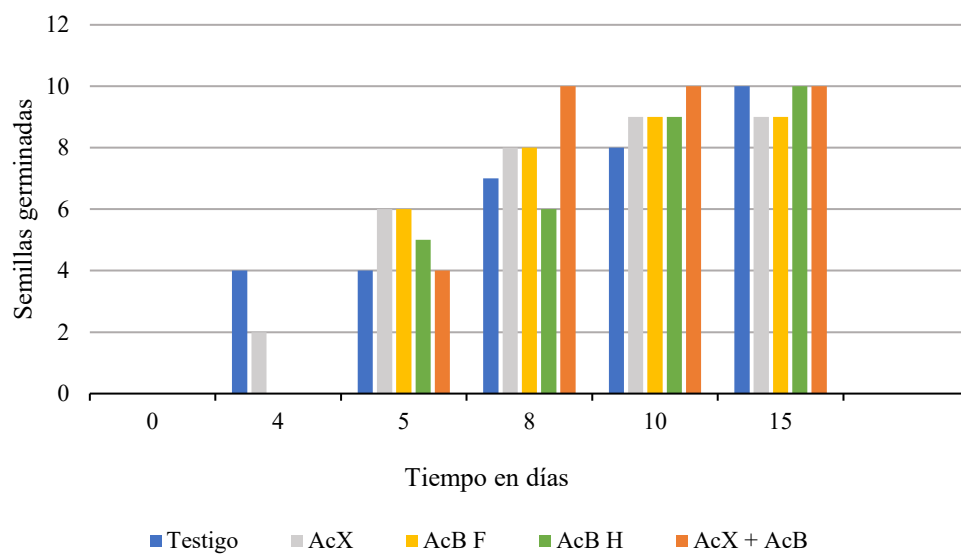
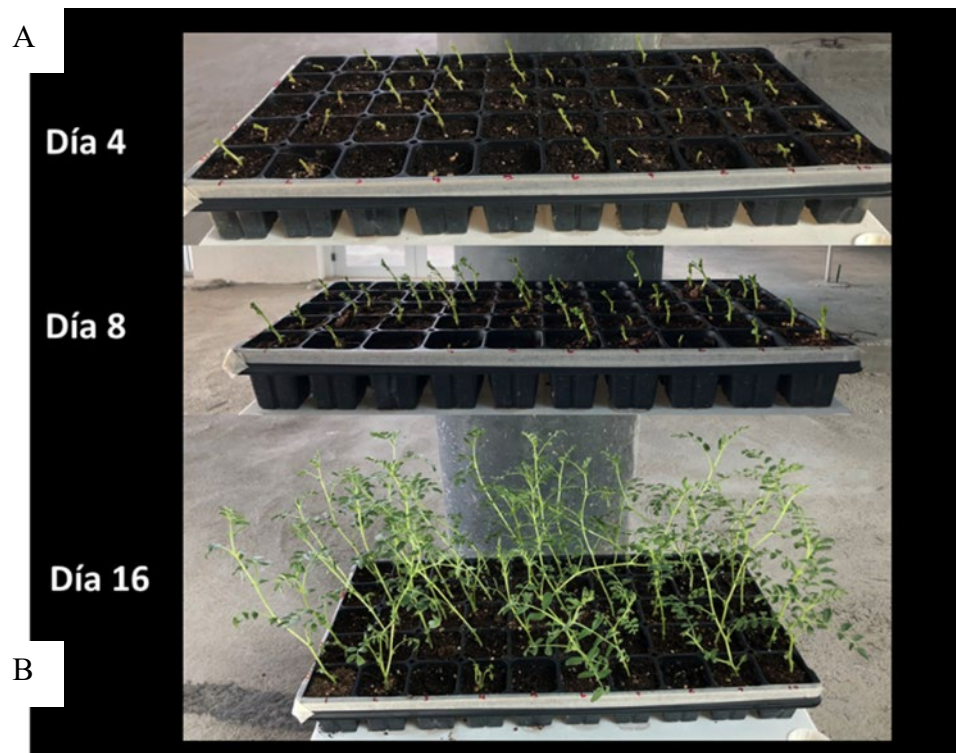


Figura 11. E Evolución de la germinación y el desarrollo de las plántulas de *Cicer arietinum*. Como se muestra en el gráfico de barras, todos los tratamientos mostraron una eficiencia de germinación mayor al 90%, ya que se utilizaron 10 semillas por tratamiento.



Figura 12. Evolución de la germinación y el desarrollo de las plántulas de *Cicer arietinum*. Como se muestra en el gráfico de barras, todos los tratamientos mostraron una eficiencia de germinación mayor al 90%, ya que se utilizaron 10 semillas por tratamiento.

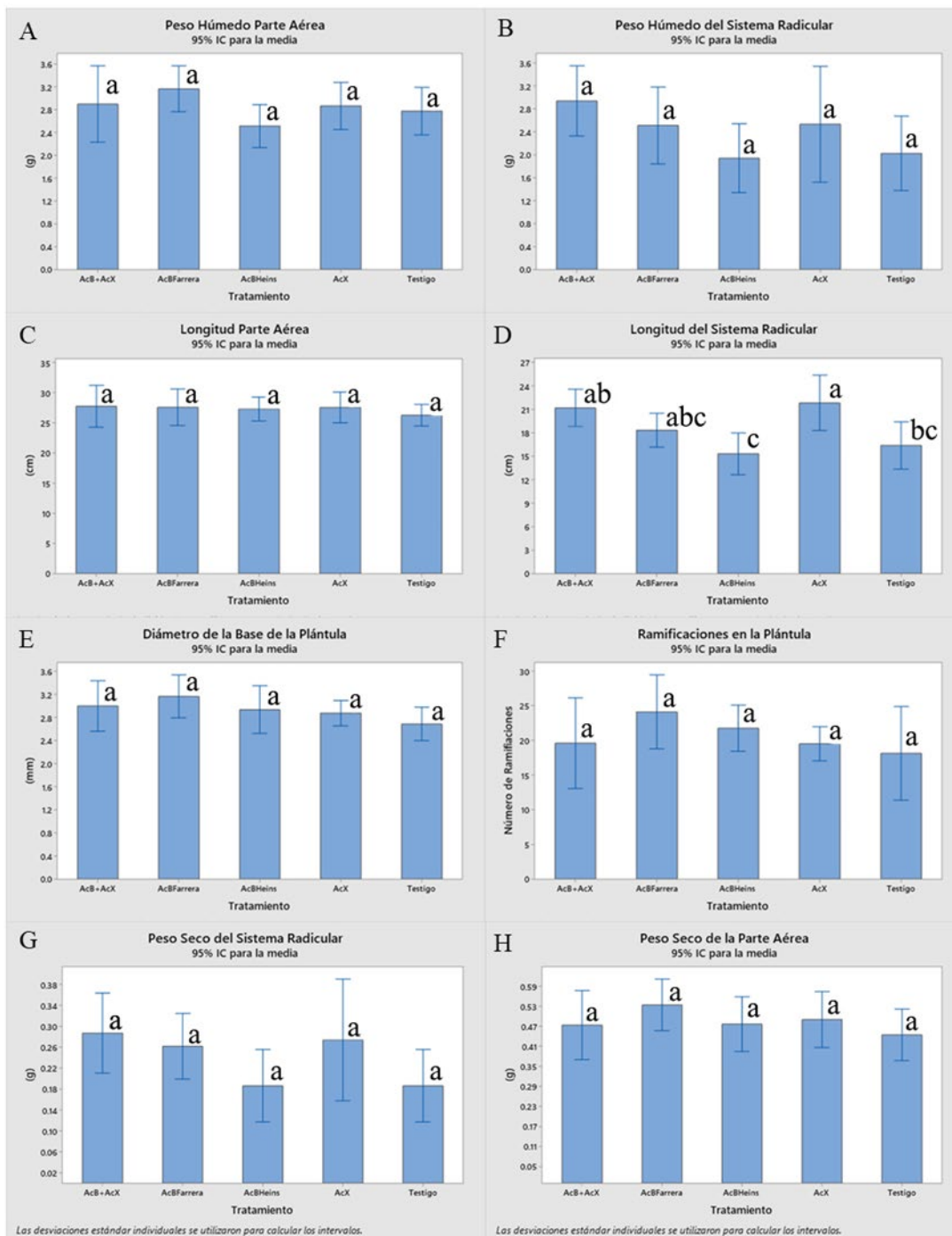


Figura 13. Comparación de medias de las propiedades biométricas medidas en las plantas de garbanzo. Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Cada gráfico es una comparación de medias independiente y las literales diferentes indican diferencias significativas.

6.2. Etapa de Fermentación del Proceso.

6.2.1. Localización de la Actividad Inhibitoria del Crecimiento de *F. oxysporum*

Para diseñar el proceso es importante determinar si el producto principal será biomasa (en forma de esporas o células vegetativas), metabolitos extracelulares o ambos. Por ello, se buscó establecer si la actividad biológica se debía a metabolitos excretados al medio de cultivo. Por lo que se realizó un experimento para determinar el efecto antifúngico del: sobrenadante libre de células, células lavadas y medio gastado, provenientes de un cultivo líquido de la cepa AcX en el medio FarreraB. El sobrenadante libre de células no inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*, mientras que las células y el medio gastado mostraron el efecto antifúngico que se había encontrado anteriormente (Fig. 14).

Cuando algunas bacterias están en contacto con un hongo se incrementa la producción de metabolitos antifúngicos, por ejemplo en el caso del cocultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* S499 con *Rhizomucor variabilis*, la producción de fengicina aumentó en un 350% con respecto al cultivo puro de la bacteria (Kulimushi *et al.* 2017). Por lo que se investigó si el sobrenadante libre de células de un co-cultivo de la cepa AcX y *F. oxysporum* tenía un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Después de 24 horas de co-cultivo, se obtuvo el sobrenadante libre de células y se repitió el ensayo. Sin embargo, tampoco hubo efecto (Fig. 15).



Figura 14. El efecto antifúngico de las cepas AcX sólo estar presente cuando las células bacterianas están en contacto con el fitopatógeno.

Se ha demostrado que el perfil de metabolitos secundarios de una cepa bacteriana puede cambiar cuando se utilizan cultivo sumergido o cultivo sólido. En un estudio publicado por Torres *et al.* (2016) se analizó el perfil de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* sbsp. *subtilis* y *B. amyloliquefaciens* en placas de agar y en cultivo sumergido. Cuando se utilizó el sobrenadante libre de células del cultivo sumergido de estas cepas, ambos sobrenadantes inhibieron el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en casi 37%, pero la inhibición fue mayor cuando las bacterias se co-cultivaron con el fitopatógeno en agar. *B. amyloliquefaciens* en cultivo líquido produjo 6 surfactinas y 3 iturinas distintas, pero cuando la misma cepa fue co-cultivada con *Macrophomina phaseolina* en agar, produjo 7 surfactinas, 4 iturinas y 6 fengicinas distintas. Además, la cepa también compite con el patógeno por nutrientes.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos en cuanto a la actividad antifúngica del sobrenadante no son concluyentes. Sin embargo, es claro que la bacteria en medio sólido y en presencia del hongo, inhibe el crecimiento del patógeno. Esto podría deberse a que, en medio sólido, la bacteria produce metabolitos inhibitorios, a que el hongo induce la producción de metabolitos en la bacteria, a la competencia por nutrientes, o a una combinación de todos los fenómenos.

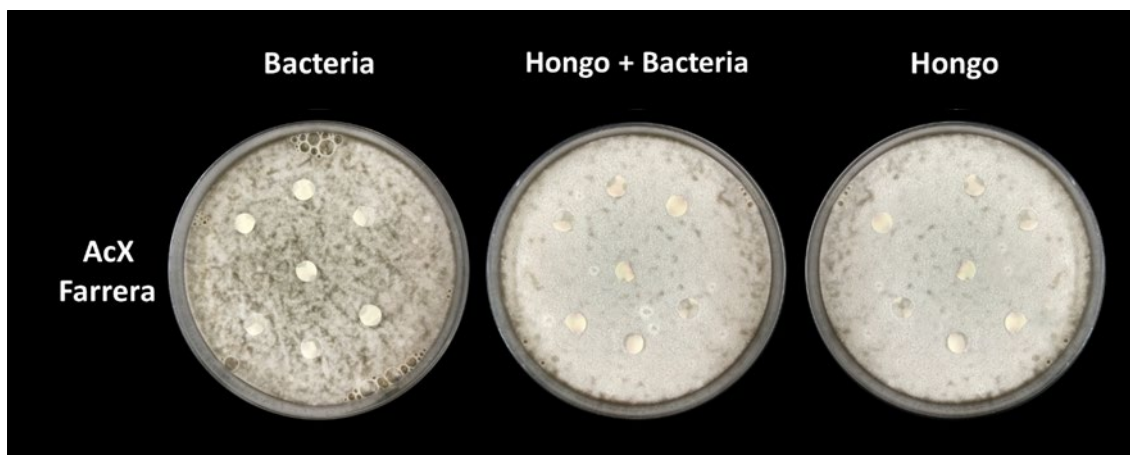


Figura 15. Efecto de los sobrenadantes de los cultivos de AcX, *F. oxysporum* y el co-cultivo Bacteria + Hongo sobre el crecimiento de *F. oxysporum*.

6.3. Efecto de la Adición de Elementos Traza al Medio Farrera Sobre la Esporulación de *Bacillus* sp.

Para determinar la necesidad de añadir sales minerales al medio de cultivo se realizó un experimento en dónde se cultivó a la cepa AcX en medio FarreraB y en medio FarreraSM (medio FarreraB sin sales minerales añadidas). Los resultados indican que la adición de los minerales no tuvo efecto sobre la eficiencia de esporulación. Como se observa en el Cuadro 6, en ambos experimentos las concentraciones de células totales y de esporas fueron similares ($p>0.05$). Las eficiencias de esporulación fueron 71% y 72% en el medio con minerales y en el medio sin minerales, respectivamente.

Cuadro 5. Influencia de la adición de minerales en el crecimiento y la esporulación de la cepa AcX

Medio de cultivo	Concentración celular total (UFC·mL ⁻¹)	Concentración de esporas (UFC·mL ⁻¹)
FarreraB	3.28×10 ⁸ ^a	2.32×10 ⁸ ^b
FarreraSM	2.98×10 ⁸ ^a	2.14×10 ⁸ ^b

Comparación de medias de la cuenta total y la cuenta de esporas de la cepa AcX cultivada en los medios FarreraB y FarreraSM (medias). No se observaron diferencias significativas (p>0.05).

Los minerales Ca, Mg, Mn, Fe y Zn son esenciales para la esporulación debido a que forman parte de las esporas o están involucrados en el proceso de diferenciación celular (Hageman *et al.* 1984; Posada-Uribe *et al.* 2015). Por sí mismas, la harina de soya, el agua de cocimiento de maíz y el extracto de levadura contienen minerales. En el Cuadro 7 se muestra en mg la cantidad de Ca, Mg, Mn, Fe y Zn que proporciona la formulación del medio FarreraB (Grant y Pramer 1962; Liggett y Koffler 1948; Uwem *et al.* 2017), como se puede apreciar, con excepción del Mn, la cantidad de minerales presentes en las materias primas de manera natural es superior a la que sería añadida como parte de la formulación del medio. Lo anterior explica los resultados que indican que no hay necesidad de añadir las sales minerales al medio de cultivo, lo que se traduce en un ahorro en costos de materia prima.

Cuadro 6. Aporte de minerales al medio FarreraB

Minerales	Materias primas (mg)	Sales minerales (mg)
Ca	31.67	-
Fe	388.94	0.5
Mg	3310.95	40.38
Mn	6.12	14.54
Zn	191.88	2.35

Cantidad en mg de distintos minerales aportados por las materias primas orgánicas presentes en la formulación del medio Farrera y la cantidad correspondiente añadida en forma de sales al medio Farrera.

6.3.1. Cinéticas de Crecimiento de la Cepa AcX en Matraz.

En la Figura 16 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa AcX en el medio FarreraSM. La fase exponencial comenzó a la cuarta hora de cultivo, seguida por la fase estacionaria a partir de la hora 18. Durante la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.440 h^{-1} ($R^2 = 0.9784$, de 4 a 18 h). La concentración celular máxima fue de $6.27 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ a la hora 22. Se detectaron células termorresistentes desde la muestra de las 32 h, el máximo alcanzado fue $5 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ lo que equivale a una eficiencia de esporulación del 19%.

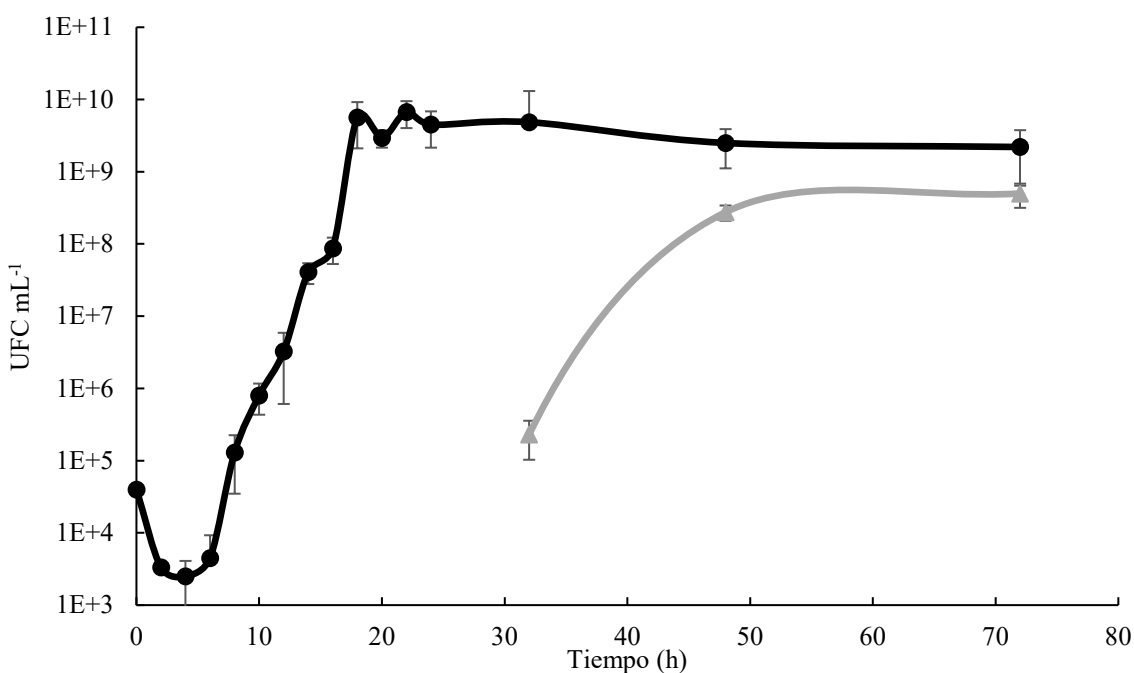


Figura 16. Cinética de crecimiento en matraz de la cepa AcX en medio FarreraB. Cuenta total (●); esporas (▲). Las barras de error representan intervalos de confianza, $\alpha = 0.05$.

La baja tasa de esporulación pudiera explicarse por la deficiente transferencia de oxígeno en el sistema de cultivo en matraz (Henzler y Schedel 1991). La concentración de oxígeno disuelto es importante para la esporulación de las bacterias del género *Bacillus*. Experimentos realizados por Abbas *et al.* (2014) mostraron una disminución en la esporulación de 18 cepas de *B. cereus* de entre 4 y 7 órdenes de magnitud, cuando se compara la concentración esporas en presencia y en ausencia

de O₂. Boniolo *et al.* (2012) contrastaron la concentración de esporas en *B. thuringiensis* en cultivos diferentes niveles de oxígeno disuelto (5%, 20% y 50% de la concentración de saturación) y encontraron la mínima concentración de esporas a 5% de oxígeno disuelto. Ésta incrementó en 10 y 22.5% al incrementar los niveles de O₂ disuelto a 20% y 50% respectivamente. La transferencia de oxígeno también es importante para la esporulación en *Bacillus subtilis*. Ha *et al.* (2018) encontraron que cuando se tenía una agitación de entre 300 y 400 RPM en un reactor de tanque agitado no se observaba esporulación, pero al aumentar la velocidad de agitación a 500 RPM observaron esporas después de 24 h de cultivo, atribuyen este cambio a la tensión de oxígeno disuelto que aumentó con la velocidad de agitación. Monteiro *et al.* (2005) reportaron un ligero aumento en la eficiencia de esporulación, de 45.2% a 53.2 %, al aumentar los niveles de oxígeno disuelto de 10 al 40%.

6.3.2. Cinéticas de Crecimiento en Biorreactor

Conociendo el comportamiento cinético de la cepa AcX en matraz, se seleccionó como inóculo un cultivo de 8 h (fase exponencial temprana) para el biorreactor en todas las cinéticas. El inóculo tuvo una densidad celular de 4.22×10^4 UFC·mL⁻¹. En la Fig. 17 se muestra la cinética de crecimiento en el medio de FarreraSM a una concentración de STI de 35 g·L⁻¹. Se observa que con el inóculo en fase exponencial se eliminó la fase Lag, se observan dos fases exponenciales, de la hora 1 a la hora 5 ($\mu = 0.831$ h⁻¹; $R^2 = 0.9918$) y la segunda de la hora 6 a la hora 10 de cultivo ($\mu = 0.2059$ h⁻¹; $R^2 = 0.9521$). Esta segunda fase de crecimiento fue seguida por un período de disminución en las UFC (11 a 20 h) y a continuación un aparente incremento en la cuenta celular coincidente con la aparición de esporas. Este comportamiento es atípico y habría que hacer más fermentaciones para verificar si es el comportamiento típico de la cepa. La velocidad específica de crecimiento incrementó casi en un 50% comparada con la obtenida en matraz, esto puede deberse a que agitación en un biorreactor es mucho más efectiva que la que se puede lograr en un matraz en agitador orbital. Una mejor agitación conlleva una mayor disponibilidad de nutrientes y una mejor transferencia de O₂.

El pH se mantuvo cercano a la neutralidad durante la fermentación. Inició en 7.4, disminuyó a 6.8 a las 22 h de cultivo y después de las 24 h empezó a aumentar acercándose a la neutralidad. Este fenómeno puede ser explicado por la liberación de las endosporas al medio de cultivo, lo que a su vez libera iones NH_4^+ , este fenómeno también se puede observar en las cinéticas de crecimiento de *B. thuringiensis* (Hassan *et al.* 2015) y *B. subtilis* (Monteiro *et al.* 2014) en donde en ambos casos al inicio de la esporulación el pH se alcaliniza durante el resto del tiempo de la fermentación. La baja fluctuación en el pH durante la fermentación es una señal de que el control de pH, posiblemente es una variable que no requiera ser controlada para la producción de esporas de la cepa AcX, lo que a nivel de proceso se traducirá a un ahorro en costos de operación del biorreactor y en la inversión en equipo.

La eficiencia de esporulación en promedio fue del 91 % después de las 30 h de cultivo. Este rendimiento es bastante aceptable, considerando que Monteiro *et al.* (2014) en sus experimentos para incrementar la cuenta de esporas en *B. subtilis* alcanzaron un máximo de 31.3 % de rendimiento de esporulación. Ya que la eficiencia de esporulación es adecuada y el producto estará constituido principalmente por esporas, no se consideró necesaria una optimización adicional.

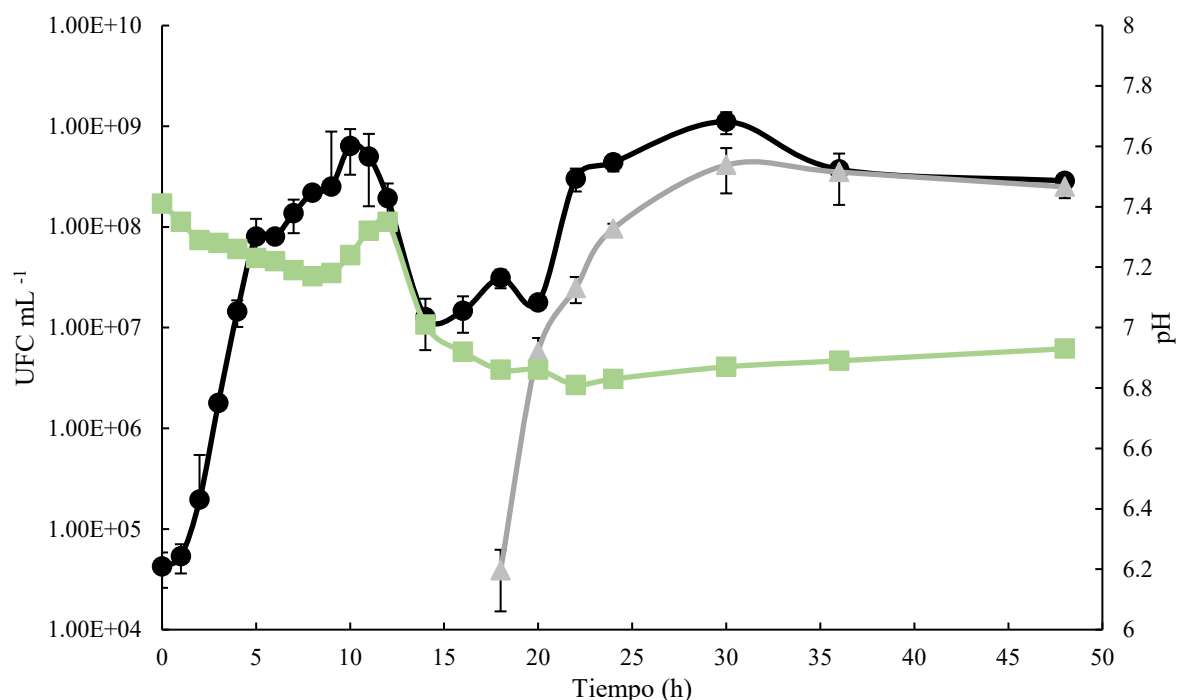


Figura 17. Cinética de la cepa AcX en medio FarreraSM en Biorreactor de 3 L. La esporulación se detectó a partir de las 18 h de cultivo. El rendimiento de esporulación llegó a su máximo a las 36 h alcanzando el 81%. Barras de error representan Intervalos de Confianza, $\alpha = 0.05$. Cuenta total (●); esporas (▲); pH (■).

Para disminuir los costos de inversión, es necesario producir el mayor número de esporas·mL⁻¹, por lo que incrementar la densidad celular en la fermentación, manteniendo la eficiencia de esporulación, es imperativo para disminuir el tamaño de los equipos de producción. Farrera *et al.* (1998) alcanzaron una alta densidad celular de *B. thuringiensis*, 1.55×10^{10} UFC·mL⁻¹, al incrementar los sólidos totales iniciales del medio a 150 g·L⁻¹. Tras realizar un ensayo en matraz, se determinó que la cepa AcX toleraba esta concentración inicial de nutrientes ya que creció y alcanzó una densidad de 5.16×10^8 UFC·mL⁻¹.

Se procedió a realizar una cinética en el medio Farrera150, la cinética de crecimiento se muestra en la Figura 18. Nuevamente se presentaron dos fases exponenciales, de la hora 1 a la hora 5 ($\mu = 0.1252$ h⁻¹; $R^2 = 0.990$) y la segunda de la hora 6 a la hora 10 de cultivo ($\mu = 0.4342$ h⁻¹; $R^2 = 0.9845$). El pH mantuvo una tendencia similar a la cinética en FarreraSM, disminuyó el pH hasta un punto mínimo (6.42 a las 24 h) y después el pH comenzó a acercarse a la neutralidad (6.99 a las 48 h). La diferencia más notoria en el comportamiento de pH es que de manera general, los valores alcanzados en la fermentación en medio Farrera150 fueron menores (6.42 - 6.8).

No se observó un incremento significativo en la densidad celular. La máxima densidad celular alcanzada en el cultivo a STI 35 g·L⁻¹ fue de 1.11×10^9 UFC·mL⁻¹ a la hora 30 y a STI 150 g·L⁻¹ se obtuvieron 1.69×10^9 UFC·mL⁻¹ a la hora 22; es decir, la concentración celular máxima fue similar en ambas STI, pero la eficiencia de esporulación disminuyó a 14.46% (a las 48 h de cultivo 1.97×10^8 esporas·mL⁻¹) al aumentar la concentración de sólidos totales iniciales. Este efecto puede ser debido a una limitación de O₂, por lo que se repitió la corrida, pero enriqueciendo el aire con oxígeno para mantener un nivel de O₂ disuelto mayor al 40%.

En la Fig. 19 se muestra la cinética de crecimiento en el medio de Farrera150 con aire enriquecido con O₂. Se observó un crecimiento exponencial desde el inicio de la fermentación hasta la hora 12

($\mu = 0.4169 \text{ h}^{-1}$; $R^2 = 0.9461$). Al igual que en las cinéticas anteriores en Biorreactor, entre las 10 y 20 horas se observó un decremento en la densidad celular, seguido de un incremento en la cuenta total, pero tanto el decremento como el incremento fueron menores que en los otros experimentos, debido se agitó cada muestra para hacer las cuentas totales y de esporas por más tiempo, ya que se había observado una aglomeración de las células y se trató de disgregar los aglomerados.

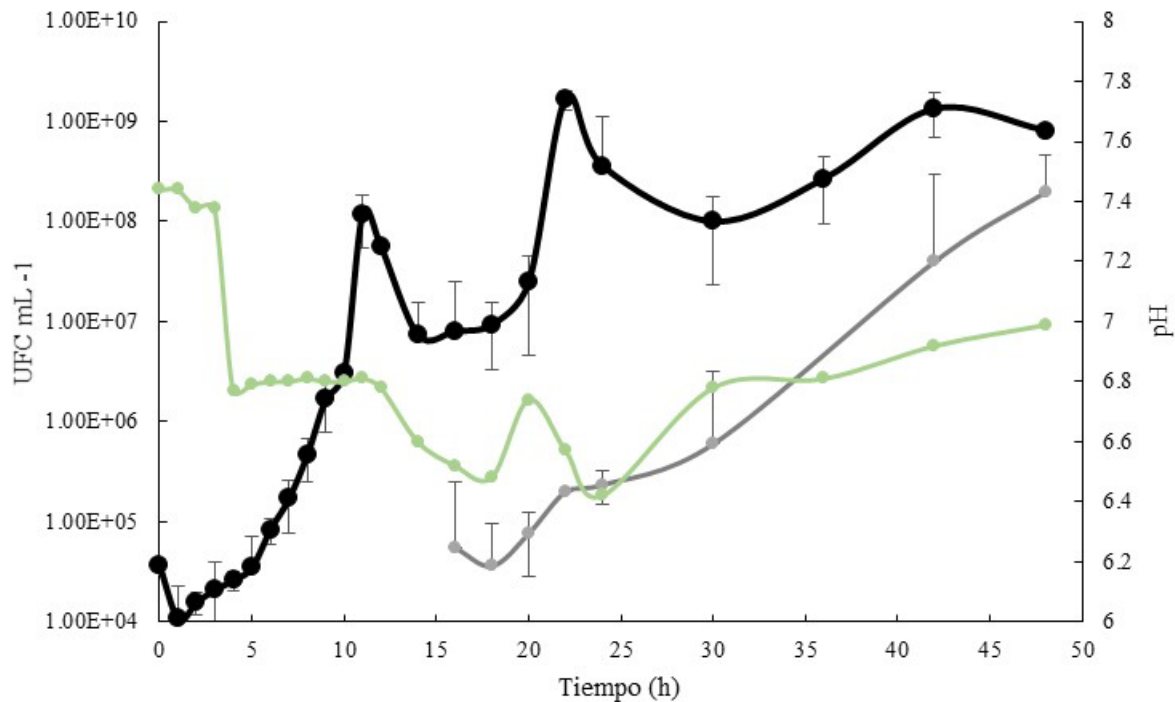


Figura 18. Cinética de la cepa AcX en medio Farrera150 en Biorreactor de 3 L. La esporulación se detectó a partir de las 16 h de cultivo. Barras de error representan Intervalos de Confianza, $\alpha = 0.05$. Cuenta total (●); esporas (▲); pH (■).

A la hora 20 se alcanzó la mayor concentración celular ($2.43 \times 10^{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), no solo en esta cinética, sino de todos los experimentos. Los cambios en la tasa de crecimiento y en el pH (6.5 a 7.4), posteriores a la fase exponencial pueden deberse a un cambio en el metabolismo (consumo de ácidos orgánicos) y sugieren que el cultivo entró a la etapa de transición. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por López-Y-López y De La Torre (2005), donde *B. thuringiensis* después de la fase exponencial, continuó su crecimiento a una menor tasa, cambió su metabolismo de consumo de glucosa a consumo de piruvato y produjo butirato y citrato.

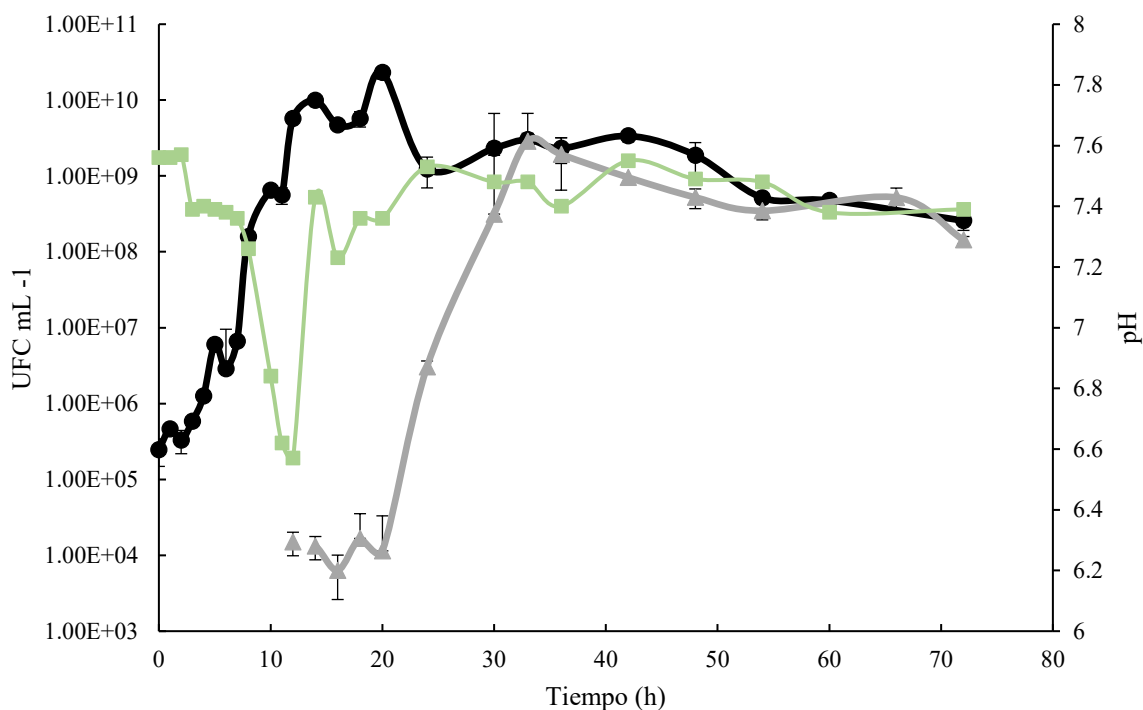


Figura 19. Cinética de la cepa AcX en medio Farrera150 con suplementación de oxígeno en Biorreactor de 3 L. Barras de error representan Intervalos de Confianza, $\alpha=0.05$. Cuenta total (●); esporas (▲); pH (■).

Después de las 6 h de cultivo la concentración de O_2 disuelto disminuyó rápidamente (Fig.20A) y el enriquecimiento con O_2 no fue suficiente para mantener el oxígeno disuelto en al menos 40% de la capacidad de saturación, por lo que se suplementó oxígeno puro y se modificó la velocidad de agitación conforme fue necesario. Entre las horas 8 y 12 se aumentó a velocidad de agitación a 1000 RPM (Fig. 20C). Después de se bajó a 650 RPM y se siguió bajando hasta 400 RPM, además se volvió a suministrar aire enriquecido con oxígeno en lugar de oxígeno puro, lo que indica que la demanda de oxígeno del cultivo disminuyó. Promediando la cuenta total y la cuenta de esporas a partir de la hora 33, se calculó una eficiencia de esporulación promedio de 62%.

Durante el lapso de mayor demanda de oxígeno (6-12 h), la temperatura se incrementó hasta llegar a 42°C cerca de la hora 9 (Fig. 20B), por lo que se procedió a enfriar el reactor para regresar a la temperatura blanco y se logró controlar la temperatura a $30\pm3^\circ\text{C}$. A partir de la hora 32 de cultivo la temperatura se mantuvo constante a 30°C. Es importante resaltar que, a pesar de que la

temperatura se mantuvo por dos horas y media sobre los 30°C, la bacteria siguió creciendo y esporuló después de un tiempo de cultivo similar al de otras fermentaciones, lo que sugiere que la cepa tolera temperaturas mayores a 30°C y que su temperatura óptima de crecimiento pudiera ser más alta.

Es importante destacar que en la cinética en matraz se obtuvo una mayor densidad celular que en las fermentaciones en biorreactor con STI de 30 g·L⁻¹ y 150 g·L⁻¹ sin la adición de oxígeno. Este resultado fue inesperado pues un biorreactor tiene un sistema de agitación y por tanto mejor disponibilidad de nutrientes y de oxígeno del que puede ser obtenido en un matraz en agitación orbital. Por lo que se requieren más experimentos para dilucidar porque la concentración celular máxima fue mayor en matraz.

Como se mencionó anteriormente, en la fermentación en medio Farrera150 manteniendo los niveles de oxígeno disuelto como mínimo al 40% de la capacidad de saturación, la concentración de células totales (2.43×10^{10} UFC·mL⁻¹) y de esporas (2.87×10^9 UFC·mL⁻¹) fueron la más altas de todos los experimentos. Sin embargo, no se alcanzó la concentración de esporas obtenida por Farrera *et al.* (1998) de 1.55×10^{10} UFC·mL⁻¹, este fenómeno pudiera deberse a una acumulación de señales contradictorias en la población bacteriana, por ejemplo unas que indican que se inicie la diferenciación celular (esporulación) y otras que indican que debe continuar la fase vegetativa (López-Y-López y De La Torre 2005).

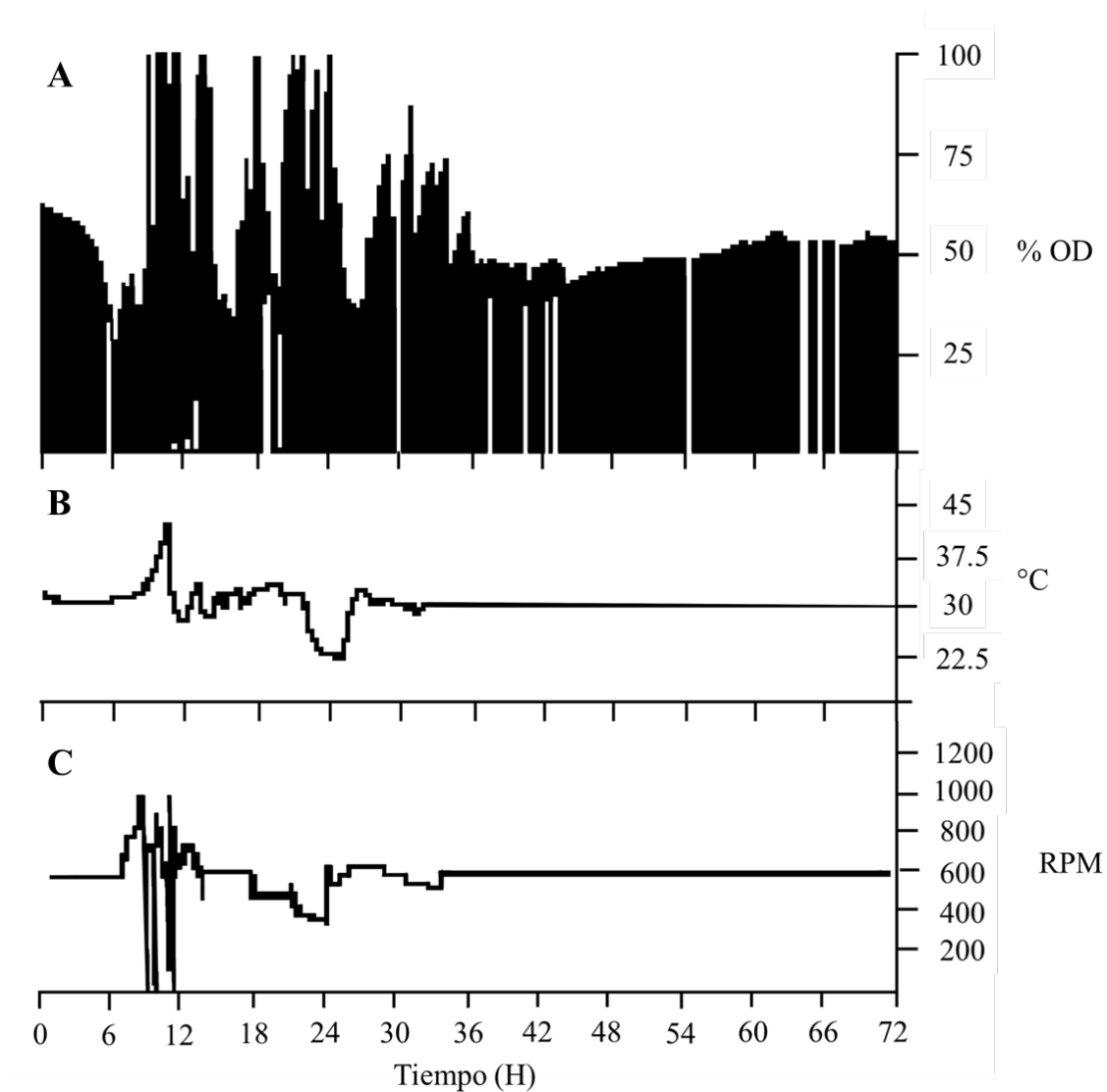


Figura 20. Evolución de diferentes parámetros medidos por el Biorreactor durante la cinética en medio Farrera 150 con suplementación de oxígeno: oxígeno disuelto (A), temperatura (B) y velocidad de agitación (C).

6.4. Vida de Anaquel del Biofungicida en Presentación Líquida

Se estudiaron los efectos de cuatro formulaciones sobre la vida de anaquel del producto formulado a partir de un cultivo en matraz de la cepa AcX cultivada en medio Farrera150 por 48h. Este cultivo tuvo una concentración de 5.88×10^8 UFC·mL⁻¹ y 3.98×10^8 esporas·mL⁻¹. Se probaron cuatro

formulaciones ajustadas a 2% de glicerol, 2% de povidona, 2% de glicerol + 2% de povidona, 2% de ácido acético y 2% de glicerol+2% de povidona + 2% de ácido acético. Las formulaciones se almacenaron a diferentes temperaturas (4, 20, 25 y 30°C) y se cuantificaron las cuentas totales de células y de esporas a los días 7, 14, 21, 28 y 40. Como se observa en la Fig. 21 en todos los casos hubo crecimiento bacteriano y después la cuenta total disminuyó, lo cual en algunos tratamientos se reflejó en un incremento en la concentración de esporas al final del ensayo de hasta 1.96 veces la cuenta inicial (Fig. 22C).

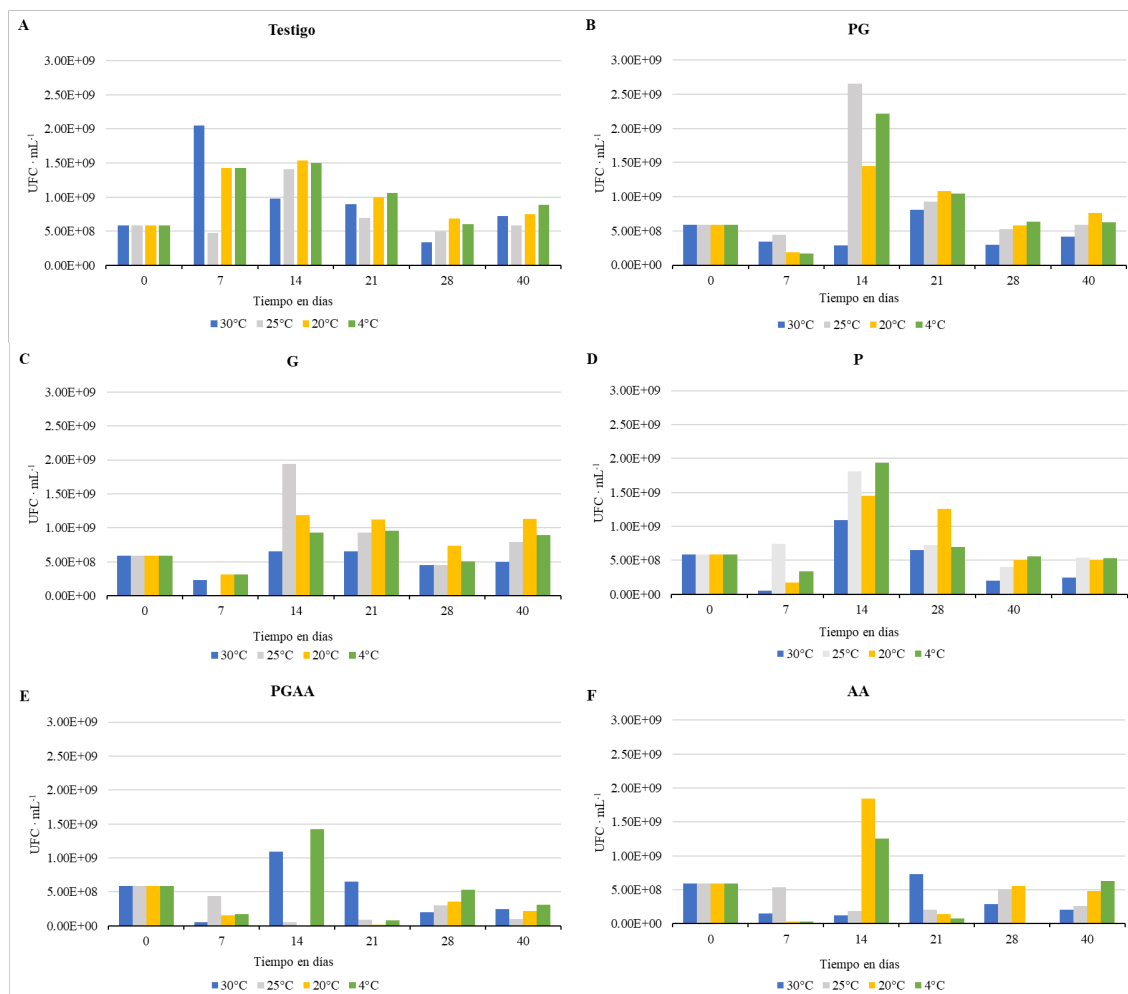


Figura 4. Gráfico con la evolución de las poblaciones totales en las diferentes formulaciones a cuatro distintas temperaturas. Testigo: Medio sin formular; PG: povidona + glicerol; G: glicerol; P: povidona; PGAA: Povidona + Glicerol + Ácido acético; AA: ácido acético. Los tratamientos por temperatura se muestran en colores: (■)30°C, (■)25°C, (■)20°C y (■)4°C.

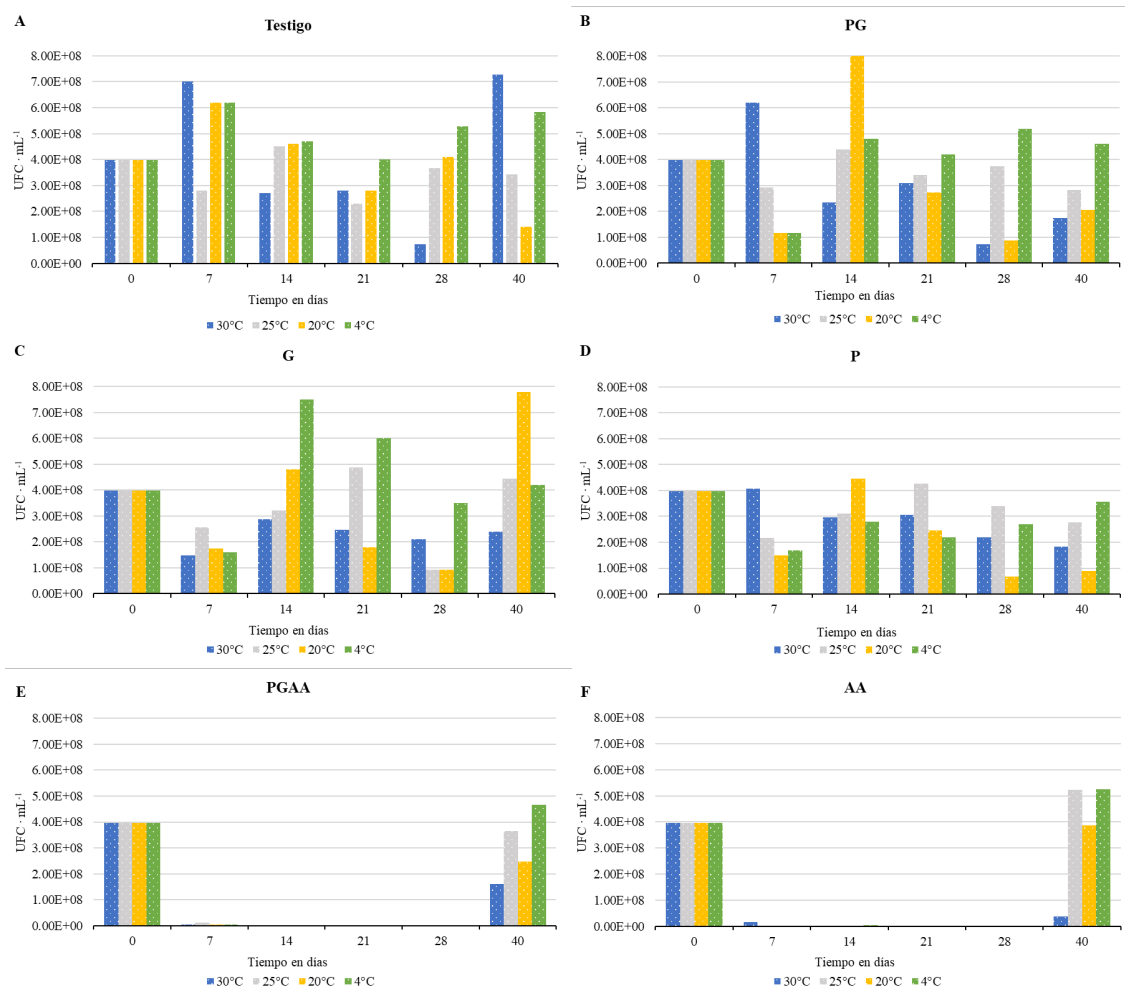


Figura 5. Gráfico con la evolución de la cuenta de esporas en los diferentes tratamientos a cuatros distintas temperaturas. Testigo: Medio sin formular; PG: povidona + glicerol; G: glicerol; P: povidona; PGAA: Povidona + Glicerol + Ácido acético; AA: ácido acético. Los tratamientos por temperatura se muestran en colores: (■)30°C, (■)25°C, (■)20°C y (■)4°C.

En el tratamiento testigo (sin ningún aditivo) al día 7 la CT aumentó 3.5 veces con respecto a la inicial a 30°C y a 20 y 4°C el aumento fue de 2.4 veces, mientras que a 25°C hubo una disminución. Sin embargo, al día 14 hubo un incremento de 2.4 veces la CT con respecto a la CT inicial a 25°C. Posteriormente, en todos los casos hubo una tendencia a la baja en la CT y fue el tratamiento a 20°C el que terminó con la mayor CT (7.50×10^8 UFC · mL⁻¹) (Figura 21 A). Cuando en la formulación se utilizaron Povidona y Glicerol (Figura 21 B) el aumento en la población se observó hasta el día 14 y los incrementos fueron de 3.7, 2.5 y 4.5 veces a las temperaturas de 4, 20 y 25°C. Después la población descendió para llegar al final a concentraciones similares a las iniciales, pero a 30°C fue menor. Meena *et al.* (2015), al igual que nosotros, encontraron que la CT de bacilos

aumentaba inicialmente y después comenzaba a disminuir en la formulación con glicerol y povidona almacenada a temperatura ambiente; si nuestras formulaciones siguen la misma tendencia, se esperaría que en las formulaciones con glicerol y povidona a 25°C disminuyera la CT por debajo de la inicial después de los 60 días. El comportamiento de la formulación con glicerol (Figura 21 C) siguió la misma tendencia, pero al final la CT fue mayor que la inicial, excepto a 30°C donde las CT inicial y final fueron similares (Fig. 22 C). En el caso de las formulaciones con P, PGAA y AA (Figuras 21 D; E y F) la población se incrementó al día 14 y luego descendió; para estas tres formulaciones a 30°C la CT final fue menor a la inicial. En la formulación con ácido acético a 25°C la CT final fue menor que la inicial, pero a 4 y 20°C fue similar. Por último, para todas las temperaturas de almacenamiento para la formulación con povidona+glicerol+ácido acético la población final fue menor que la inicial.

En el caso de las esporas, la CE en el testigo y el tratamiento con glicerol, siguieron la misma tendencia que la CT, pero la cuenta al final fue mucho mayor 30 y 4°C en el testigo (Fig. 22 A) y a 25°C en la formulación con glicerol (Fig. 22 C). La tendencia de la CE en las demás formulaciones fue diferente a la de la CT y no se observa un patrón (Fig. 21 y 22). En las formulaciones en las que se incluyó ácido acético (pH 2.6) la CE estuvo en el rango de 10^3 a 10^4 esporas·mL⁻¹, porque el tratamiento térmico afectó la viabilidad, por lo que al tiempo final se subió el pH a 7 antes este tratamiento (Figura 22 E y F). Se observa que a 30°C la CE final disminuye en las formulaciones PG, P, PGAA y AA mientras que en el testigo aumenta y con Glicerol se mantiene igual que la inicial, lo que sugiere que la Povidona y el ácido acético tienen un efecto negativo.

Finalmente, el almacenamiento a 4°C es adecuado para todas las formulaciones, ya que se mantuvo la CE después de 40 días de almacenamiento. Sin embargo, el poder almacenar un producto con microorganismos vivos en formulaciones líquidas a temperatura ambiente resultaría en un ahorro significativo en el almacenaje del producto, ya que no se requerirían los gastos de inversión y operación de un cuarto frío. Por esta razón la formulación seleccionada fue la que tiene una concentración final de glicerol de 2% glicerol y la temperatura de almacenamiento 25°C, porque la concentración de esporas al cabo de 40 días fue el doble de la inicial.

Durante los ensayos de vida de anaquel, se observó en los tubos de las formulaciones G, PG y T la formación de biopelículas a 25 y 30°C (Fig.23). La formación de biopelículas está ligada a la colonización de la rizosfera en muchas especies bacterianas (Bogino *et al.* 2013). Incluso se ha comprobado que la capacidad de formar biopelículas es imprescindible para que *B. velezensis* FZB42 colonice raíces de tomate (Al-Ali *et al.* 2018). La capacidad de la cepa *Bacillus* sp. AcX de formar biopelículas y además el que probablemente sea termotolerante, sería una ventaja para su uso como agente de biocontrol en los cultivos de la Costa de Hermosillo, debido a las temperaturas ambientales medias cercanas a 35°C y máximas de hasta 47°C.



Figura 23. Biopelícula formada por *Bacillus* sp. AcX durante el almacenamiento de las formulaciones líquidas con glicerol y povidona+glicerol (izquierda a derecha) a 30°C.

6.5. Ingeniería Conceptual de la Planta de Producción de un Biofungicida a base de *Bacillus* sp.

6.5.1. Base de cálculo para la capacidad de producción de la planta

- Producción anual de *Bacillus* sp. AcX como biofungicida para 2500 Ha, que representan 2% de participación en el mercado, con base a las hectáreas de mayor riesgo de que se presente el fitopatógeno *F. oxysporum* en la Costa de Hermosillo (Fierros Leyva *et al.* 2019).
- Dosis: 2 L·Ha⁻¹ a una concentración de 4×10^8 UFC·mL⁻¹, dos aplicaciones por ciclo para control de hongos fitopatógenos (Enero-Abril). Más otras dos aplicaciones por ciclo de otros productos a la misma concentración y dosis.
- Demanda anual para la Costa de Hermosillo: 2.28×10^{17} UFC·año⁻¹.
- Capacidad de la planta productora de *Bacillus* sp. AcX: 8.40×10^{15} UFC·año⁻¹.
- Factor de servicio de la planta 330 días al año. 165 días para la producción de *Bacillus* sp. y 165 días para la producción de otros productos.
- Eficiencia global del proceso para todos los productos: 95%

6.5.2. Dimensionamiento del biorreactor

Se dimensionó el biorreactor para cubrir el 2% de la demanda de anual de 2.28×10^{17} UFC·año⁻¹, que corresponde a: 8.40×10^{15} UFC·año⁻¹. Se utilizó el rendimiento obtenido en la cinética en Farrera150 con oxígeno (1.04×10^9 esporas·mL⁻¹). Se consideró una presentación de producto con 4×10^8 esporas·mL⁻¹. El volumen nominal calculado del reactor de producción fue 180 L y se redondeó a 200 L.

6.6. Síntesis del Proceso

El proceso se sintetizó con base a los resultados experimentales obtenidos en esta tesis, tanto en el

biorreactor, como en los experimentos de vida de anaquel e información de la literatura. En la Figura 24 se presentan dos diferentes configuraciones de proceso: Fig. 24A formulación líquida con 4×10^8 esporas. mL^{-1} y Fig. 24B formulación como polvo humectable con 4×10^8 esporas. g^{-1} .

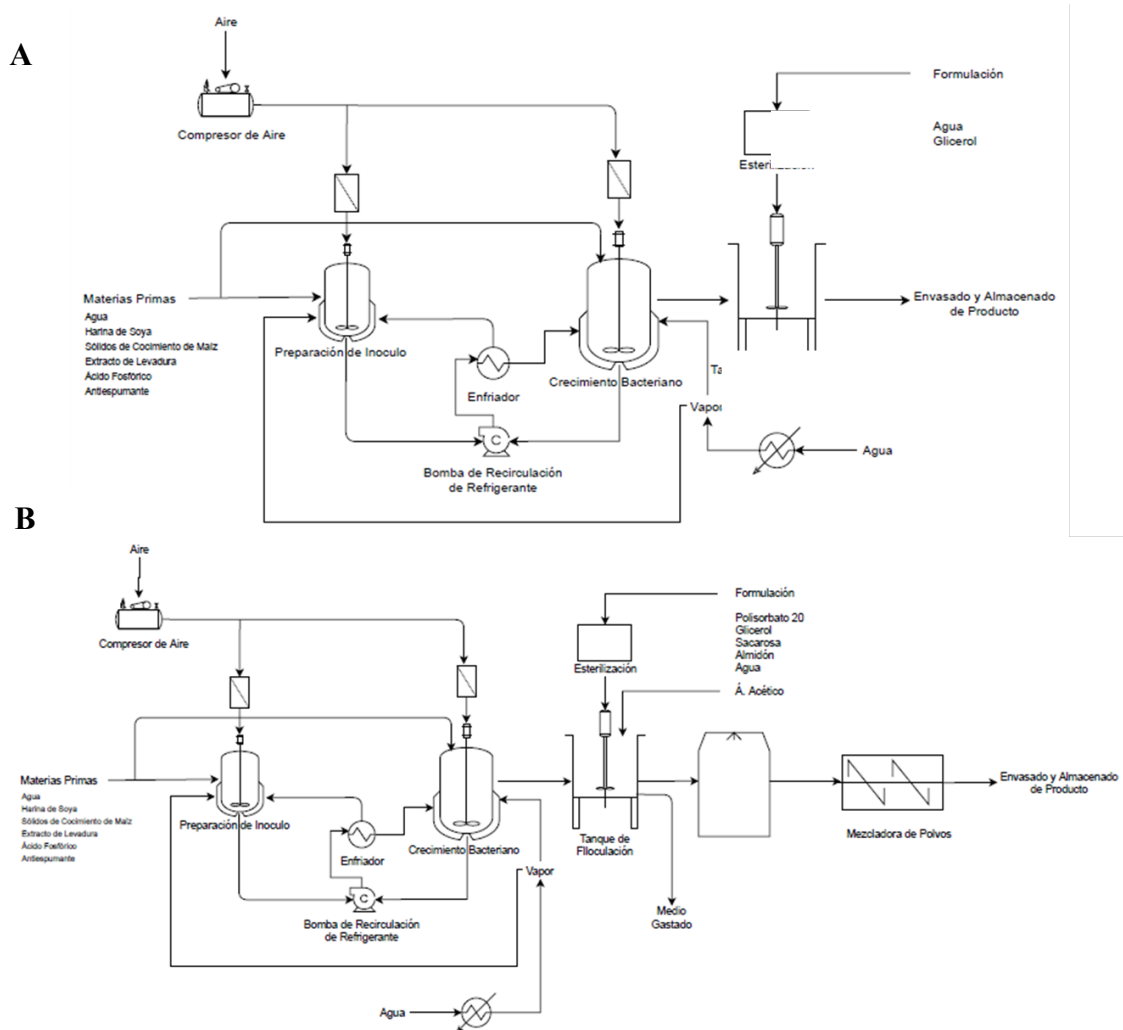


Figura 24. Diagramas para dos diferentes configuraciones de proceso. A. Proceso para producto líquido, volumen de reactor para inóculo de 20 L y 200 L para el reactor principal. B. Proceso para producto en presentación de polvo humectable.

6.6.1. Etapa Río Arriba

Comúnmente se utilizan inóculos de entre el 0.1% y el 10% del volumen del reactor de producción (Meyer *et al.* 2017), en los experimentos se utilizó un 5% del volumen del reactor como inóculo. Siguiendo ese criterio, el volumen de inóculo para el reactor sería de 10 L con aproximadamente 1×10^8 UFC.mL⁻¹ (valor alcanzado en la cinética en medio Farrera150 suplementado con oxígeno a las 8 h de cultivo), el pre-inóculo para el reactor de 10L sería de 0.5 L con 1×10^5 UFC.mL⁻¹ (valor alcanzado en cultivo en matraz después de 6 horas de cultivo). El pre-inóculo se prepara en matraces de 2L con 200 mL de medio FarreraSM, el cual se inocula con un disco con 1×10^8 esporas y se incuba a 30°C durante 6 horas. El contenido del matraz se vacía en un garrafón de vidrio de 20L con 10L de medio Farrera150, adaptado con un sistema de agitación e inyección de aire enriquecido con oxígeno. El inóculo 2 se cultiva a durante 8 horas y se bombea en su totalidad al reactor.

El régimen de esterilización comienza con el biorreactor limpio al que se añaden el agua y las materias primas. Se cierra el reactor y se inyecta vapor a la chaqueta manteniendo la válvula de escape del reactor abierta durante 10 minutos para eliminar el aire y una velocidad de agitación mínima. Pasados 10 minutos la válvula se cierra, se eleva la presión manométrica a 1 bar y se mantiene durante treinta minutos, para esterilizar el medio e hidrolizar la harina de soya. Terminada la fase de sostenimiento de la presión el reactor se enfría a través de la chaqueta y al bajar la presión se inyecta aire estéril, a través de la línea correspondiente, hasta alcanzar la temperatura de operación.

6.6.2. Etapa de Fermentación

La fermentación se lleva a cabo en un régimen por lote con el medio de Farrera (Farrera *et al.* 1998) a una concentración inicial de sólidos totales de 150 g.L⁻¹ durante 33 h. Las condiciones de operación son: temperatura constante de 30°C, 1 VVM de aire enriquecido con oxígeno y la agitación se regula según sea necesario para mantener los niveles de oxígeno disuelto al 30% del nivel de saturación, como mínimo. El pH inicial del medio es de 7.4 y cuando desciende a 7 se

controla en este valor, también el nivel de espuma se controla automáticamente mediante la adición de antiespumante.

6.6.3. Etapa Río Abajo

Se consideran dos presentaciones del producto: producto líquido y polvo humectable. Cuando el producto es líquido, el medio gastado se transfiere al tanque de mezclado dónde se formula a 2% de glicerol, debido a que en nuestros experimentos fue la formulación que mejor conservó el producto durante 40 días. Posteriormente se vierte en barriles de 50 L desinfectados y se almacena a una temperatura entre 20 y 25°C. Para su distribución se diluye a la concentración especificada de esporas en el producto y se envasa.

A diferencia el producto líquido, la formulación en polvo humectable requiere tres operaciones unitarias subsecuentes a la fermentación: floculación-sedimentación, secado y mezclado. Para la separación de sólidos se descartó el uso de centrífuga debido a los elevados costos asociados a la compra del equipo, como lo presenta Rowe y Margaritis (2005) la centrífuga de discos fue uno de los equipos que más contribuyó a la inversión de capital. Se optó por floculación para concentrar la biomasa previamente al secado, para lo cual el medio gastado se transfiere a un tanque de mezclado donde se acidifica al 2% con ácido acético. Villafaña-Rojas *et al.* (1996) recomiendan pH 4 para la sedimentación de *Bacillus thuringiensis*, pero para la cepa de *Bacillus* sp. AcX un pH 2.6 fue más efectivo.

Para calcular el tiempo de sedimentación, se tomó en cuenta la velocidad promedio de sedimentación ($3.7 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$) presentada por Lamenha Luna *et al.* (2005). En el proceso, el producto de la fermentación se deja sedimentar por 25 min, después se descarta el sobrenadante y el sedimento se ajusta a pH 7. Previo al secado, el sedimento se preformula a una concentración final de 10% de almidón gelatinizado y 10% de sacarosa (termoprotectores) y al 0.2% de polisorbato 20 (dispersante) (Teera-arunsiri *et al.* 2003). El pre-formulado se bombea al secador por aspersión, donde se seca bajo las siguientes condiciones: temperatura del aire de entrada 145°C,

temperatura de salida 70°C. El producto seco se almacena a temperatura ambiente y antes de envasarlo se formula con tierra de diatomeas para ajustar la concentración de esporas a la especificada en el producto.

6.7. Análisis Económico

6.7.1. Inversión

De acuerdo a la guía establecida por Petrides *et al.* (2015), lo primero que se debe de establecer es el costo de compra de equipo de producción (PC). En el cuadro 6 se detallan los equipos que se consideraron para calcular el PC, para las dos configuraciones de proceso seleccionadas y una producción anual 8.40×10^{15} UFC-año⁻¹. En el Cuadro 7 se muestran los equipos principales para el laboratorio de investigación y desarrollo y control calidad, así como la suma de materiales, que incluyen cristalería, consumibles y herramientas básicas para un laboratorio de microbiología.

Cuando se utilizó el tabulador sugerido por Petrides *et al.* (2015), los costos de algunas categorías eran excesivas para una planta de las dimensiones planteadas, aun utilizando el multiplicador mínimo, por lo que se decidió modificar los multiplicadores de algunas categorías para adecuarlos. También se observó que algunas categorías no aplicaban, por lo que se procedió a eliminarlas del tabulador. El costo de instalación toma en cuenta el transporte del equipo, tuberías, válvulas, soporte estructural y mano de obra para la instalación, además de gastos indirectos, contingencia y capital para instalaciones secundarias (vapor, gases, etc.) (Ulrich 1984).

Los capitales fijos calculados con el nuevo tabulador fueron de: \$ 2,713,669.23 y \$ 4,200,859.23 (pesos mexicanos) para las plantas de producción para el producto líquido y el polvo humectable, respectivamente (Cuadro 8). La diferencia de casi un millón y medio de pesos es debida principalmente al costo del secador por aspersión, que se cotizó a \$1,155,347.88 como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 7. Estimación de capital fijo de la planta de producción

Estimación de Costos de Capital Fijo Planta			Formulación	
Tipo de Gasto	Multiplicador Promedio		Líquida	Polvo Humectable
Total de Costos Directos de Planta (TPDC)				
Costo de Compra de Equipo (PC)			\$ 1,988,347.73	\$ 3,209,252.56
Instalación	0.1	x PC	\$ 187,214.87	\$ 302,749.66
Edificio			\$ 253,291.07	\$ 253,291.07
Permisos de Construcción			\$ 17,305.22	\$ 17,305.22
Albañilería			\$ 106,121.60	\$ 106,121.60
Instalación Eléctrica			\$ 81,796.44	\$ 81,796.44
Instalación Hidrosanitaria			\$ 48,067.81	\$ 48,067.81
Total de Costos Indirectos de Planta (TPIC)				
Ingeniería	0.01	x TPDC	\$ 26,821.45	\$ 40,185.84
Mantenimiento y Reparaciones	0.03	x TPDC	\$ 80,464.34	\$ 120,557.53
Total de Costo de Planta (TPC)	TPDC + TPIC		\$ 2,536,139.46	\$ 3,926,036.67
Contingencia (CA)	0.07	x TPC	\$ 177,529.76	\$ 274,822.57
Capital Fijo Directo (DFC)	TPC + HC + CA		\$ 2,713,669.23	\$ 4,200,859.23

Estimación de capital fijo para las dos configuraciones de proceso: planta para la producción de un biofungicida en presentaciones líquida o polvo humectable. Capacidad de producción: 16.8×10^{15} UFC-año⁻¹ (8.40×10^{15} UFC-año⁻¹ del biofungicida y 8.40×10^{15} UFC-año⁻¹ de otro producto a base de microorganismos).

Cuadro 8. Equipos principales de producción

Equipo	Marca	Modelo	Costo Unitario
Garrafón Adaptado			\$ 100,000.00
Generador de Vapor	Vapor Rey	VR16TT	\$ 9,900.00
Reactor 200 L	Applikon	11039543B	\$ 1,829,205.76
Báscula	Torrey	L-PCR	\$ 2,250.00
Tanque de Retención	INOXIMEXICO	200	\$ 11,215.00
Enfriador	SS Brewtech	1/3 HP	\$ 21,827.97
Tanque de Oxígeno	Oxipus	M122	\$ 12,999.00
Compresor de Aire	Hoteche	HPCAAC14	\$ 950.00
Secador	GEA	NIRO A/S	\$ 1,155,347.88
Mezclador de Polvos	iPharmachine	CH-20	\$ 65,556.95

Desglose de los equipos principales para las plantas de producción en presentaciones líquida y polvo humectable. El secador por aspersión es exclusivo para la planta de producción en presentación de polvo humectable.

6.7.2. Costos de Operación

Los costos de operación se muestran en el Cuadro 11, todos los datos fueron calculados en pesos mexicanos, tomando en cuenta que la planta produce productos todo el año. La sección de mantenimiento se calculó con el multiplicador de Petrides *et al.* (2015) correspondiente. Los demás apartados del cuadro se calcularon mediante cotizaciones o consultando la información oficial de tarifas actuales (agosto 2020) para industria en Hermosillo, Sonora.

Habiendo cotizado con múltiples proveedores los precios de las materias primas y estableciendo la capacidad de la planta, se calculó un costo anual de materias primas de \$88,703.60 para la fabricación del producto en presentación líquida y \$90,983.38 para el polvo humectable. A diferencia del proceso descrito por Rowe y Margaritis (2004) las materias primas no son el costo más importante en el rubro de gastos de operación, en los procesos diseñados en esta tesis representan sólo cerca del 6%, mientras que en el proceso de Rowe y Margaritis ascienden al 17.3% del total de los costos operacionales. Los costos de formulación para el producto de Rowe y Margaritis equivalen al 52% de los costos de materias primas y los insumos para la fermentación representan el 48%; mientras que en nuestro proceso el 97% de los costos corresponden a los insumos para la fermentación.

Los servicios se calcularon con las tarifas al mes de Agosto de 2020 dadas por la CFE y Agua de Hermosillo para industria. Se calculó la demanda eléctrica de los equipos por hora de uso al año, además de cuatro aires acondicionados y la luminaria ($3865.71 \text{ kW}\cdot\text{h}^{-1}$) resultando en \$62,609.31 para el producto líquido y \$47,767.05 ($2425.51 \text{ kW}\cdot\text{h}^{-1}$) para el polvo humectable. La diferencia se debe principalmente a que, en el caso del producto en polvo, no es necesaria una bodega con aire acondicionado para mantener la temperatura a 25°C requerida para conservar el producto líquido. El consumo de agua se calculó a partir de la estimación del uso de agua de proceso, servicios sanitarios y para la esterilización del reactor, fue de 360 m^3 de agua anuales resultando en \$11,458.80 para ambos procesos.

Cuadro 10. Costos de operación en pesos mexicanos.

	Formulación	
	Líquida	Polvo Humectable
Materias primas y Suministros	\$ 188,121.02	\$ 251,446.01
Materias primas	\$ 88,703.64	\$ 90,983.38
Mantenimiento	\$ 99,417.39	\$ 160,462.63
Mano de obra y supervisión	\$ 736,083.33	\$ 736,083.33
Servicios	\$ 74,068.11	\$ 59,225.85
Electricidad	\$ 62,609.31	\$ 47,767.05
Agua	\$ 11,458.80	\$ 11,458.80
Depreciación	\$ 144,559.95	\$ 223,784.09
Total	\$ 1,405,021.54	\$ 1,581,211.14

Comparativo de los costos operacionales del proceso de producción para un producto en presentación líquida y en polvo humectable para una capacidad de producción: 16.8×10^{15} UFC.año⁻¹ (8.40×10^{15} UFC.año⁻¹ del biofungicida y 8.40×10^{15} UFC.año⁻¹ de otro producto a base de microorganismos).

Se investigaron los rangos de sueldos en bolsas de trabajo en internet para operadores de maquiladoras y trabajadores de planta, supervisión y gerencia. Estos fueron en pesos mexicanos: a) Operador de \$6,500 a \$10,000), b) Supervisor de \$7,500 a \$25, 000, c) Gerencia de 12,000 a 45,000. Se tomaron en cuenta tres turnos para operadores, dos para supervisión y uno para gerencia, resultando en \$736,083.33 de mano de obra y supervisión, siendo este el rubro con más peso sobre los costos de operación.

6.7.3. Retorno de la Inversión

Se espera que una planta para la producción de productos biológicos para el campo produzca todo tipo de formulaciones para satisfacer las distintas necesidades del mercado a los volúmenes que este requiere. Para los cálculos de retorno de inversión se decidió que la base de cálculo para los costos anuales y para la expansión de la planta fueran los costos de producción del biofungicida a base de *Bacillus* sp. cepa AcX considerando la producción durante 330 días al año, ya que se estima que estos costos serán muy similares para la producción de otros agentes de biocontrol de origen microbiano.

El costo de manufactura es uno de los factores más importantes a considerar para fijar el precio de venta del producto, e incluye: materias primas, servicios y otros gastos indirectos. Entonces, el costo de manufactura por litro producto fue de \$211.28 y de \$244.83 por Kg de producto para el polvo humectable (pesos mexicanos). Los precios de productos similares en el mercado oscilan entre los \$100 y los \$800 por litro de producto en formulación líquida y entre \$250 a \$1350 por Kg de producto formulado como polvo humectable. Se realizó una comparación de dos proyecciones a 15 años con dos distintos precios de venta, \$400 y \$500 por unidad de venta de producto (L o Kg según la presentación), en cada proyección se consideró el mismo precio de venta para el producto formulado en líquido y para el polvo humectable. En ambas proyecciones se planteó reinvertir (\$1,500,000.00) en tres distintos años para aumentar la producción y para la diversificación de productos; así como reinvertir en la planta el 10% de las utilidades después de la última reinversión.

En el estudio de Rowe y Margaritis (2004), cuando se producen 1×10^7 BIU·Año⁻¹ el costo por BIU es de 0.9 dólares canadienses y el costo por BIU se reduce a 0.35 dólares cuando se incrementa la producción a 6×10^7 BIU·Año⁻¹. Tomando estos valores como referencia y asumiendo la misma reducción de costos al incrementar la producción seis veces, con cada reinversión se calculó por medio de interpolación lineal el costo operacional cuando se incrementa la producción 2, 3 y 4 veces.

En la Fig. 25 se presenta la evolución de la utilidad anual para la planta de producción, comparando las formulaciones líquidas y en polvo humectable a los dos precios de venta (\$400 y \$500 por unidad de venta de producto). Se consideraron cuando fue posible tres reinversiones de \$ 1,500,000, la primera al año siguiente del punto de equilibrio y las siguientes cada dos años en dos ocasiones. El punto de equilibrio es de 3 y 5 años para los productos líquido y en polvo humectable respectivamente, cuando el precio de venta es de \$500 por unidad de venta (Fig. 25A). Puede observarse un retraso importante en el punto de equilibrio del producto formulado como polvo humectable con respecto al producto en presentación líquida. Cuando el precio de venta es de \$400 por unidad, el punto de equilibrio es a los 10 años para el polvo humectable, lo que sólo permite dos reinversiones a los 12 y 14 años después de iniciar labores en la planta, para incrementar la producción (Fig.25B). En el caso del producto líquido con un precio de venta de \$400 por unidad de venta, el punto de equilibrio se alcanza al quinto año y se tiene una utilidad negativa después de

la primera reinversión al año 6, pero después de ésta el crecimiento de las utilidades es progresivo.

Después del año seis a un precio de venta de \$500, anualmente se tiene de utilidad más del 100% de la inversión inicial en el caso del producto líquido y después del año 10 para el producto sólido (Figura 25A). Si bien es cierto que los productos en polvo tienen ventaja sobre los productos líquidos en cuanto a la vida de anaquel (Gotor-Vila *et al.* 2017), las formulaciones líquidas tienen ventajas en campo (Mahanty *et al.* 2016; Ramyabharthi *et al.* 2016) y además según nuestro estudio, el punto de equilibrio se alcanza antes debido a que los gastos operacionales son menores.

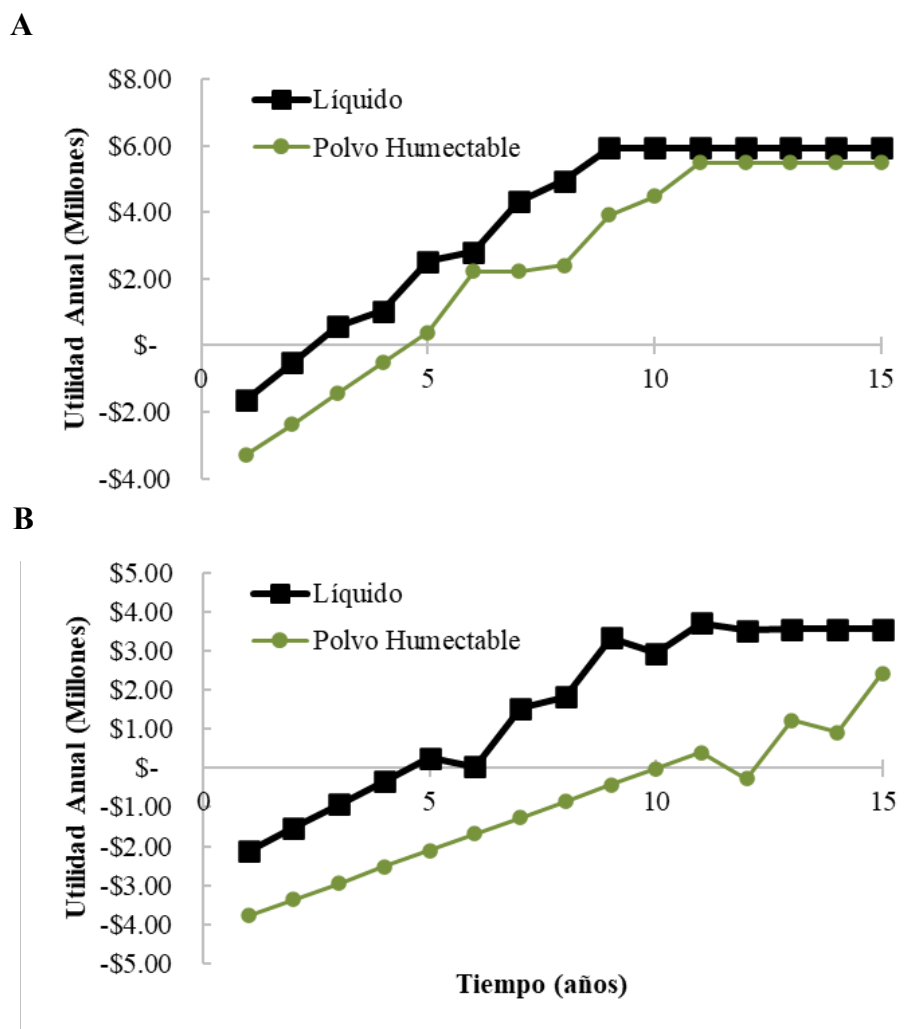


Figura 25. Comparativo de proyección de utilidades a 15 años para las plantas de producción para los productos en presentación líquida o como polvo humectable y dos precios de venta. A) \$500 por Litro o Kg de producto B) 400 por Litro o Kg de producto.

7. CONCLUSIONES

La cepa de *Bacillus* sp. AcX es eficaz para el control de *F. oxysporum in vitro*, lo que la convierte en un buen candidato para producir un agente para el control biológico de hongos fitopatógenos.

La eficiencia de esporulación de la cepa AcX es superior al 60% tanto en el medio FarreraSM como en el Farrera150, cuando no hay limitación por oxígeno durante la fermentación. Debido al incremento en la demanda de oxígeno después de las 33 horas de proceso en el medio Farrera150, es indispensable suministrar oxígeno para satisfacer esta demanda.

La inversión inicial para una planta para producir el biofungicida como polvo humectable es casi el doble que la requerida para una planta para producirlo en formulación líquida. El punto de equilibrio para la planta para la producción de la formulación líquida es de sólo tres años cuando el precio de venta es de \$500 pesos y de 5 años cuando es de \$400, lo que da un margen para modificar el precio de venta entre estos precios dependiendo del mercado.

8. RECOMENDACIONES

1. La supervivencia y el crecimiento de la cepa AcX a temperaturas de 42°C sugiere que su temperatura óptima de crecimiento es superior a 30°C, por lo que sería apropiado investigar cuál es la temperatura óptima de la cepa.
2. Los resultados *in vitro* indican que la cepa AcX tiene potencial como biofungicida, pero es necesario realizar pruebas en campo para determinar su efecto bajo condiciones reales. Así como determinar en campo la efectividad del medio gastado comparada con la de las esporas.
3. Se recomienda investigar si la cepa produce metabolitos para el control de hongos fitopatógenos, en su caso investigar el perfil de estos metabolitos.
4. Los factores utilizados en la guía para la estimación de costos de capital fijo no son ideales para una planta de las dimensiones y características de la planta propuesta en este estudio, por lo que será necesaria la reconsideración y adecuación de los factores para un análisis económico más acercado a la realidad.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Plachon S., Jobin M. y Schmitt P. 2014. Absence of Oxygen Affects the Capacity to Sporulate and the Spore Properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*. 42: 122-31.
- Aguilar-Barragan A., García-Torres A., Odriozola-Casas O., Macedo-Raygoza G., Ogura T., Manzo-Sánchez G., James A. C., Islas-Flores I., Beltrán-García M. J. 2014. Chemical Management in Fungicide Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* Collected from Banana Fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(1): 359-64.
- Al-Ali A., Deravel J., Krier F., Béchet M., Ongena M. y Jacques P. 2018. Biofilm Formation Is Determinant in Tomato Rhizosphere Colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(30): 29910-20.
- Alajlani M., Shiekh A., Hasnain S. y Brantner A. 2016. Purification of Bioactive Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strain BIA. *Chromatographia* 79(21-22): 1527-32.
- Ali S., Hameed S., Imran A., Iqbal M. y Lazarovits G. 2014. Genetic, Physiological and Biochemical Characterization of *Bacillus* sp. Strain RMB7 Exhibiting Plant Growth Promoting and Broad Spectrum Antifungal Activities. *Microbial Cell Factories*. 13(1): 144-52.
- Almeida F., Rodrigues M. L y Coelho A. 2019. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Frontiers in Microbiology* 10: 1-5.
- Alonso S. 2018. Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures. En Tiwari, B. Novel Food Fermentation Technologies. Ed. 1. Springer International Publishing Switzerland, 6-34.
- Antoun H. y Kloepper J. 2001. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). En Brenner S. y Miller J. Encyclopedia of Genetics Ed.1, AC\$EMIC PRESS, INC. California, 1477-80.
- Asaff-Torres A. y De La Torre M. 2003. Bioprocess Design. En Gutiérrez-López, G. y Barbosa-Cánovas G. *Food Science and Food Biotechnology*. CRC PRESS, Estados Unidos. 81-104.
- Awla H. K., Rashid T. S., Hamid S., Wong M. 2017. Plant Growth-Promoting Abilities and Biocontrol Efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae*. *Biological Control* 112: 55-63.
- Bale J. S., van Lenteren J. C. y Bigler F. 2008. Biological Control and Sustainable Food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1492): 761-76.
- Beltran-Garcia E. Macedo-Raygoza G., Villafaña-Rojas J., Martinez-Rodriguez A., Chavez-Castrillon Y. Y., Espinosa-Escalante F. M. Di Mascio P., Ogura T. y Beltran-Garcia M. J. 2017. Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection. En Jozala A. *Fermentation Processes*. IntechOpen, Estados Unidos 199-222
- Benheim, D., Rochfort S., Robertson E., Potter I. D. y Powell K. S. 2012. Grape Phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) - A Review of Potential Detection and Alternative Management Options. *Annals of Applied Biology* 161(2): 91-115.
- Bilal S. Shahzad R., Khan A. L., Kang S. Imran Q. M, Al-Harrasi A., Yun B. Lee I. 2018.

- Endophytic Microbial Consortia of Phytohormones-Producing Fungus *Paecilomyces formosus* Lh110 and Bacteria *Sphingomonas* sp. Lk11 to *Glycine max* L. Regulates Physio-Hormonal Changes to Attenuate Aluminum and Zinc Stresses. *Frontiers in Plant Science* 9(September): 1–18.
- Praveen-Biradar B. J. y Santhosh G.P. 2018. Cell Protectants, Adjuvants, Surfactant and Preservative and Their Role in Increasing the Shelf Life of Liquid Inoculant Formulations of *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 6(4): 116–22.
- Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G. y Giordano W. 2013. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *International Journal of Molecular Sciences* 14(8): 15838–59.
- Boniolo F. S., Rodrigues R. C., Ramalho-Prata A. M., Lopez M. L., Jacinto T., Moura-da-Silveira M. y Berbert-Molina M. A. 2012. Oxygen Supply in *Bacillus thuringiensis* Fermentations: Bringing New Insights on Their Impact on sporulation and δ -Endotoxin Production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94(3): 625–36.
- Cabanas C.G., Legarda G. Ruano-Rosa D., Pizarro-Tobias P., Valverde-Corredor G. Niqui J. L., Triviño J, C., Roca A. y Mercado-Blanco J. 2018. Indigenous *Pseudomonas* spp. Strains from the Olive (*Olea europaea* L.) Rhizosphere as Effective Biocontrol Agents against *Verticillium dahliae*: From the Host Roots to the Bacterial Genomes. *Frontiers in Microbiology* 9(FEB).
- Cabra-Cendales T., Rodriguez-Gonzales C. A., Villota-Cuasquer C. P., Tapasco-Azates O. A. y Hernandez-Rodriguez A. 2017. *Bacillus* Effect on the Germination and Growth of Tomato Seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Biológica Colombiana* 22(1): 37.
- Cao P., Liu C., Sun P., Fu X., Wang S., Wu F. y Wang X. 2016. An Endophytic *Streptomyces* sp. Strain DHV3-2 from Diseased Root as a Potential Biocontrol Agent against *Verticillium dahliae* and Growth Elicitor in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 109(12): 1573–82.
- Cawoy H., Debois D., Franzil L., De-Pauw E., Thonart P y Ongena M. 2015. Lipopeptides as Main Ingredients for Inhibition of Fungal Phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology* 8(2): 281–95.
- Chen C., Nace G. W. e Irwin P. L. 2003. A 6x6 Drop Plate Method for Simultaneous Colony Counting and MPN Enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 55(2): 475–79.
- Chun C., Feidan G., Sudan Y., tingna X., Shutao Z., Huajun H. y Zhengliang W. 2015. A Novel Photoshop-Based Digital Imaging Method for Measuring Colony Extension of Biocontrol Fungi. *Open Automation and Control Systems Journal* 7(1): 2102–6.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C y Barka E. A. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 4951–59.
- Danielsson J., Reva O y Meijer J. 2007. Protection of Oilseed Rape (*Brassica napus*) toward Fungal Pathogens by Strains of Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Ecology* 54(1): 134–40.

- Dayamani, K. J. 2010. *Formulation and Determination of Effectiveness of Liquid Inoculants of Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. Doctorado. University of Agricultural Sciences.
- Denner W. y Gillanders T. 1996. The Legislative Aspects of the Use of Industrial Enzymes in the Manufacture of Food and Food Ingredients. En Godfrey T. y Reichelt J. *Industrial Enzymology*. New York: Stockton Press, Estados Unidos 397–412.
- Emami S., Alikhani H. A., Pourbabae A. A., Etesami H., Motasharezadeh B. y Sarmadian F. 2020. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorus use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*. 14: 100–31
- Faheem M., Raza W., Zhong W., Nan Z., Shen Q. y Xu Y. 2015. Evaluation of the Biocontrol Potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. Niveum. *Biological Control* 81: 101–10.
- Farrera R. R., Pérez-Guevara F. y De La Torre M. 1998. Carbon:Nitrogen Ratio Interacts with Initial Concentration of Total Solids on Insecticidal Crystal Protein and spore Production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49(6): 758–65.
- Fierros-Leyva G. A., Acosta-Gallegos J. A., Ortega-Murrieta P. F., Padilla-Valenzuela I., Alvarez-Bravo A., Ramirez-Soto M. y Velarde-Felix S. 2019. Distribución de Hongos Asociados a Pudriciones de Raíz Del Garbanzo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(1): 131–42.
- Fira D., Dimkic I., Beric T., Lozo J. y Stankovic Slavisa. Biological Control of Plant Pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285: 44–55.
- Gauvry E., Mathot A., Couvert O., Leguerine I., Jules M. y Coroller L. 2019. Differentiation of Vegetative Cells into spores: A Kinetic Model Applied to *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 85(10):322–19.
- Godfray H. C. J., Mason-D'Croz D. y Robinson S. 2016. Food System Consequences of a Fungal Disease Epidemic in a Major Crop. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150467.
- Gotor-Vila A., Usali J., Torres R., Abadias M. y Trexido N. 2017. Formulation of the Biocontrol Agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 Using Different Approaches: Liquid, Freeze-Drying and Fluid-Bed spray-Drying. *BioControl* 62(4): 545–55.
- Grant, C. L. y Pramer D. 1962. Minor Element Composition of Yeast Extract. *Journal of bacteriology* 84: 869–70.
- Ha S., Kim H. M., Chun H. H., Hwang I. M., Lee J., Kim J. C., Kim I. S. y Park H. W. 2018. Effect of Oxygen Supply on Surfactin Production and Sporulation in Submerged Culture of *Bacillus subtilis* Y9. *Applied Sciences*. 8(1660).
- Hageman J. H., Shankweiler G. W., Wall P. R., Franich K., McCowan G. C., Cauble S. M. Grajeda J. Quinones C. 1984. Single, Chemically Defined Sporulation Medium for *Bacillus subtilis*: Growth, Sporulation, and Extracellular Protease Production. *Journal of Bacteriology* 160(1): 438–41.
- Hamley, I. W. 2015. Lipopeptides: From Self-Assembly to Bioactivity. *Chemical Communications* 51(41): 8574–83.
- Hassan M. A., Malek R. A., Othman N. Z., Elmarzugi N., Leng O. M., Ramli S., Azis R. y El-Enshasy A. 2015. Bioprocess Development for Enhanced spore Production in Shake Flask

- and Pilot Scale Bioreactors of *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* in Submerged Culture. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 10(1): 103–8.
- Henzler H. J. y Schedel M. 1991. Suitability of the Shaking Flask for Oxygen Supply to Microbiological Cultures. *Bioprocess Engineering* 7(3): 123–31.
- Heydary A. y Mohammad P. 2010. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273–90.
- Hinarejos E., Castellano M., Rodrigo I., Bellés J. M., Conejero V., Lopez-Gresa M. P. y Lison P. 2016. *Bacillus subtilis* IAB/BS03 as a Potential Biological Control Agent. *European Journal of Plant Pathology* 146(3): 597–608.
- Hunter-Cervera, J. C. y Belt A. 1996. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. San Diego: AC\$EMIC PRESS, INC. 21-30
- INIFAP. 2017. Agenda Técnica Agrícola de Sonora: 1-302.
- Jabs, T. Seevers K. y Reinot. 2014. *Synergistic Compositions Comprising a Bacillus subtilis Strain and a Pesticide*. AU2014233858C1.
- Jeep B., Ikekrapach I., Schneider C., Karl-Heinrich S., Kersten P., Tinesse M., Birgit A., Eckhart-San D. y Pergaux L. 2015. *Antibacterial Paenibacillus Strain, Fusaricidin Type Compound and Use Thereof*. CH20156621803.
- Kandel S. L., Firrincieli A., Joubert P. M., Okubara P. A., Leston N. D., McGeorge K. M., Mugnozsa G. S., Harfouche A., Kim S. y Doty S. L. 2017. An in Vitro Study of Bio-Control and Plant Growth Promotion Potential of *Salicaceae* Endophytes. *Frontiers in Microbiology* 8(386).
- Kulimushi P. Z., Arias A. A., Franzil L., Steels S. y Ongena M. 2017. Stimulation of Fengycin-Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in Microbiology* 8(850): 1–12.
- Laloo R., Maharajh D., Gorgens J. y Gardiner N. 2010. A Downstream Process for Production of a Viable and Stable *Bacillus cereus* Aquaculture Biological Agent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(2): 499–508.
- Law J. W., Ser H., Khan T. M., Chuah L., Pusparajah P., Chan K., Goh B. y Lee L. 2017. The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in Microbiology* 8:3.
- Leelasuphakul W., Sivanunsakul P. y Phongpaichit S. 2006. Purification, Characterization and Synergistic Activity of β -1,3-Glucanase and Antibiotic Extract from an Antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against Rice Blast and Sheath Blight. *Enzyme and Microbial Technology* 38(7): 990–97.
- Liggett, R. W. y Koffler H. 1948. Corn Steep Liquor in Microbiology. *Bacteriological reviews* 12(4): 297–311.
- Liu W. M. M., Bajpai R. y Bihari V. 1994. High-Density Cultivation of sporeformers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 721(1): 310–25.
- López-Y-López, V. E. y De La Torre M. 2005. Redirection of Metabolism during Nutrient Feeding in Fed-Batch Cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*

67(2): 254–60.

- Luna, C. L., Mariano R. L.R. y Souto-Maior A. M. 2002. Production of a Biocontrol Agent for Crucifers Black Rot Disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19(2): 133–40.
- Luna C. L., Lopes C. E. y Massarani G. 2005. Recovery of *Bacillus sphaericus* spores by Flocculation/Sedimentation and Flotation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 61–70.
- Ma X., Wang X., Chen J., Nie X., Yu X., Zhao Y. y Wang W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and Its Biocontrol Efficiency against *Rhizoctonia solani* in Tomato. *Biological Control* 90: 34–41.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A. y Clark D. P. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings. 226
- Mahanty T., Bhattacharjee S., Goswami M., Bhattacharyya P., Das B., Ghosh A. y Tribedi P. 2016. Biofertilizers: A Potential Approach for Sustainable Agriculture Development. *Environmental Science and Pollution Research* 24(4): 3315–35
- Mahmood I., Imadi S. R., Shazadi K., Gul A. y Hakeem K. R. 2016. Effects of Pesticides on Environment. En *Plant, Soil and Microbes*, 253–69.
- Mareeswaran, J. y Radhakrishnan B. 2016. Shelf Life of Bacterial and Fungal Biocontrol Agents in Different Formulations. *Indian Phytopathology* 69(4): 422–23.
- Marieke B., Chetty J., Marie-Hélène R. y Aubertot J. N. 2019. Biocontrol. Diccionario de Agroecología. <https://dicoagroecologie.fr/en/encyclopedia/biocontrol/> (Accesado en Abril 17, 2020).
- Mejía-Farfán, M. L. 2008. *Evaluación Del Efecto de La Relación Carbono Nitrógeno y El Nivel de Oxígeno Disuelto Sobre La Producción de Biosurfactantes a Partir de Bacillus subtilis*. Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Meyer H. P., Minas W. y Schmidhalter D. 2017. Industrial-Scale Fermentation. En Wittman C. y Liao J. *Industrial Biotechnology: Products and Processes*. Weinham: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 3–54.
- Minamisawa K., Nishioka K., Miyaki T., Ye B., Miyamoto T., You M., Saito A., Saito M., Barraquio W. L., Teaumroong N., Sein T. y Sato Tadashi. 2004. Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia Isolated from Gramineous Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 3096–3102.
- Monteiro S. M. S., Clemente J. J., Carrondo T., Cunha A.E. 2014. Enhanced spore Production of *Bacillus subtilis* Grow in a Chemically Defined Medium. *Advances in microbiology* (June): 444–54.
- Monteiro S. M. S., Clemente J. J., Henriques A. O., Gomes R. J., Carrondo T. y Cunha A. E. 2005. A Procedure for High-Yield spore Production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* 21(4): 1026–31.
- Naghili H., Tajik H., Mardani K., Razavi-Rouhani S. M., Ehsani A. y Zare P.. 2013. Validation of Drop Plate Technique for Bacterial Enumeration by Parametric and Nonparametric Tests. *Veterinary research forum : an international quarterly journal* 4(3): 179–83.

- Nandimath A. P., Karad D. D., Gupta S. G. y Kharat A. S. 2017. Consortium Inoculum of Five Thermo-Tolerant Phosphate Solubilizing Actinomycetes for Multipurpose Biofertilizer Preparation. *Iranian Journal of Microbiology* 9(5): 295–304.
- National Food Institute. 2014. *Subculture and Maintenance of Quality Control Strains*. European Union: DTU Food: National Food Institute 1-4.
- Ongena M. y Jacques P. 2008. *Bacillus* Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol. *Trends in Microbiology* 16(3): 115–25.
- Oni F. E., Olorunleke O. F. y Höfte B. 2019. Phenazines and Cyclic Lipopeptides Produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a Are Involved in the Biological Control of *Pythium myriotylum* on Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). *Biological Control* 129: 109–14
- Palmieri D., Vitullo D., De Curtis F. y Lima G. 2017. A Microbial Consortium in the Rhizosphere as a New Biocontrol Approach against *Fusarium* Decline of Chickpea. *Plant and Soil* 412(1–2): 425–39.
- Palyzová A., Svobodava K., Sokolova L., Novak J. y Novotny C. 2019. Metabolic Profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. Conglutinans Race 2 in Dual Cultures with Biocontrol Agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiologica* 64(6): 779- 87
- Peralta-Mendoza J. A. 2017. Bacterias Endófitas Transmitidas Por Las Semillas de Agaves Silvestres (*A. maximiliana* y *A. angustifolia*): Caracterización de Las Propiedades Agronómicas y Su Actividad Antifúngica. Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Pérez-Moreno L., Belmonte-Vargas J. R., Nuñez-Palenius H. G., Guzman-Mendoza R. y Mendoza-Celedón B. 2015. Sensibilidad in Vitro de Dos Especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a Agentes de Control Biológico y Fungicidas. *Revista mexicana de fitopatología* 33(2): 256–67.
- Pérez-Rodriguez L. R., Pérez-Moreno L., Guzman-Mendoza R. y Sanzón-Gómez D.. 2019. Sensibilidad in Vitro de Hongos Fitopatógenos Causantes de Enfermedades En Fresa a Controladores Biológicos y Fungicidas, En El Estado de Guanajuato, México. *Acta Universitaria: Multidisciplinary Scientific Journall* 29(2339): 1–11.
- Petrides D. 2003 *Bioprocess Design and Economics*, New Jersey: INTELLIGEN, INC, 1–60.
- Posada-Urbe L. F., Romero-Tabarez M. y Villegas-Escobar V. 2015. Effect of Medium Components and Culture Conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore Production. *Bioprocess and biosystems engineering* 38(10): 1879–88.
- Pretorius D., van Rooyen J. y Clarke K. G. 2015. Enhanced Production of Antifungal Lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for Biocontrol of Postharvest Disease. *New Biotechnology* 32(2): 243–52.
- Puerto C. A., Garcia H. M., Cedre B., Año G., Morales T., Alfaro A., Amat E. Mirabal M., Sotolongo F. y Talavera A. 2004. Sistema de Lotes de Siembra de La Ceba Vacunal *Vibrio cholerae* 638. *VacciMonitor* 13(1): 21-28.
- Ramyabharthi S., Rajendran L., Gandhi K. y Raguchander T. 2016. Liquid Formulation of Endophytic *Bacillus* and Its Standarization Fot the Management of *Fusarium* Wilt in Tomato.

Journal of Botany 45(2): 283–90.

- Rasman S., Kergunteuil A., Bakhtiari M., Formenti L., Xiao Z. y Defosse E. 2016. Biological Control beneath the Feet: A Review of Crop Protection against Insect Root Herbivores. *Insects* 7(4): 70.
- Reuter, C. 2016. *Composition for Stabilizing Bacillus spores and Methods of Use Thereof*. US20110200572A1.
- Rhodes D. J. 1993. Formulation of Biological Control Agents. En Jones D. G. *Exploitation of Microorganisms*. Londres: Chapman & Hall, 411–39.
- Rowe G. E. y Margaritis A. 2004. Bioprocess Design and Economic Analysis for the Commercial Production of Environmentally Friendly Bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 Kurstaki. *Biotechnology and Bioengineering* 86(4): 377–88.
- Saber W. I. A., Ghoneem K. M., Al-Askar A. A., Rashad Y. M., Ali A. A. y Rashad E. M. 2015. Chitinase Production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and Its Effect on Biocontrol of Rhizoctonia Diseases of Potato. *Acta Biologica Hungarica* 66(4): 436–48.
- Sahu P. K. y Brahma Prakash G. P. 2016. Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Nueva Deli: Springer, 179–98.
- Sarma B. K., Yadav S. K., Singh S. y Singh H. B. 2015. Microbial Consortium-Mediated Plant Defense against Phytopathogens: Readdressing for Enhancing Efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* 87: 25–33.
- Savary S., Ficke A., Aubertot J. N. y Hollier C. 2012. Crop Losses Due to Diseases and Their Implications for Global Food Production Losses and Food Security. *Food Security* 4(4): 519–37.
- Schreiter S., Babin D, Smalla K. y Grosch R.. 2018. Rhizosphere Competence and Biocontrol Effect of *Pseudomonas* sp. RU47 Independent from Plant species and Soil Type at the Field Scale. *Frontiers in Microbiology*. 9:97
- Shafi J. Tian H. y Ji M. 2017. *Bacillus* species as Versatile Weapons for Plant Pathogens: A Review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 31(3): 446–59.
- Sindhu R., Pandey A. y Binod P. 2016. *Design and Types of Bioprocesses*. En Larroche C., Sanromán M., Du G. y Pandey A. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls. Amsterdam:Elsevier B.V. : 23-49
- Singh V., Haque S., Niwas R. Srivastava A., Pasupuleti M. y Tripathi C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An in-Depth Review. *Frontiers in Microbiology* 7: 2087
- Singleton, Paul, Harold Keyser, and Eve Sande. 2002. Development and Evaluation of Liquid Inoculants. *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in vietnam* (January 2002): 52–66.
- Stojanović S. S., Kaabegovic I., Beskoski V., Nikolic N. y Lazic Miodrag. 2019. *Bacillus* Based Microbial Formulations: Optimization of the Production Process. *Hemijaska Industrija* 73(3): 169–82.
- Suárez-Moreno Z. R., Vinchira-Villarraga D. M., Vergara-Morales D. I., Castellanos L., Ramos F. A., Guarnaccia C., Degraasi G., Venturi V. y Moreno-Sarmiento N. 2019. Plant-Growth

- Promotion and Biocontrol Properties of Three *Streptomyces* spp. Isolates to Control Bacterial Rice Pathogens. *Frontiers in Microbiology* 10(FEB): 1–17.
- Taiz L., Zeiger E., Moller I. M. y Murphy A. 2014. 6 Oxford University Press *Plant Physiology and Development*. Sunderland: Sinauer Associates. 70-97.
- Tanaka K., Mutsumi F., Yusuke A., Takotoshi S., Koji I., Atsishhu I. y Nakajima H. 2017. Importance of Prumycin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32 in Biocontrol against Cucumber Powdery Mildew Disease. *Pest Management Science* 73(12): 2419–28.
- Teera-arunsiri A., Suphantharika M. y Uthai Ketunuti. 2003. Preparation of spray-Dried Wettable Powder Formulations Of. *Science And Technology* (1): 292–99.
- Tejeda A., Montesinos R. M. y Guzmán R.. 2011. *Bioseparaciones*. Hermosillo: PEARSON EDUCACIÓN. 36-298
- Toral L., Rodríguez M., Béjar V. y Sampedro I. 2018. Antifungal Activity of Lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology* 9(JUN): 1–12.
- Torres M. J., Perez-Brandan C., Petroselli G., Erra-Balsells R. y Audisio M.C. 2016. Antagonistic Effects of *Bacillus subtilis* Subsp. subtilis and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM Study of Fungal Changes and UV-MALDI-TOF MS Analysis of Their Bioactive Compounds. *Microbiological Research* 182: 31–39.
- Ulrich G. D. 1984. *A Guide to Chemical Engineering Process Design and Economics*. Hoboken: John Wiley & Sons. 58-302
- Uwem U. M., Babafemi A. A. y Sunday D. M. 2017. Proximate Composition, Phytoconstituents and Mineral Contents of Soybean (*Glycine max*) Flour Grown and Processed in Northern Nigeria. *Advances in Applied Sciences* 2(4): 48–53.
- Verma A. S., Das S. y Singh A. 2014. *Laboratory Manual For Biotechnology*. Nueva Delhi: S. Chand. 1-15
- Villafañá-Rojas J., Gutiérrez E. y De La Torre M. 1996. Primary Separation of the Entomopathogenic Products of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Progress* 12(4): 564–66.
- De Vrieze M., Germanier F., Vuille N. y Weisskopf L. 2018. Combining Different Potato-Associated *Pseudomonas* Strains for Improved Biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Microbiology* 9:2573.
- Wallace R. L., Hirkala D. L. y Nelson L. M. 2017. Postharvest Biological Control of Blue Mold of Apple by *Pseudomonas fluorescens* during Commercial Storage and Potential Modes of Action. *Postharvest Biology and Technology* 133(July): 1–11.
- Wang D., Li A., Han H., Liu T. y Yang Q. 2018. A Potent Chitinase from *Bacillus subtilis* for the Efficient Bioconversion of Chitin-Containing Wastes. *International Journal of Biological Macromolecules* 116(2017): 863–68.
- Wang Y., Zhu X., Bie X., Lu F., Zhang C., Yao S. y Lu Z. 2014. Preparation of Microcapsules Containing Antimicrobial Lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 by spray Drying. *LWT - Food Science and Technology* 56(2): 502–7.
- Wigley P., Turner S., George C., Wright D., Williams T. y Roberts K. 2017. *Agriculturally Beneficial Microbes, Microbial Compositions and Consortia*. WO2017019633A2.

- Zhang R., Zhiyi C., Liu Y., Xiuhua D., Xiaoyu W. y Luo C. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bismertiazol* Compound Wettable Bactericidal Powder and Application Thereof. CN103875713B.
- Zhao Q., Mei X. y Xu Y. 2016. Isolation and Identification of Antifungal Compounds Produced by *Bacillus* Y-IVI for Suppressing *Fusarium* Wilt of Muskmelon. *Plant Protection Science* 52(3): 167–75.
- Zhao X. Han Ye., Tan X. Wang J., y Zhou Z.. 2014. Optimization of Antifungal Lipopeptide Production from *Bacillus* sp. BH072 by Response Surface Methodology. *Journal of Microbiology* 52(4): 324–32.