



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN PROTOTIPO DE FORMULACIÓN DE UNA  
CEPA DE *Bacillus* EMPLEADA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Botrytis  
cinerea* EN ROSAS**

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA 4 DE OCTUBRE DE 2019



***DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN PROTOTIPO DE FORMULACIÓN DE UNA  
CEPA DE *Bacillus* EMPLEADA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Botrytis  
cinerea* EN ROSAS***

LAURA MARCELA BOYACÁ OLAYA

**PhD. DANIEL URIBE VELEZ**

**Director**

**Mg. LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL**

**Asesora Interna**

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA, 4 DE OCTUBRE DE 2019

*A Dios por bendecirme y permitirme llevar a cabo y culminar este proyecto.*

*A mis papas y a mi hermana por su amor incondicional y por todo el apoyo brindado y la comprensión siempre.*

*“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”. Isaac Newton*

*La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia.  
Socrates*

*"Solo aquellos que se atreven a tener grandes fracasos terminan consiguiendo grandes éxitos". Robert F. Kennedy*

**AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarme, cuidarme y protegerme.

A mis padres por su acompañamiento, preocupación y su apoyo en todo momento.

A mi hermana por los consejos y ayuda incondicional.

Al profesor Daniel Uribe Vélez, director del grupo de Investigación en Microbiología Agrícola, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por sus enseñanzas tanto a nivel profesional como personal, su acompañamiento incondicional a lo largo de este tiempo y por buscar siempre la forma de formarnos como mejores investigadores y seres humanos.

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

A la profesora Ligia Consuelo Sánchez Leal por su asesoría y acompañamiento a lo largo de este trabajo.

A los miembros del grupo de Microbiología Agrícola y compañeros de laboratorio por todas las enseñanzas, las risas, los momentos compartidos con cada uno de ellos y por las amistades creadas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. Resumen</b> .....	<b>11</b>	<b>2.</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>	<b>3.</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>16</b>	<b>4.</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>17</b>	<b>5. Marco</b>
<b>Referencial</b> .....	<b>20</b>	
<b>5.1. Actualidad de la situación fitosanitaria de la floricultura de rosas en Colombia</b> .....	<b>20</b>	
<b>5.2. Fitopatologías del cultivo de rosas</b> .....	<b>22</b>	
<b>5.3. Biología del fitopatógeno</b> .....	<b>23</b>	
<b>5.3.1. Ciclo de la enfermedad</b> .....	<b>24</b>	
<b>5.3.2. Manejo de la enfermedad y estrategias de control</b> .....	<b>25</b>	
<b>5.4. Control biológico</b> .....	<b>26</b>	
<b>5.4.1. Microorganismos utilizados</b> .....	<b>26</b>	
<b>5.4.2. <i>Bacillus</i></b> .....	<b>26</b>	
<b>5.5. Normatividad bioinsumos en Colombia</b> .....	<b>27</b>	

5.6. Formulaciones de control biológico .....	28
5.6.1. Funciones .....	28
5.6.2. Tipos de formulación .....	29
5.6.3. Formulaciones solidas .....	29
5.6.4. Liofilización .....	30
5.6.5. Excipientes .....	30
6. Diseño metodológico.....	31
6.1. Universo, población, muestra .....	31
6.2. Hipótesis .....	31
6.3. Variables independientes .....	31
6.4. Variables dependientes .....	31
6.5. Técnicas y procedimientos .....	32
6.5.1. Primera fase: Diseño del prototipo de formulación .....	32
6.5.1.1. Activación de la cepa biocontroladora y el patógeno .....	32
6.5.1.2. Producción de biomasa IM2C6 .....	32
6.5.1.3. Selección de la concentración y proporción de crioprotectante .....	33
6.5.1.4. Liofilización .....	33
6.5.1.5. Evaluación de la viabilidad y pureza .....	34
6.5.1.6. Evaluación de antagonismo <i>in vitro</i> .....	35
6.5.2. Segunda Fase .....	36
6.5.2.1. Selección, concentración y proporción de los excipientes .....	36
6.5.3. Tercera Fase .....	37
6.6. Análisis estadístico .....	37
7. Resultados .....	38
7.1. Primera fase: diseño del prototipo de evaluación .....	38
7.2. Segunda fase: selección de los excipientes .....	43
7.3. Tercera fase: evaluación de la viabilidad, pureza y capacidad biocontroladora de la formulación .....	44
8. Discusión .....	48
9. Conclusiones .....	52
10. Bibliografía .....	53

## INDICE FIGURAS

<b>Figura 1: Reporte SISFITO hectáreas cultivadas del sector floricultor</b> .....	20
<b>Figura 2: Valor comercial de las principales especies de flores exportadas entre el 2014 y el 2018</b> .....	21
<b>Figura 3: Botrytis cinerea</b> .....	24
<b>Figura 4: Ciclo de la enfermedad del moho gris causado por Botrytis en rosa</b> .....	25
<b>Figura 5: A Colonia IM2C6. B Cepa de B. cinerea activada</b> .....	32
<b>Figura 6: Liofilizados. A antes de resuspender. B resuspendidos</b> .....	34
<b>Figura 7: Recuento en placa, metodología: gotas</b> .....	35
<b>Figura 8: Actividad antagónica</b> .....	36
<b>Figura 9: Prototipos de formulación</b> .....	37
<b>Figura 10: curva de crecimiento IBUN IM2C6 en medio ESP</b> .....	38
<b>Figura 11: Viabilidad y actividad de la primera repetición en el tiempo</b> .....	39
<b>Figura 12: Viabilidad y actividad de la segunda repetición</b> .....	40
<b>Figura 13: Viabilidad y actividad de la tercera repetición</b> .....	42
<b>Figura 14: Actividad liofilización 3</b> .....	42
<b>Figura 15: Viabilidad de prototipos de formulación almacenados a temperatura ambiente y evaluados a diferentes tiempos.</b> .....	45
<b>Figura 16: Actividad antagónica de los cuatro prototipos de formulación, de la dilución 1/10 en los tres tiempos de evaluación.</b> .....	46
<b>Figura 17: Actividad antagónica de los cuatro prototipos de formulación, de la dilución 1/100 en los tres tiempos de evaluación.</b> .....	46

## INDICE TABLAS

<b>Tabla 1: contenido de mezcla de los prototipos</b> .....	44
---	----



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN PROTOTIPO DE FORMULACIÓN DE UNA  
CEPA DE *Bacillus* EMPLEADA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Botrytis  
cinerea* EN ROSAS**

**1. RESUMEN**

El sistema de producción de rosas de corte para exportación se ve constantemente afectado por agentes fitopatógenos, siendo *Botrytis cinerea* uno de los más frecuentes y relevantes, debido al número de hospederos que posee y a su persistencia durante el cultivo, representando un reto a la hora de su comercialización.

En los últimos años, el control biológico ha tomado fuerza en el manejo de fitopatógenos, toda vez que, se fundamenta en métodos amigables con el medio ambiente, permitiendo el desarrollo de nuevos productos a partir de diversos microorganismos con acción biocontroladora.

La bacteria formadora de endósporas (BAFE) *Bacillus velezensis* (IM2C6) con potencial biocontrolador contra *B. cinerea*, fue empleada en este estudio con el objeto de diseñar y generar un prototipo de formulación en base sólida, que junto a diversos aditivos logre mantener la viabilidad celular y actividad antagónica en

función del tiempo. Las mezclas evaluadas constaron de un ingrediente activo liofilizado cuyo lioprotector fue leche descremada en polvo, se adicionó CaCO<sub>3</sub>, Talco y Carboximetil celulosa como excipientes y se evaluaron tres azúcares diferentes, glucosa, sacarosa y sorbitol. El prototipo 4 fue el más promisorio por sus resultados de viabilidad celular con rangos de 5.5x10<sup>8</sup> UFC/mL a 8x10<sup>8</sup> UFC/mL, la actividad antagónica *in vitro* no se vio alterada en ninguno de los prototipos. Los resultados aquí obtenidos, permiten seleccionar al prototipo número 4 para evaluarlo en ensayos *in vivo* y poder determinar si es una alternativa eficaz para el control de *B. cinerea* en rosas de corte.

**PALABRAS CLAVE:** rosas, *Botrytis cinerea*, *Bacillus velezensis*, formulación sólida, liofilizado, control biológico, viabilidad, actividad, excipientes.

## 2. INTRODUCCION

El cultivo de flores ocupa un papel importante en el sector económico y social del país, debido a que a nivel nacional representa el segundo producto agrícola de exportación luego del café<sup>1</sup>; siendo las rosas el principal producto de exportación, en donde el 95% de su producción es exportada<sup>2</sup>. A nivel mundial, Colombia ocupa el segundo lugar en la exportación de flores de corte y follaje, con una participación del 16% después de Holanda con el 45%<sup>2,3</sup> del mercado global, los destinos de las exportaciones de Colombia, son principalmente Estados Unidos (78%), Japón (4%), Reino Unido y Canadá (3.0%), seguidos de Holanda y Rusia (2.0%)<sup>2,4,5</sup>.

La temporada más importante para el sector floricultor en Colombia, corresponde al 14 de febrero, donde para el 2019 sus ventas alcanzaron un total de 600 millones de tallos exportados, correspondientes a 1600 variedades de flores, donde se destacó la rosa<sup>2</sup>. En el país las principales áreas de producción las constituyen el departamento de Cundinamarca en la zona centro del país, el departamento de Antioquia en la zona occidente y los departamentos Risaralda, Caldas, Quindío y Valle del Cauca por la zona centro occidente; siendo Cundinamarca el departamento con mayor producción<sup>2</sup>.

Debido a la relevancia de este sector, constantemente se busca mejorar los sistemas de producción, para así cumplir con los estándares internacionales y a su vez reducir la incidencia de fitopatógenos. Por lo cual, la industria agrícola se enfoca en el desarrollo de bioinsumos, donde se han identificado microorganismos con la capacidad de controlar agentes fitopatógenos, para usarlos como ingrediente activo y así poder suplir los productos de origen químico de las plantaciones agrícolas<sup>6,7</sup>.

Debido a la importancia que tiene el desarrollo de estos productos biológicos, se han llevado a cabo diversas investigaciones cuyos enfoques varían tanto en los agentes biocontroladores como en los fitopatógenos<sup>8</sup>. Lo anterior con el fin de obtener cultivos más limpios, donde el manejo integrado de estos logre disminuir el uso de productos químicos, minimizando así los residuos que puedan llegar a ser

nocivos y tóxicos para el cultivo, el ambiente, las comunidades microbianas y para el personal asociado a la manipulación de estos productos. El manejo integrado de cultivos busca alternar la aplicación de productos biológicos, con la aplicación de prácticas culturales para disminuir la incidencia del patógeno y/o evitar la propagación de la enfermedad, logrando así una producción más sana y competitiva a nivel mundial<sup>6-8</sup>.

Una de las principales dificultades a las que se enfrentan los sistemas de producción de rosas, es la susceptibilidad del cultivo a sufrir problemas fitosanitarios, siendo los hongos los principales agentes etiológicos, los cuales afectan la productividad y calidad, limitando así la exportación del producto<sup>9</sup>. Dentro de estos agentes fúngicos se destacan *Botrytis cinerea* causando la enfermedad del moho gris, *Peronospora sparsa* (mildeo veloso) y *Sphaerotheca pannosa* (mildeo polvoso)<sup>10,11</sup>.

*Botrytis cinerea* agente causal de la enfermedad denominada moho gris, es un hongo patógeno necrotrófico que induce la muerte celular, produce daños en los tejidos vegetales y finalmente conduce a la podredumbre del hospedero<sup>11</sup>; el manejo que se le ha dado es principalmente la aplicación de productos químicos. En el mercado hay varios fungicidas que controlan eficazmente a este patógeno, pero se ha demostrado que algunas cepas han conferido resistencia a dichos productos, lo que genera preocupación por el uso excesivo de estos pesticidas<sup>11-13</sup>. Por tal motivo es conveniente el desarrollo de bioinsumos que permitan la reducción del uso de fungicidas, lo que a su vez mejorara la calidad de los cultivos.

Dentro del control biológico aplicado frente a esta problemática, está el desarrollo de formulaciones, donde se han evaluado diversos microorganismos con capacidad antagónica frente a *B. cinerea*, entre ellos están las bacterias del género *Bacillus*, clasificado como buen candidato para el desarrollo de productos biocontroladores estables, debido a su capacidad de formar endosporas, proporcionándole resistencia en condiciones ambientales adversas, además son consideradas “fabricas microbianas” para la producción de moléculas activas con potencial inhibitorio en el crecimiento de fitopatógenos<sup>14,15</sup>. Por tal motivo las especies de

*Bacillus* pueden ser formuladas con facilidad usando las esporas, siendo promisorias para el desarrollo de productos de control biológico<sup>16</sup>.

Cuando se habla de formulaciones microbianas hay algunos parámetros que deben ser cumplidos, entre ellos: deben ser económicas de producir, su aplicación en el cultivo debe ser sencilla, debe contener suficientes unidades formadoras de colonias y proporcionar una vida útil larga, finalmente deben mantener su eficacia contra patógenos a lo largo del tiempo.<sup>15,17</sup>.

En términos generales, las formulaciones se dividen en dos grandes grupos según su naturaleza y estado físico, aquí tenemos las formulaciones líquidas y sólidas. Antes, la mayoría de los plaguicidas eran formulados líquidos, pero representaban un inconveniente a la hora de transportarlos y almacenarlos hasta su uso, por lo cual se optó por desarrollar formulaciones con base sólida también denominadas secas, proporcionando una vida útil prolongada y facilitando su transporte y almacenamiento. Los polvos humectables son un ejemplo de este tipo de formulaciones, los cuales superan las desventajas de los líquidos y además permiten su almacenamiento a temperatura ambiente, mejorando su rendimiento y volviéndola más estable<sup>18</sup>. Para lograr esto, las formulaciones pueden ser modificadas por medio del uso de aditivos que mejoran las propiedades químicas, físicas o nutricionales de la biomasa formulada<sup>19,20</sup>.

La liofilización se considera una técnica eficaz para la conservación de microorganismos durante largos periodos de tiempo, sin embargo, representa un riesgo en la viabilidad, pues su técnica de secado puede llegar a perjudicar al microorganismo<sup>15</sup>. Por lo cual se formula la siguiente pregunta, ¿Es posible diseñar un prototipo de formulación liofilizada a partir de la cepa IBUN IM2C6 que mantenga su estabilidad a temperatura ambiente en función del tiempo? Por tal motivo con este trabajo se pretende realizar una formulación de polvo humectable, cuyo ingrediente activo este liofilizado, procurando conservar al máximo la viabilidad de este por medio del uso de diferentes excipientes, evitando la pérdida de viabilidad y actividad antagónica durante su almacenamiento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **1. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar y evaluar un prototipo de formulación sólida a base de la cepa de *Bacillus velezensis* IBUN IM2C6 con actividad biocontroladora contra *Botrytis cinerea* en rosas tipo exportación.

#### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Elaborar un prototipo de formulación a base de la cepa de *B. velezensis* IBUN IM2C6 como principio activo con actividad antagónica contra *B. cinerea*.
- Seleccionar los excipientes para la formulación compatibles con la cepa IM2C6
- Evaluar la viabilidad, pureza y actividad antagónica contra *B. cinerea*, del prototipo de formulación en función del tiempo

#### 4. ANTECEDENTES

Uno de los fitopatógenos más relevantes de origen fúngico en un gran número de cultivos es *Botrytis cinerea*, debido a que cuenta con una gran cantidad de hospederos alternativos, además de que posee una gran persistencia, puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo y afectar cualquier parte de la planta<sup>8</sup>. En Colombia se han descrito afecciones por parte de este patógeno en cultivos de fresas, tomates, uvas y en flores como claveles y rosas de corte para exportación, entre otras, ocasionando grandes pérdidas económicas, de ahí que se lleven a cabo diferentes métodos de control dentro de los cuales están los fungicidas y la implementación de productos de control biológico<sup>21</sup>.

En cuanto a las formulaciones sólidas que se han llevado a cabo donde tienen como ingrediente activo a especies del género *Bacillus* se tiene que, en el 2003 Chiou y colaboradores diseñaron una formulación a partir de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* para el control del moho gris del lirio causada por *Botrytis elliptica*<sup>22</sup>; en el año 2004 se evaluó la capacidad biocontroladora de *B. subtilis* frente al fitopatógeno *Fusarium* en ensayos *in vitro*, concluyendo que este era un método eficaz de control<sup>17</sup>. Jayaraj y colaboradores en el año 2005 desarrollaron una formulación de *Bacillus subtilis* para el manejo de *Pythium aphanidermatum* en tomate<sup>23</sup>; en este mismo año, Hang y colaboradores utilizaron una cepa de *B. subtilis* para el control de *B. cinerea* en rosas<sup>24</sup>.

Para el control de *B. cinerea*, se han desarrollado diferentes formulaciones cuyo ingrediente activo consta de especies del género *Bacillus*, entre ellas la propuesta por Lee y colaboradores en el 2006 quienes desarrollaron una formulación de *B. licheniformis* para el control de *B. cinerea* en tomate<sup>12</sup>, utilizando el mismo agente biocontrolador, en el año 2007 Kim y colaboradores desarrollaron una formulación para el control de *B. cinerea* en fresa<sup>16</sup>.

En el 2010 Omer formuló una cepa de *Bacillus megatherium*, con el fin de aplicar dicha formulación en las semillas de frijol para otorgarles protección y actuar como promotor de crecimiento, para esto se probaron diversos excipientes con la finalidad

de elegir la mejor mezcla y evaluarla en el tiempo<sup>20</sup>. Rangeshwaran y colaboradores evaluaron diferentes mezclas de excipientes para determinar cuál de ellas era la más promisorio para mantener la viabilidad a lo largo del tiempo, en formulaciones de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus sp*<sup>25</sup>. Además, en el grupo de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), se han llevado a cabo diversas investigaciones con resultados promisorios en el control de *B. cinerea* por medio del uso de levaduras epifíticas<sup>26</sup>.

También se han desarrollado formulaciones cuyo principio activo es *Bacillus cereus*, un ejemplo de este es el trabajo desarrollado en el año 2015, donde Cheng y colaboradores estudiaron las condiciones de almacenamiento y eficacia de diferentes formulaciones aceptadas comercialmente de esta especie en China, para el control de la podredumbre de la castaña y otras frutas causada por *Endothia parasítica* (Murr) y *Fusarium solani*, posteriormente desarrollaron su prototipo de formulación en forma de polvo humectable, usando como ingrediente activo las esporas de *B. cereus* liofilizadas<sup>18</sup>; Martínez y colaboradores utilizando el mismo agente de biocontrol, desarrollaron en el año 2016 una formulación en polvo para el control de *Fusarium verticillioides* en plantas de maíz<sup>14</sup>.

En Colombia, Corpoica (actualmente Agrosavia), desarrolló un bioplaguicida para el control de *B. cinerea* cuyo ingrediente activo es la cepa LvCo7 de *Rodotorula glutinis*, donde, con lo cual se determinó que la efectividad en el control es de más del 65% en mora<sup>27</sup>. De igual modo se demostró la eficacia de las propiedades antifúngicas que posee la cepa BC79 de *B. methylotrophicos* frente a patógenos como *Magnaporthe oryzae* y *Botrytis cinerea*<sup>9</sup>.

Por otro lado, el uso de excipientes como manitol y trehalosa para estabilizar las células se ha observado en investigaciones como la realizada por Bautista y colaboradores en el año 2016, donde desarrollaron una formulación cuyo ingrediente activo es *Rhodotorula mucilaginosa* y *Pseudozyma tsukubaensis*, para el control de *B. cinerea* en rosas<sup>21</sup>.

Gotor-Vila y colaboradores en el año 2017 compararon tres diferentes tipos de formulación, líquida, liofilizada y *spray dryer* (secado por pulverización), donde se usó como agente biocontrolador una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, las diferentes formulaciones se probaron contra *Monilinia laxa* y *M. fructicola* en melocotón<sup>15</sup>. En este mismo año, Ge y colaboradores, determinaron la capacidad que posee la cepa de *B. methylotrophicos* NKG-1 en la supresión de crecimiento del micelio y la germinación de conidios de fitopatógenos como *B. cinerea*, entre otros, en la cual dicha supresión fue del 60%; además, se evidenció su potencial como biofertilizante en plantas de tomate<sup>9</sup>.

En la determinación de crioprotectores, en el 2018 Hung y colaboradores realizaron diferentes evaluaciones para determinar cuál crioprotector era el mejor para una cepa de la especie *B. amyloliquefaciens*<sup>28</sup>.

Dentro de la amplia gama de fungicidas utilizados en los cultivos de rosas, se encuentran dicarboximidias, imidazoles, anilino pirimidinas, carboximidias, benzimidazoles, fenilpirroles y ditiocarbamatos, entre otros, los cuales ya están siendo reemplazados por las estrategias biológicas<sup>29</sup>. Con el fin de realizar un control biológico sobre *B. cinerea*, se ha implementado el uso de biofungicidas comerciales entre los cuales están BACTOX y FUNGIGRASP WP, a base de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* respectivamente, además de, todos los prototipos de formulación cuyo ingrediente activo consta de bacterias y/o levaduras principalmente<sup>21,30</sup>.

Dentro de los microorganismos con potencial biocontrolador, se destacan los pertenecientes al género *Bacillus* sp., pues se ha demostrado su acción en el control de plagas y enfermedades, no solo las causadas por microorganismos patógenos, sino también de ácaros e insectos lepidópteros y coleópteros<sup>31</sup>. En el caso del control de agentes fitopatógenos, sintetiza sustancias que suprimen el crecimiento, entre las cuales se destacan las iturinas y surfactinas, que tienen acción antifúngica y bactericida respectivamente<sup>9,32,33</sup>, por lo que permite considerar este género como uno de los mejores para ser usados a nivel mundial, ya que posee altas tasas de efectividad y no causa daño al medio ambiente, permitiendo así su empleo como alternativa promisoría para los plaguicidas sintéticos<sup>34</sup>.

## 5. MARCO REFERENCIAL

### 5.1. Actualidad de la situación fitosanitaria de la floricultura de rosas en Colombia

De acuerdo con el Boletín Técnico de exportaciones publicado por el DANE la exportación de flores en el 2018 generó ingresos alrededor de 1.470 millones de dólares<sup>35</sup>, en este mismo año el Sistema de Información epidemiológica y Vigilancia Fitosanitaria (SISFITO) reportó que habían 8.433 hectáreas cultivadas de flores de corte y follaje para exportación (Figura 1. A), cuyo rendimiento fue de 28.4 Ton/Ha (Figura 1.B)<sup>2,4</sup>. Las principales zonas productoras se encuentran en los departamentos de Cundinamarca y Antioquia donde son destinadas a este fin 5.530 (66%) y 2.700 (32%) hectáreas respectivamente<sup>2,4,5</sup>.

**Figura 1:** Reporte SISFITO hectáreas cultivadas del sector floricultor (ICA, Dane, MADR, 2018)



La Rosa es la especie de flores que más se comercializa alcanzando en el 2017

309.4 millones de dólares y en el 2018 incrementó un 7.3% con 333.8 millones de dólares (Figura 2)<sup>2</sup>. El precio implícito de estas en el año 2017 fue de 6.4 US/Kg, mientras que en el 2018 alcanzó 7.0 US/Kg. Además de los ingresos que se reciben de la producción de rosas, el sector floricultor genera aproximadamente 130.000 empleos formales y cerca de 600.000 colombianos dependen de esta actividad<sup>4,36</sup>.

**Figura 2:** Valor comercial de las principales especies de flores exportadas entre el 2014 y el 2018 (DANE-MADR, 2018)

(Millones US \$ FOB)					
Especie	2014	2015	2016	2017	2018
Rosa	371,6	315,5	304,3	309,4	333,8
Clavel	226,1	213,0	212,2	225,0	226,1
Crisantemo	150,3	147,1	146,4	152,8	152,7
Otros	638,1	613,9	592,6	655,1	690,3
<b>Total</b>	<b>1.386,1</b>	<b>1.289,5</b>	<b>1.255,4</b>	<b>1.342,4</b>	<b>1.402,9</b>

La agremiación de este sector es representada por ASOCOLFLORES, la cual se encarga de velar por el bienestar de los trabajadores, del producto y el buen desarrollo de las exportaciones de las flores. Debido a la necesidad de los productores de promover una floricultura sostenible y con responsabilidad social para alcanzar los índices internacionales, ASOCOLFLORES crea el programa Florverde Sustainable Flowers® como instrumento estratégico, el cual se fundamenta en la adopción de buenas prácticas agrícolas, la minimización del uso de agroquímicos y la calidad del producto, entre otros<sup>1</sup>.

El estándar Florverde Sustainable Flowers®, se encuentra homologado con la norma GLOBALG.A.P para Flores y Ornamentales<sup>1</sup>, busca garantizar la inocuidad de los productos agrícolas, la protección del ambiente y la sanidad agropecuaria, con el fin de mejorar los métodos convencionales de producción y reducir el uso de productos agroquímicos<sup>37</sup>, por medio de la regulación de aspectos como material de reproducción vegetal, gestión del suelo y de sustratos, uso de fertilizantes, productos fitosanitarios, cosecha, además de los tratamientos postcosecha que se le suministre al cultivo<sup>38</sup>.

Actualmente está vigente la iniciativa de sustentabilidad de la floricultura (FSI por sus siglas en inglés) impulsada por el mercado internacional, de la cual Florverde® hace parte, cuyo objetivo para el 2020 es que el 90% de las flores producidas y comercializadas estén certificadas como sostenibles; los miembros de esta iniciativa colaboran para mejorar las prácticas e impulsar un cambio positivo hacia la producción y el comercio sostenibles de flores y plantas<sup>39-41</sup>.

## **5.2. Fitopatologías del cultivo de rosas**

Los cultivos de rosas son susceptibles a adquirir diversas plagas e infecciones cuyos agentes causales son agentes fitopatógenos, principalmente hongos, seguido de bacterias y virus. Los hongos que más frecuentemente generan estas afecciones son *Botrytis* sp., *Peronospora sparsa* o *Verticillium* sp., entre otros<sup>42</sup>.

En los cultivos ornamentales principalmente en el de las rosas, la enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea*, ocasiona afectaciones en los pétalos, reduciendo la vida del cultivo, y su valor en el mercado<sup>41</sup>. El desarrollo de la enfermedad puede darse en la producción sin la generación de síntoma alguno o en la etapa de postcosecha, en donde las condiciones ambientales y de almacenamiento favorecen el desarrollo de la enfermedad, con un grado de humedad alto permitiendo así la fácil proliferación del hongo <sup>43</sup>.

En el año 2009 *Botrytis* sp. causó un impacto considerable en cultivos de flores de la Sabana de Bogotá y Cundinamarca en rosas, claveles y astromelias, teniendo una incidencia del 26.2%, seguida por *Sphaerotheca pannosa* con 22.2% y *Peronospora esparsa* con 16.2%<sup>44</sup>.

En este tipo de flores *B. cinerea* genera pérdidas económicas considerables, asociadas con las manchas que parecen quemaduras en los pétalos, las cuales se expanden provocando en el pétalo un color marrón. Cuando las condiciones de humedad son las adecuadas, poco a poco, el pétalo se cubre con el micelio gris del hongo esporulado, generando marchitamiento y muerte total de la flor<sup>45,46</sup>.

Por otro lado, uno de los factores que contribuyen a las pérdidas económicas de este sector es debido a los reclamos por parte de los clientes y sus exigencias de reembolso del dinero por la pérdida de la calidad cuando están contaminadas con

*B. cinerea* (esto ocurre en >85% de las reclamaciones)<sup>47</sup>. Así mismo en el año 2018 los productores de rosas reportaron un consolidado de 4.4 reclamos/hectáreas debido a afecciones causadas por *B. cinerea*<sup>47</sup>.

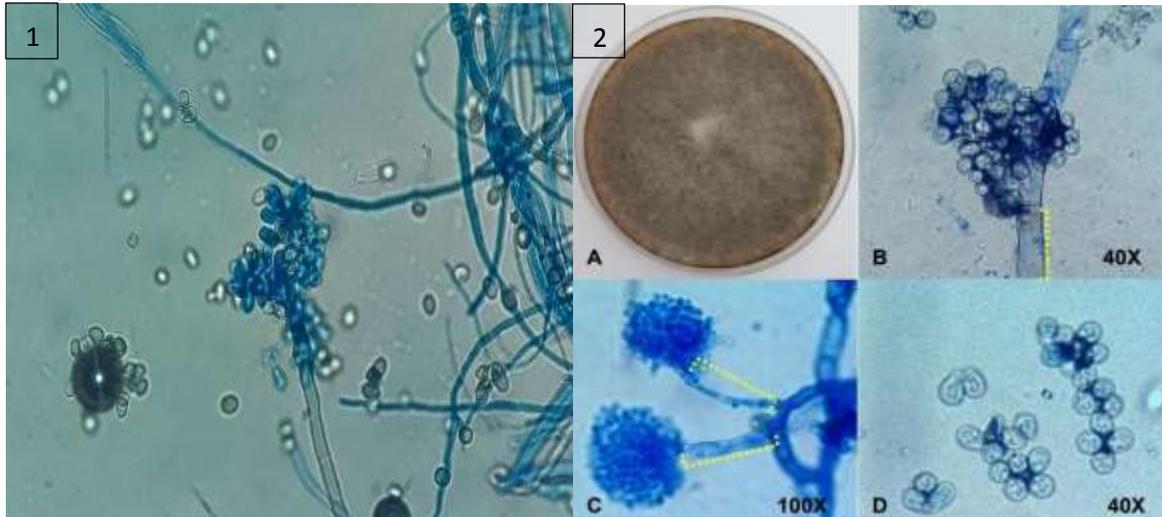
### 5.3. Biología del fitopatógeno

Hongo del filio: Ascomicota, subfilo: Pezizomycotina, clase: Leotiomicetos, orden: Helotiales, familia: Sclerotiniaceae, género: *Botryotinia*<sup>48,49</sup>. *Botrytis cinerea* genera la enfermedad denominada “podredumbre gris” corresponde a un hongo micelial Deuteromycota que presenta diferentes estructuras micro y macroscópicas permitiéndole generar patologías en diferentes especies frutales y ornamentales, es de los patógenos saprófitos con mayor distribución geográfica, infectando a más de 200 especies vegetales, causando pérdidas económicas durante la cosecha y post cosecha, igualmente su relevancia radica en los devastadores efectos que genera en sus hospederos<sup>9,19,44,50</sup>. Este fitopatógeno tiene la habilidad de atacar el cultivo en cualquier etapa de su desarrollo, así como en cualquier parte de este; puede crecer bajo una amplia gama de condiciones ambientales, pero su severidad es mayor en condiciones templadas y húmedas. Las esporas de *B. cinerea* pueden producirse sobre materia vegetal y transportarse a través de corrientes de aire y alcanzar grandes distancias<sup>9</sup>.

Este fitopatógeno puede desarrollarse como invasor primario o secundario pues, en el primer caso puede penetrar la cutícula de su hospedador por medio de la producción de enzimas, y en el segundo caso atacando a plantas ya infectadas por otro patógeno<sup>50</sup>.

Su crecimiento en condiciones *in vitro* presenta colonias polvorosas blancas que con el tiempo se tornan grises por el desarrollo de las estructuras fúngicas, formando dos tipos de colonias tipo micelial algodonosa de color pardo, y tipo esclerocial que presenta micelio escaso de color blanco y abundantes esclerocios de color negro. Sus hifas son dematiáceas septadas, conidióforo ramificado hialino, que presenta una célula apical redonda, conidios en racimos de forma oval que se desarrollan en el extremo del conidióforo ramificado (figura 3)<sup>44</sup>.

Figura 3: 1. *Botrytis cinerea* conidióforo y conidias. Fuente: Autora 2019. 2. Caracterización macro y microscópica de *Botrytis cinerea*. A. *Botrytis cinerea* esporulado en medio YBG durante 20 días B y C. Conidioforo (corchete amarillo punteado) y conidias en forma de racimo D. Conidias. (Piraquive 2019)



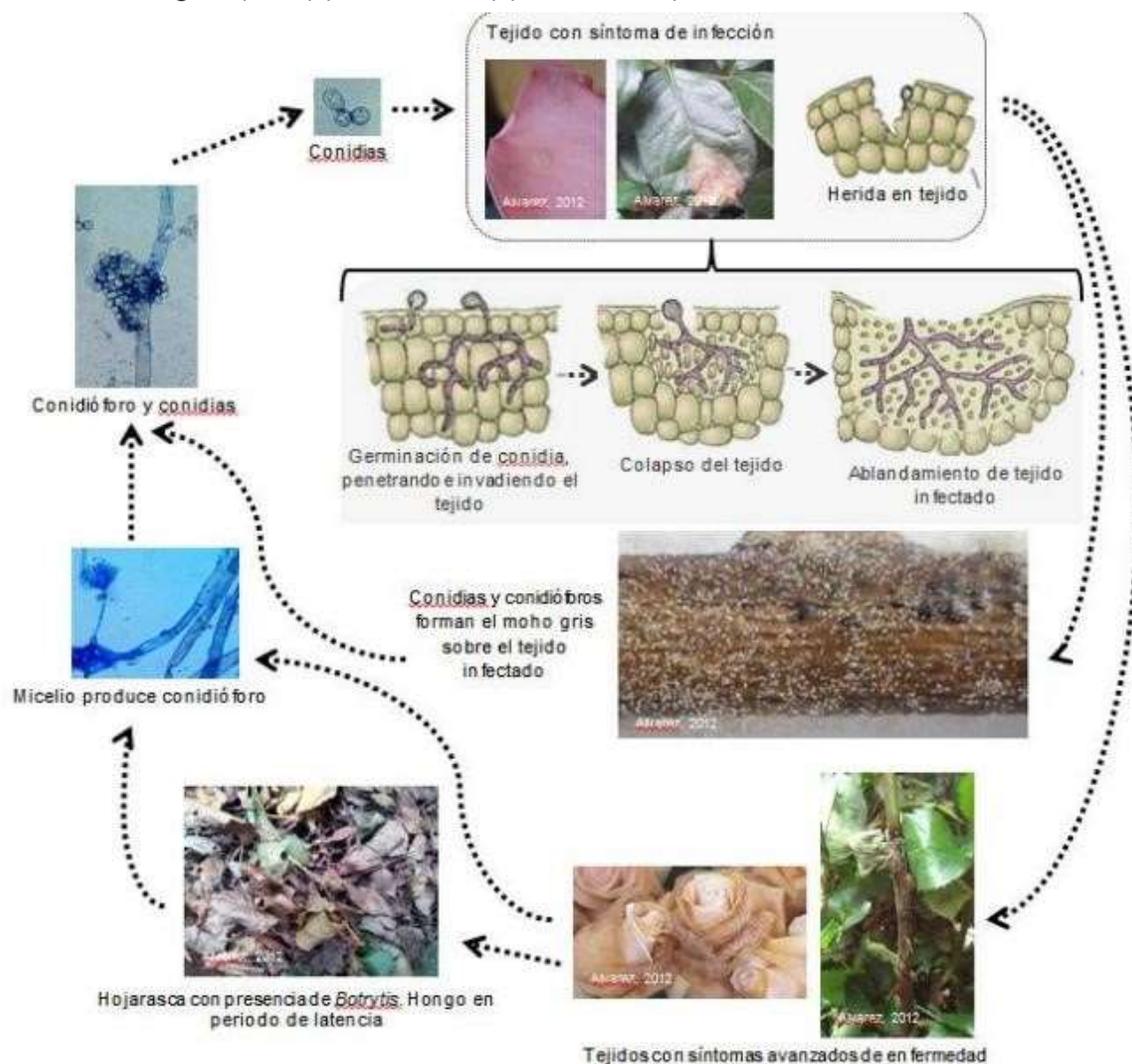
### 5.3.1. Ciclo de la enfermedad

El hongo saprofita y necrótrofo se establece en partes de la planta en descomposición o debilitadas, donde inicia su ciclo como se refleja en la figura 4, cuando la espora alcanza la superficie del huésped favoreciendo la adhesión y germinación. Posteriormente ocurre la penetración del tejido vegetal, a través de heridas o aberturas naturales por medio de la participación de distintas enzimas como cutinasas, endo- y exo-poligalacturonasas, pectin metil esterases, pectinliasas o por procesos mecánicos, en esas zonas se establece el patógeno generando en las células adyacentes muerte y al mismo tiempo formando la lesión primaria como consecuencia de los mecanismos de defensa de la planta. Luego, se genera una fase de latencia donde los mecanismos de la planta controlan la infección y el patógeno es restringido a las zonas donde se refleja la necrosis, transcurrido un tiempo, el patógeno adquiere la capacidad de vencer dichas defensas e inicia su diseminación en los tejidos de la planta. Finalmente, sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar a su vez un nuevo ciclo de infección<sup>9,42,50</sup>.

La lesión inicialmente se presenta como pústulas de color rojo o pardo sobre los pétalos de las flores, pero en ataques severos la flor es recubierta con micelio color pardo y la apertura no se realiza<sup>51</sup>.

Figura 4: Ciclo de la enfermedad del moho gris causado por *Botrytis* en rosa (Agris, 2005)

Modificado de Agris (2005) (Álvarez, 2012) (Gómez, 2013)



### 5.3.2. Manejo de la enfermedad y estrategias de control

Debido a las dificultades que conlleva la producción de un cultivo de rosas sano, hablando específicamente de la fitopatología causada por *Botrytis cinérea*, se llevan a cabo diferentes estrategias de control, entre las cuales se destacan: prácticas culturales, en donde se intervienen aspectos como el adecuado saneamiento de residuos vegetales, la regulación del microclima, reducción de la humedad relativa y control de la radiación solar; en el control fisiológico, se realizan aplicaciones directamente en las plantas de fitohormonas o se realiza fertilización con compuestos a base de calcio, con los cuales se busca reducir la severidad y extender la vida del cultivo; por otro lado de la medida de control que más se utiliza

es la aplicación de compuestos de síntesis química, entre los cuales se destacan los fungicidas, aplicados tanto por aspersión como directamente en el área afectada<sup>52-54</sup>.

Debido al uso prolongado de agentes de control químico, algunas cepas de *B. cinérea* desarrollaron resistencia, además del hecho de que, con el uso de estos compuestos, se generan residuos que afectan tanto la salud humana como el medio ambiente, y por otra parte su costo es elevado comparado con otras medidas de control<sup>53</sup>.

#### **5.4. Control biológico**

Estos métodos de control se desarrollan como alternativa promisorio y sostenible tanto económica como ambientalmente al uso de productos químicos, cuya acción es igual o más efectiva frente a fitopatógenos<sup>55</sup>; este tipo de productos tienen la característica de ser compatibles con la naturaleza, su especificidad es mayor en el organismo blanco que la que poseen los productos químicos, además su toxicidad es baja y la probabilidad de inducir resistencia en la plaga es mínima.

##### **5.4.1. Microorganismos utilizados**

Para el control biológico de esta fitopatología se han reportado estudios con resultados promisorios que emplean microorganismos como las levaduras rizosféricas.

Entre los microorganismos más usados como ingrediente activo de bioplaguicidas en la floricultura, aprobados por el ICA en el año 2018 se destacan: hongos de géneros como *Trichoderma sp.*, *Beauveria sp.*, *Glomus sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.* y *Metarhizium anisopliae*; bacterias como *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Azotobacter spp.*, *Azospirillum spp.*, *Rhizobium spp.* y otras especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus sp.*, *Pichia sp.*, *Pseudozyma sp.* y *Candida sp.*<sup>56</sup>.

##### **5.4.2. Bacillus**

Bacterias del filo firmicute, clase Bacili, orden Bacillales y familia Bacillace<sup>57</sup>; son bacilos Gram positivos, aerobios o aerobios facultativos con movilidad flagelar, presenta un amplio rango de temperatura para su crecimiento (mayoría mesófilas 30-45°C), su diversidad metabólica está asociada a la promoción de crecimiento,

control de patógenos y además es capaz de producir endosporas como mecanismos de diseminación y resistencia a factores externos como la desecación, la radiación solar y las altas temperaturas, entre otros. Esto hace que las endosporas sean una alternativa promisoría para la aplicación comercial, por otro lado, los productos generados de esta forma pueden permanecer estables durante largos periodos de tiempo<sup>14,16,57,58</sup>.

Este género bacteriano tiene la capacidad de producir gran variedad de antibióticos para inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre ellos unos de los más estudiados son los lipopéptidos cíclicos no ribosomales, los cuales son clasificados en tres diferentes familias: iturinas, fengicinas y surfactinas<sup>58</sup>, la actividad de estos, tiene lugar en la membrana citoplasmática de células bacterianas y fúngicas, donde provocan la formación de poros y un desbalance osmótico llevando a la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos<sup>59</sup>; en relación a *B. cinérea* se ha demostrado la presencia de fengicina A por parte de *B. velezensis* en plantas de tomate<sup>59</sup>. Además, los lipopéptidos favorecen el establecimiento de la bacteria por medio de la regulación de procesos celulares como motilidad y por la formación de biopelículas<sup>58, 59</sup>.

Para evitar el establecimiento de fitopatógenos este género bacteriano tiene la capacidad de producir y excretar antibióticos, toxinas, lipopéptidos, enzimas líticas, entre otros, y algunas especies tienen la capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas<sup>16,57</sup>.

### **5.5. Normatividad bioinsumos en Colombia**

En Colombia el ente que regula la producción, almacenamiento y comercialización de bioinsumos de uso agrícola es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). En el año 2004, por medio de la resolución 375 dicta las “disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia”<sup>60</sup>, en este documento se establecen las condiciones del productor para efectuar su registro ante el ICA para ser reconocido como productor de bioinsumos agrícolas, además se describen sus obligaciones, al igual que el registro y obligaciones del importador, además de los registros para ensayos de eficacia y de comercialización del producto. En el año 2006, por medio de la resolución 187 “se adopta el

Reglamento para la producción primaria, procesamiento, empaçado, etiquetado, almacenamiento, certificación, importación, comercialización, y se establece el Sistema de Control de Productos Agropecuarios Ecológicos”<sup>61</sup>. Por último en el año 2011, el 4 de febrero se publica la resolución 698, “Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones”, en esta además de determinar los requisitos que deben cumplir los productores e importadores para su registro y el del producto ante el ICA, para este último se debe presentar el informe final del ensayo de eficacia y las recomendaciones de uso, además se establecen los tramites para poder llevar a cabo los ensayos de eficacia y las condiciones que debe cumplir<sup>62</sup>.

### **5.6. Formulaciones en control biológico**

De acuerdo con el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), “formulación se refiere al proceso donde se mezclan o combinan diferentes ingredientes, sustancias, materias primas biológicas o bioquímicas, para finalmente elaborar bioinsumos de uso agrícola”<sup>62</sup>; su objetivo es lograr una correcta combinación de elementos de tal forma que por medio de la adición de excipientes se genere un bioinsumo estable, efectivo, seguro, económico de producir, de fácil aplicación y aceptable para su USO<sup>15,55,62</sup>.

Para que una formulación sea óptima y eficiente, debe cumplir con algunas condiciones entre las que se encuentran: producción económica, fácil distribución en el entorno, estabilidad biológica y física del producto, vida útil a largo plazo, fácil rehidratación, la relación actividad-viabilidad debe mantenerse durante todos los pasos de la formulación, almacenamiento a largo plazo, mejorar características físicas y químicas del producto para su aplicación y estabilidad, como aumentar la capacidad de resistencia a cambios drásticos en la filosofía y mejorar la supervivencia bajo condiciones micro climáticas desfavorables; además se debe garantizar su valor comercial<sup>51,63,64</sup>.

### **5.6.1. Funciones**

Según Jones et al.1998<sup>63</sup> hay cuatro funciones básicas, entre las cuales están: la estabilización del organismo durante la producción, distribución y almacenamiento; facilitar el manejo y aplicación del producto; proteger el agente de factores ambientales dañinos; y mejorar la actividad del organismo al aumentar su actividad, reproducción, contacto e interacción con la plaga u organismo objetivo<sup>65</sup>.

### **5.6.2. Tipos de formulación**

Las formulaciones de microorganismos se pueden dividir en dos grandes grupos, sólidos secos y líquidos.

En las formulaciones líquidas, el vehículo que transporta al ingrediente activo consta de una sustancia líquida que permite su fácil dispersión y aplicación, generalmente es agua o aceite que mantienen al ingrediente activo suspendido en conjunto con un dispersante que permite la desintegración de agregados; en las emulsiones el ingrediente activo está suspendido en una sustancia oleosa junto con diversos aditivos y una sustancia emulsificante, estos favorecen a que se disminuya la sedimentación de las partículas durante el almacenamiento, por último hay unas formulaciones líquidas más especializadas, las microcápsulas, que protegen al ingrediente activo de factores ambientales por medio de la encapsulación en materiales como la celulosa, gelatina y polimeros<sup>65,66</sup>.

Por otro lado, las formulaciones sólidas están compuestas de polvos, gránulos y briquetas, esta clasificación se basa en el tamaño de la partícula o agregados, también están incluidos los polvos humectables, constan de polvo seco al cual se le debe agregar un vehículo líquido antes de su aplicación.

### **5.6.3. Formulaciones sólidas**

Los polvos están basados en diluyentes inertes, donde minerales como la arcilla es la primera opción, su capacidad de absorción es baja y el tamaño de las partículas están entre 5.0-20mm, la proporción del principio activo en peso es <10%. Aspectos como el tamaño de la partícula, la densidad entre 320-800 Kg/m<sup>3</sup> y la fluidez son muy importantes a la hora de desarrollar un prototipo de formulación en polvo, pero usualmente solo el 10% de las partículas se adhiere a la superficie de acción<sup>65</sup>. La presentación de gránulos se caracteriza por ser masas discretas entre 5.010mm<sup>3</sup>,

al igual que los polvos, el vehículo que sostiene al microorganismo es inerte, entre estos vehículos se incluyen minerales de arcilla, polímeros de almidón, fertilizantes secos y residuos de plantas molidas. La concentración del organismo es entre el 5.0-20%, generalmente el 15%<sup>65</sup>.

En cuanto a los polvos humectables, son los que predominan en el mercado, son mezclados con aditivos para hacerlos estables durante el almacenamiento y fácil disolución en agua previo a su uso, las proporciones de los componentes en peso son: 50-80% polvo técnico, 1.0-10% dispersante, 3.0-5.0% de surfactante<sup>65</sup>.

#### **5.6.4. Liofilización**

Este es una de las presentaciones de los polvos humectables, hace referencia al proceso de estabilización y conservación, donde se produce la deshidratación al vacío de suspensiones líquidas; se divide en tres etapas, la primera denominada congelación, donde se garantiza que el producto está completamente congelado, para que, en la segunda fase se retire el agua por sublimación y finalmente en la desorción se remueve el agua que quedo ligada, impidiendo el crecimiento bacteriano o reacciones químicas<sup>67</sup>. Al finalizar se obtiene un producto soluble estable, activo y seco.

#### **5.6.5. Excipientes**

Tienen la función de mejorar o modificar la acción del ingrediente activo y a su vez ser inertes frente a los microorganismos y a las plagas<sup>46</sup>. Pueden ser vehículos (líquidos o sólidos) y/o coadyuvantes que pueden mejorar las propiedades químicas, físicas o nutricionales de la biomasa formulada; en general están diseñados para mitigar el efecto nocivo de algunos factores que influyen en la acción del antagonista, entre las que se encuentran, luz ultravioleta, la temperatura, humedad, exudados superficiales de la hoja y otros competidores microbianos saprofitos<sup>17,51,63</sup>.

Para el caso de los liofilizados, uno de los excipientes que se debe tener en cuenta son los crioprotectores, los cuales protegerán el ingrediente activo del estrés al que es sometido al congelarlo y posteriormente retirarle el agua por sublimación. Los crioprotectores que con mayor frecuencia se utilizan son el glicerol, Me<sub>2</sub>SO, leche

descremada y sacarosa entre otros, aunque para bacterias el mas utilizado es la leche descremada<sup>68</sup>.

## **6. DISEÑO METODOLOGICO**

El presente trabajo se desarrolló en fases secuenciales, que permitieron generar y posteriormente evaluar en el tiempo, un prototipo de formulación sólido cuyo ingrediente activo consta de una cepa del género *Bacillus sp.* seleccionada previamente por el grupo de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por su actividad antagónica contra *B. cinera* en rosas.

La cepa usada fue IM2C6, identificada como *Bacillus velezensis*, pertenece al cepario del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN).

La metodología en su totalidad se desarrolló de acuerdo con los protocolos del Laboratorio de Microbiología Agrícola del IBUN.

### **6.1. UNIVERSO, POBLACION, MUESTRA**

Universo: Cultivos de flores

Población: Rosas

Muestra: Rosas de corte para exportación en Colombia.

### **6.2. HIPOTESIS**

El proceso de liofilización mantiene la estabilidad de formulación a base de la cepa IBUN IM2C6 en términos de viabilidad, pureza y actividad antagónica contra *B cinerea* a temperatura ambiente. Haciendo de la liofilización una técnica promisoría para formulaciones sólidas.

### **6.3. VARIABLES INDEPENDIENTES**

- Mal manejo de las muestras.
- Realización inadecuada del montaje de los ensayos.
- Mal funcionamiento de los equipos.
- Lectura/interpretación inadecuada de los resultados.

### **6.4. VARIABLES DEPENDIENTES**

- Equipo de liofilizador utilizado.
- Envase de almacenamiento utilizado.

- Conservación de los prototipos.
- Preparación de medios de cultivo.
- Esterilización de utensilios y sitio de trabajo.
- Cabina de flujo para el desarrollo de las actividades.

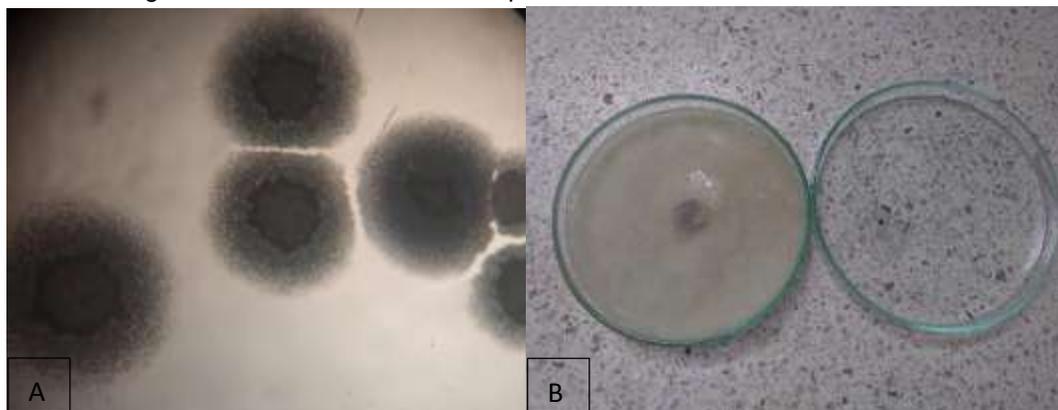
## 6.5. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

### 6.5.1. Primera fase: Diseño del prototipo de formulación

#### 6.5.1.1. Activación de la cepa biocontroladora y del patógeno.

La cepa IBUN IM2C6 se obtuvo del Cepario del Laboratorio de Microbiología Agrícola del IBUN. Se activa la cepa IBUN IM2C6 en Agar Trypticase Soya (TSA) de un criovial almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se deja incubando por 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  (figura 5. A). Para activar el hongo, se toma un cuadro de papel filtro impregnado con las esporas de *B. cinerea* almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$  del banco de esta cepa fúngica, para después disponerlo sobre Agar Papa Dextrosa (PDA), luego se cubre la caja de Petri con papel aluminio y se incuba a temperatura ambiente por 5 días (Figura 5. B).

Figura 5: A Colonia IM2C6. B Cepa de *B. cinerea* activada. Fuente: Autora 2019.



#### 6.5.1.2. Producción de Biomasa IM2C6

Se utilizó el Medio de esporulación (ESP): 3.0 g/L glucosa, 0.08 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.12 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.028 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6.8 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.002 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.014 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 7.0 g/L Triptona. Inicialmente se deja un preinoculo en medio ESP, esto, tomando una colonia de IM2C6 proveniente de un cultivo fresco en medio TSA y depositándola en un tubo de centrifuga tipo Falcon® de 50 mL de capacidad con 5.0 mL de medio; el medio inoculado se deja en incubación por 12 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación constante a 150 rpm; luego se inoculan

los erlemeyers con él pre-inoculo en un volumen efectivo del medio ESP de 13% para dejarlos en agitación constante a 150 rpm y 30°C durante 96 horas.

#### **6.5.1.3. Selección de la concentración y proporción de crioprotectante**

Se evaluaron como crioprotectantes la leche descremada en polvo (LD) y sacarosa (Sac), se tomó como control la producción final de biomasa de 96 horas de fermentación diluido 1:2 con agua destilada estéril y sin diluir. Para hacer las mezclas del producto de fermentación y los crioprotectores, primero se realizaron soluciones de LD al 24% y Sac al 20%, se pasteurizaron, una vez listas, se realizó la mezcla en proporción 1:1 del producto de fermentación y el crioprotector, para obtener concentraciones finales de 12% y 10% de LD y Sac respectivamente. Una vez listas todas las mezclas se mide una alícuota para posteriormente liofilizar. Se hicieron ensayos de viabilidad por medio de conteo en placa metodología diluciones seriadas sembradas en forma de gota y actividad mediante el uso de discos de papel filtro impregnados con las diferentes suspensiones de la cepa IM2C6 antes y después de liofilizar.

#### **6.5.1.4. Liofilización**

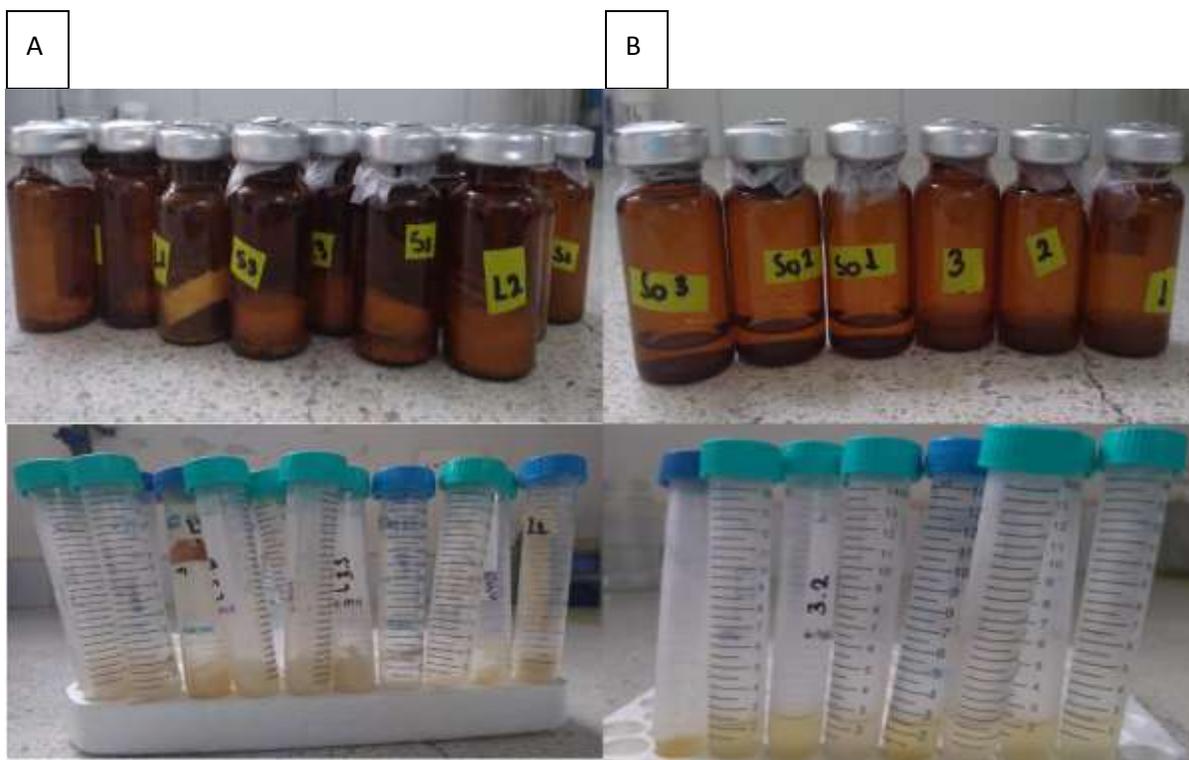
Luego de tener el producto de la fermentación y las mezclas con los crioprotectantes, se toman alícuotas de un volumen de 2.5 mL cada una, que posteriormente son dispensados en frascos de vidrio color ámbar o tubos de centrifuga tipo Falcón® de 15mL de capacidad; los tubos así preparados se cubrieron con Parafilm sobre la boca del frasco y fueron llevadas a congelación por 24 horas a -80°C, transcurrido este tiempo, las muestras son trasladadas al liofilizador a -50°, 0.125 mBar por 24 horas. Finalmente, se almacenan a temperatura ambiente durante el tiempo de evaluación, que consistió en 2 meses a temperatura ambiente de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 6. A).

Para su reconstitución (Figura 6.B), se le agregó el mismo volumen de agua destilada estéril que el depositado inicialmente de la fermentación y/o tratamientos (2,5mL).

Figura 6: Liofilizados. A antes de resuspender. B resuspendidos. Fuente Autora 2019

### 6.5.1.5. Evaluación de la viabilidad y pureza

Una vez se tiene el producto de fermentación y/o el producto liofilizado resuspendido, se procede a realizar ensayos de viabilidad y pureza, para esto, se realizan diluciones seriadas en base 10 de las muestras a evaluar y se realiza conteo en placa, por la metodología de gotas. En esta metodología se toman las últimas 4 diluciones y se siembran gotas de 20µL por triplicado de cada dilución, se incuban a 30° C por 24 horas, luego se analiza su morfología y determina la pureza según las colonias observadas, realiza el recuento de colonias en cada dilución y finalmente se aplica la siguiente fórmula para conocer el recuento de unidades formadoras de colonia en un mililitro de muestra.



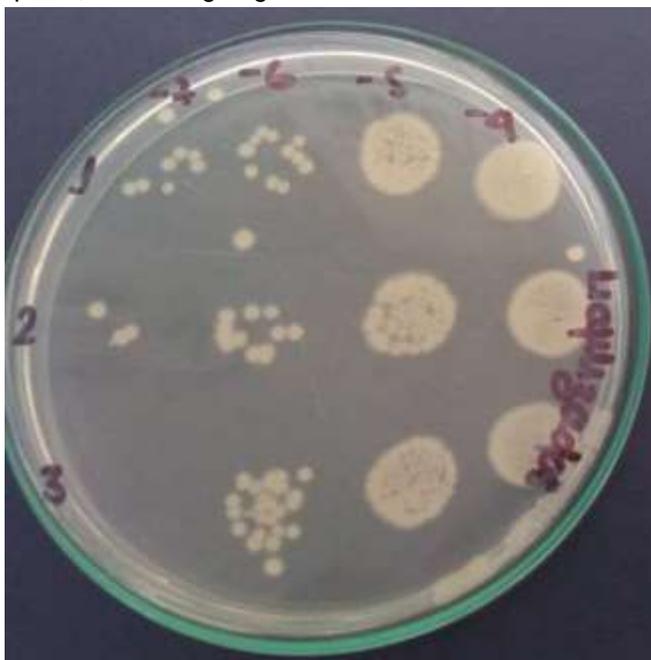
$$\text{Recuento de colonias en 1mL} = \frac{\# \text{ de colonias} * \text{Factor de dilución} * 1000\mu\text{L}}{20\mu\text{L}(\text{volumen sembrado})}$$

Para efectos de las suspensiones se evaluaron las diluciones a sembrar son  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  (Figura 7).

En los ensayos de viabilidad de la curva de crecimiento de la cepa, se hicieron recuentos celulares diferenciando entre células vegetativas y células esporuladas,

para estas últimas, la muestra fue sometida a temperaturas altas para eliminar las células vegetativas y así poder hacer el recuento únicamente de las células esporuladas, para esto se calentó la muestra a 80°C por 10 minutos, luego de esto se realizaron las diluciones seriadas y posteriormente se hizo el montaje del recuento celular en la metodología de gota.

Figura 7: Recuento en placa, metodología: gotas. Fuente autora 2019



#### 6.5.1.6. Evaluación de Antagonismo *in vitro*

Una vez se tiene el producto de fermentación y/o el producto liofilizado resuspendido, se procede a realizar ensayos de actividad, enfrentando la biomasa producida con el fitopatógeno *B. cinerea*, el procedimiento se realiza conforme a lo establecido en protocolo de “antagonismo *in vitro* contra hongos patógenos” del laboratorio de Microbiología agrícola. El cual establece colocar un plug de agar con micelio del hongo en el centro de una caja con agar PDA, luego disponga de círculos de papel filtro estériles equidistantes entre sí y entre el plug, posteriormente se siembran las muestras a evaluar (20µL) sobre el papel filtro y se deja un control con solución salina estéril, finalmente se cubre la caja con papel aluminio y se deja incubando por 5 días (Figura 8).

En la curva de crecimiento se evaluaron todas las muestras recolectadas en los tiempos estipulados de muestreo. En los ensayos de crioprotectores, se evaluaron

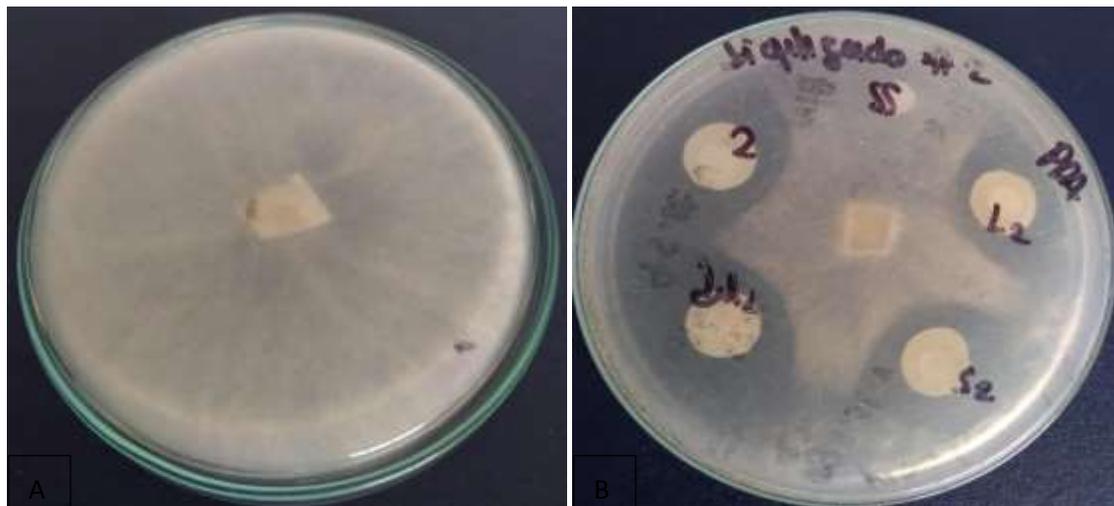
las muestras de cada tratamiento antes y después de liofilizar, además de esterilizada. Finalmente, en la evaluación de los prototipos se evaluaron al momento de resuspender en la dilución 1/10 y 1/100.

Figura 8: Actividad antagónica. A control de *B. cinerea*. B actividad de IM2C6 frente a *B. cinerea*.

Fuente

autora

2019



### 6.5.2. Segunda fase: selección de los excipientes

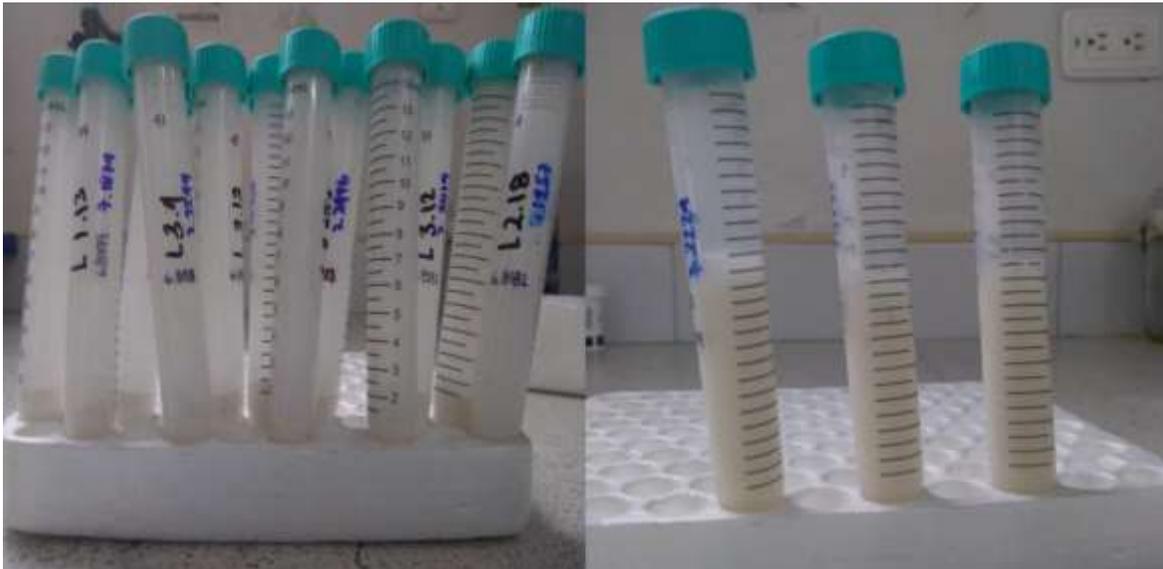
Los excipientes usados fueron seleccionados conforme a la bibliografía consultada, estos fueron los más promisorios para la formulación por su desempeño en otras formulaciones y por su costo, entre ellos se incluyen carrier o vehículo, dispersante, adherente y estabilizante.

**6.5.2.1. Selección concentración y proporción de los excipientes** Los compuestos usados fueron: Talco chino como carrier<sup>14,20,23,25</sup>, carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) como estabilizante<sup>14,18,28,34</sup> y Carboximetilcelulosa (CMC)<sup>14,18,23,25</sup> de alta densidad como adherente y dispersante, además se probaron 3 azúcares<sup>20</sup> glucosa<sup>14,24</sup>, sacarosa<sup>12,16</sup> y sorbitol, para determinar si la viabilidad mejoraba; todos estos compuestos se seleccionaron teniendo en cuenta la bibliografía consultada al igual que sus concentraciones.

Una vez definidos los componentes a utilizar, se dispensó una cantidad considerable con respecto a la necesitada y se esterilizó cada compuesto por separado, cuando estuvieron estériles, se hizo la mezcla para cada prototipo y finalmente se pesó y dispensó en los tubos de centrifuga tipo Falcon® con el liofilizado, manteniendo las proporciones de cada excipiente y del ingrediente activo.

### 6.5.3. Tercera fase: Evaluación de la viabilidad celular y capacidad biocontroladora del prototipo

Una vez se tiene el prototipo de formulación se evaluó su viabilidad y actividad *in vitro*, siguiendo las mismas metodologías usadas en la primera fase. Para esto, se reconstituyó cada tubo de centrifuga tipo Falcon® (Figura 9) correspondiente a cada una de las tres réplicas con las que cuentan los diferentes prototipos, se agregó 9.0 mL de agua destilada estéril con el fin de que los prototipos partieran de una dilución 1/10, de aquí se realizó otra dilución en base 10 para obtener una muestra diluida 1/100 para llevar a cabo la actividad de estas dos diluciones y por otro lado hacer el recuento de unidades formadoras de colonia de cada prototipo.



A

B

Figura 9: Prototipos de formulación. A antes de resuspender. B resuspendidos. Fuente: Autora 2019

### 6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de datos se realizó una valoración de supuestos (normalidad, homocedasticidad) mediante las pruebas de Shapiro Wilk, Bartlett. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% usando la prueba de Tukey para la separación de medias en los casos donde se presentaron diferencias significativas usando el programa estadístico R studio versión 3.6.1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Primera fase: diseño del prototipo de evaluación

Esta fase tuvo como objetivo corroborar y reproducir datos de cinética de crecimiento y producción de biomasa de la cepa IBUN IM2C6, seleccionada previamente por Piraquive en el 2019 por su capacidad antagónica<sup>47</sup>, esto se llevó a cabo en procesos de producción de biomasa tras 120 horas de incubación (figura 10).

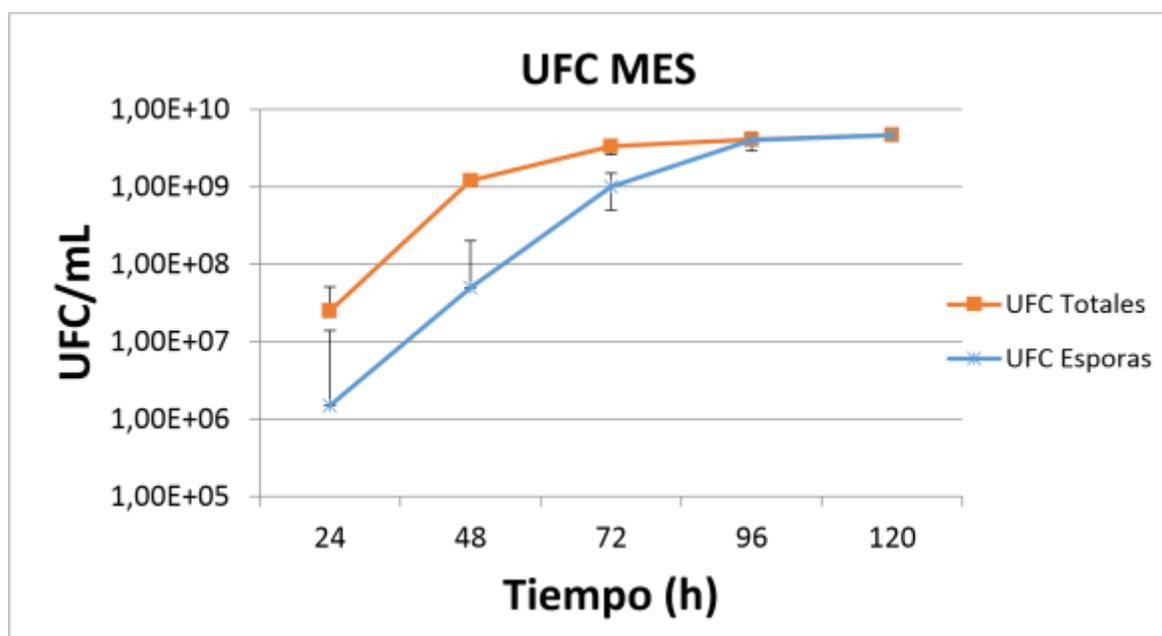
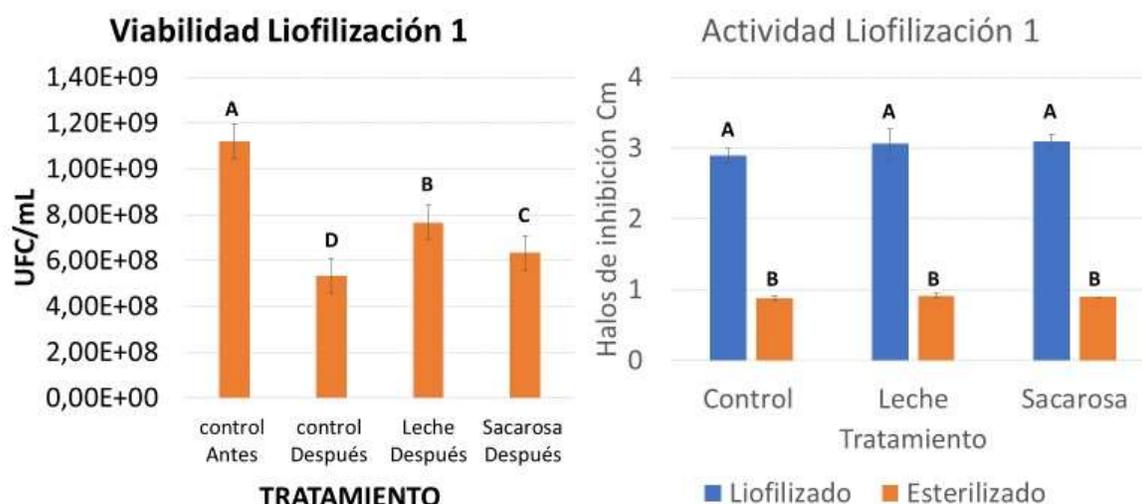


Figura 10: curva de crecimiento IBUN IM2C6 en medio ESP por 120 horas, se realizó recuento de células vegetativas y células esporuladas a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación.

En condiciones *in vitro* se reprodujo y confirmó lo reportado por Piraquive en el 2019, acerca de la producción de biomasa de la cepa IBUN IM2C6, permitiendo identificar que el tiempo en el que se alcanza igualdad entre el número de unidades formadoras de colonia y esporas es a las 96 horas, alcanzando una producción de  $4.08 \times 10^9$  UFC/mL de células vegetativas y  $4.0 \times 10^9$  UFC/mL de células esporuladas. A lo largo de las mediciones en el tiempo se observó que el cultivo se mantuvo puro, al evidenciar únicamente colonias con la morfología correspondiente a la de la cepa IM2C6 en las diferentes diluciones del conteo en placa. No se observó diferencia en

la actividad antagonica, entre las mediciones de las 96 y 120 horas. Determinando así, que el tiempo mínimo de incubación que se debe dejar para que el rendimiento de la cepa sea el óptimo para formular.

Una vez se definió el tiempo final óptimo para la producción de biomasa, se llevaron a cabo tres repeticiones en el tiempo, donde se evaluó el uso de crioprotectores, para esto se tomó la biomasa (esporas) de una fermentación de 96 horas y luego fue sometida al proceso de liofilización, para su evaluación se tuvo en cuenta la viabilidad celular y el antagonismo de la cepa frente al fitopatógeno *Botrytis cinerea* (figura 11), antes y después de liofilizar.



**Figura 11: Viabilidad y actividad de la primera repetición en el tiempo.** Se evaluó la viabilidad de la biomasa esporulada de la cepa IM2C6, donde el control hace referencia a la biomasa sin tratamiento crioprotector antes y después de liofilizar, a su vez se evaluaron los tratamientos con leche descremada en polvo (LD) y sacarosa (Sac) como crioprotectores. En el ensayo de actividad, fue evaluada la capacidad antagonica de las mismas suspensiones celulares evaluadas en la viabilidad, frente a *B. cinerea*. Diferentes letras mayúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Con esta primera repetición se observó que hay un efecto positivo en la viabilidad de la bacteria cuando se utilizan crioprotectores como la leche descremada en polvo y la sacarosa cuando se lleva a cabo el proceso de liofilización, esto comparado cuando no se utiliza ningún tratamiento. La pérdida de viabilidad que se evidenció tras el proceso de liofilización para los tratamientos control (sin criopreservante),

leche descremada en polvo y sacarosa, fueron de 52,24%, 31,34% y 43,28% respectivamente, destacándose la leche descremada como un crioprotector promisorio para la formulación, pues fue el que menor pérdida de viabilidad presentó. La pureza de los tratamientos se confirmó al presentar en las diferentes diluciones del conteo en placa, colonias con morfología correspondiente únicamente a la de la cepa IM2C6. Por otro lado, no se evidenció diferencias en la actividad antagonista en presencia o ausencia de crioprotectores, pero si se observa una pérdida de actividad cuando se esterilizan previamente los productos liofilizados, indicando que al menos algunos metabolitos secundarios producidos son denaturados bajo las condiciones de esterilización, aunque no se presentan diferencias entre los tratamientos.

En la segunda repetición en el tiempo (Figura 12), se agregó un tratamiento a los evaluados previamente, en este ensayo, se evaluaron como el control la biomasa de la cepa IBUN IM2C6, los tratamientos con crioprotectores, y un tratamiento adicional el cual constó de una dilución 1/2 de la biomasa con agua destilada estéril, para tener una comparación real de la pérdida de viabilidad de la biomasa cuando esta diluida igual que con los crioprotectores. La finalidad de esta repetición en el tiempo es confirmar los datos obtenidos en la primera liofilización y así detectar si el uso de crioprotectores es una alternativa promisorio para la formulación.

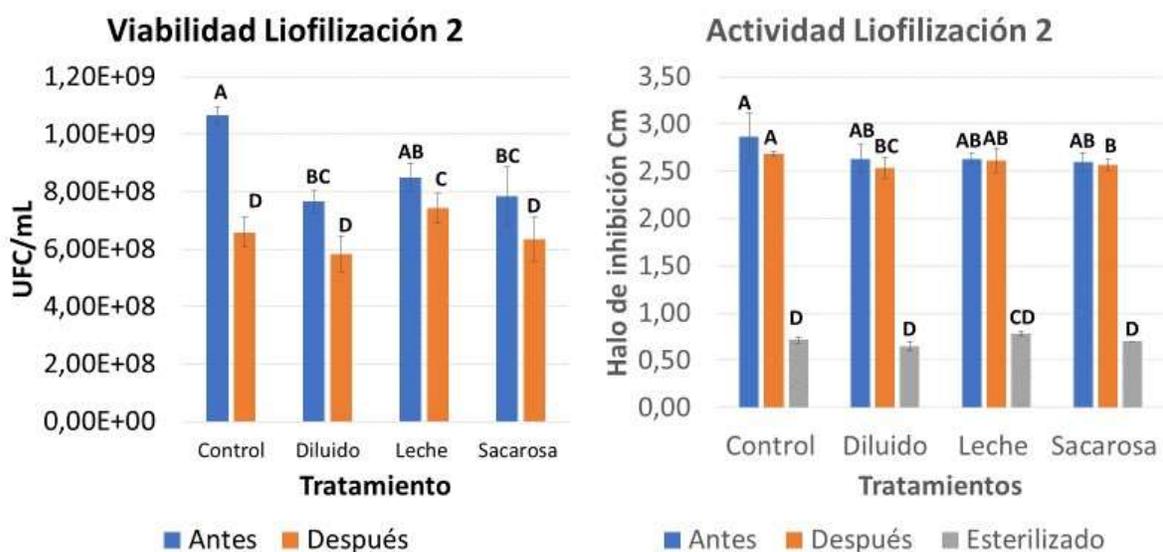


Figura 12: Viabilidad y actividad de la segunda repetición. Se evaluó como control la biomasa de la cepa IM2C6, los tratamientos con crioprotectores LD, Sac y la biomasa diluida (Dil), el diluido y los tratamientos con crioprotectores están en proporción 1:1 con la biomasa esporulada. En la viabilidad, el control antes de liofilizar presenta recuentos celulares significativamente más alto debido a que la suspensión no está diluida y hace referencia al recuento final de células esporuladas tras 96 horas de fermentación en medio ESP. En el ensayo de actividad se evaluó el control y los tres tratamientos antes y después de liofilizar, adicionalmente se evaluó la actividad luego de esterilizar las muestras procesadas, para evidenciar si la actividad se mantenía tras este proceso, si es así, indicaría que la actividad antagónica es producida por moléculas termoestables. Diferentes letras mayúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Se observó que el tratamiento con leche descremada se destacó nuevamente entre los demás por tener el menor porcentaje de pérdida de viabilidad luego de la liofilización, siendo de 12.74%, seguido por la sacarosa con 19,14%, la biomasa esporulada diluida con 23,91% y por último el control, es decir, la biomasa esporulada con 38.28%. La pureza de los diferentes tratamientos se confirmó al presentar en las diferentes diluciones del conteo en placa, colonias con morfología correspondiente únicamente a la de la cepa IM2C6. En cuanto a las actividades antagónicas se confirmó que al esterilizar se perdía hasta un 74% de la actividad, mientras que cuando se liofiliza la pérdida es máximo del 6.0%.

La última evaluación en el tiempo se llevó a cabo con la finalidad de corroborar los datos obtenidos en las evaluaciones previas, así mismo se tomó como base la producción de biomasa para los prototipos de formulación (Figura 13). Al igual que en las evaluaciones anteriores se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular y actividad antagónica (Figura 14) frente a *B. cinerea* tanto antes como después de liofilizar.

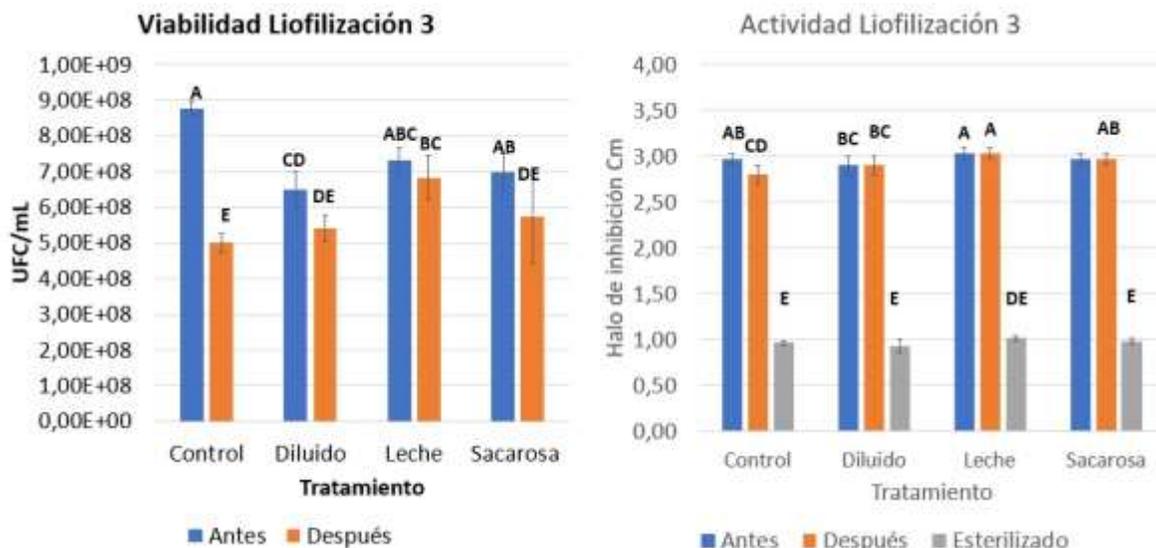


Figura 13: Viabilidad y actividad de la tercera repetición, se evaluó como control la biomasa de IM2C6, LD, Saca y diluido (Dil). En la viabilidad, el control antes de liofilizar es significativamente más alto debido a que la suspensión no está diluida y su recuento hace referencia al recuento final de células esporuladas tras 96 horas de fermentación en medio ESP. En el ensayo de actividad se evaluó el control y los tres tratamientos antes y después de liofilizar, adicionalmente se evaluó la actividad luego de esterilizar las muestras procesadas, para evidenciar si la actividad se mantenía tras este proceso, indicando si la actividad antagónica es producida por moléculas termoestables. Diferentes letras mayúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

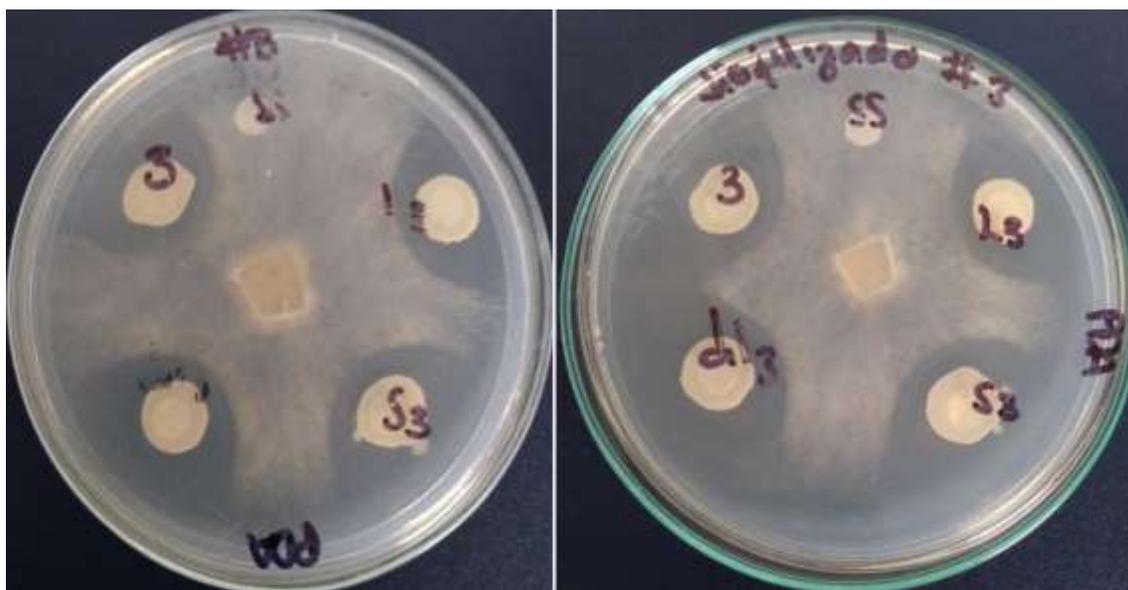


Figura 14: Liofilización 3. A. Actividad antes de liofilizar. B. actividad después de liofilizar. Fueron evaluados los 4 tratamientos, el número 3 indica el control, es decir la suspensión de biomasa esporulada; Dil, hace referencia a la suspensión diluida con agua destilada; S se refiere al tratamiento con sacarosa y L al

tratamiento con leche descremada en polvo. El control de esta prueba es un disco con solución salina estéril. Fuente: Autora 2019.

En esta tercera evaluación, la pérdida de viabilidad se redujo en comparación con los ensayos anteriores, donde los resultados obtenidos fueron, pérdida del 6.6% cuando se utilizó leche descremada en polvo, mientras que cuando no se usó crioprotector fue de 42.9%, o cuando se usó la sacarosa y la biomasa diluida la pérdida de viabilidad fue del 16 y 17% respectivamente. La pureza de los diferentes tratamientos se confirmó al presentar en las diferentes diluciones del conteo en placa, colonias con morfología correspondiente únicamente a la de la cepa IM2C6. En la actividad, al liofilizar la pérdida máxima fue de 6.0%, además se confirmó que al esterilizar la pérdida de la actividad superaba el 65%, pero esa actividad generada indica que hay metabolitos del ingrediente activo IM2C6 son termoestables e intervienen en la actividad antagónica frente a *B. cinera*; en los tres ensayos de actividad antagónica se demostró que los diferentes tratamientos no afectan la actividad.

Las evaluaciones realizadas de las diferentes repeticiones en el tiempo confirmaron que el uso de crioprotectante tiene un efecto positivo en la estabilidad del liofilizado, pues su índice de pérdida de viabilidad es significativamente menor que en el control. Para efectos de la formulación, los resultados obtenidos indican que, de los evaluados, el mejor tratamiento en cuanto a la criopreservación es la leche descremada, convirtiéndola en el crioprotector electo del prototipo de formulación.

Con estos ensayos se determinó que el mejor crioprotectante para la cepa IBUN IM2C6 de los evaluados fue la leche descremada en polvo, presentando la menor pérdida de viabilidad.

## **7.2. SEGUNDA FASE: SELECCIÓN DE LOS EXCIPIENTES**

De los diferentes excipientes tenidos en cuenta, para proceder a hacer el prototipo de formulación luego del proceso de liofilización, se seleccionaron el talco chino, la carboximetil celulosa de alta densidad, el carbonato de calcio y adicionalmente se

evaluaron 3 azúcares: glucosa, sacarosa y sorbitol. El peso seco de cada prototipo fue de 1.0 gramo, el contenido de cada prototipo se evidencia en la tabla 1.

Los prototipos que se obtuvieron fueron los siguientes:

Tabla 1 contenido de mezcla de los prototipos

Prototipo	Esporas liofilizadas 30% +Talco 67,9-68,9%, CMC 0,1%, CaCO <sub>3</sub> 1.0%	Glucosa 1.0%	Sacarosa 1.0%	Sorbitol 1.0%
1	✓			
2	✓	✓		
3	✓		✓	
4	✓			✓

### 7.3. Tercera fase: evaluación de la viabilidad, pureza y capacidad

#### biocontroladora de la formulación

Se evaluaron tres fechas, la primera denominada mes o tiempo 0, corresponde al día en que se mezclaron los componentes y se evaluaron inmediatamente, los otros tiempos de muestreo fueron al mes y a los dos meses de este día inicial. Se evaluó tanto viabilidad como actividad, esta última se evaluó en la dilución 1/10 y 1/100 (Figura 15).

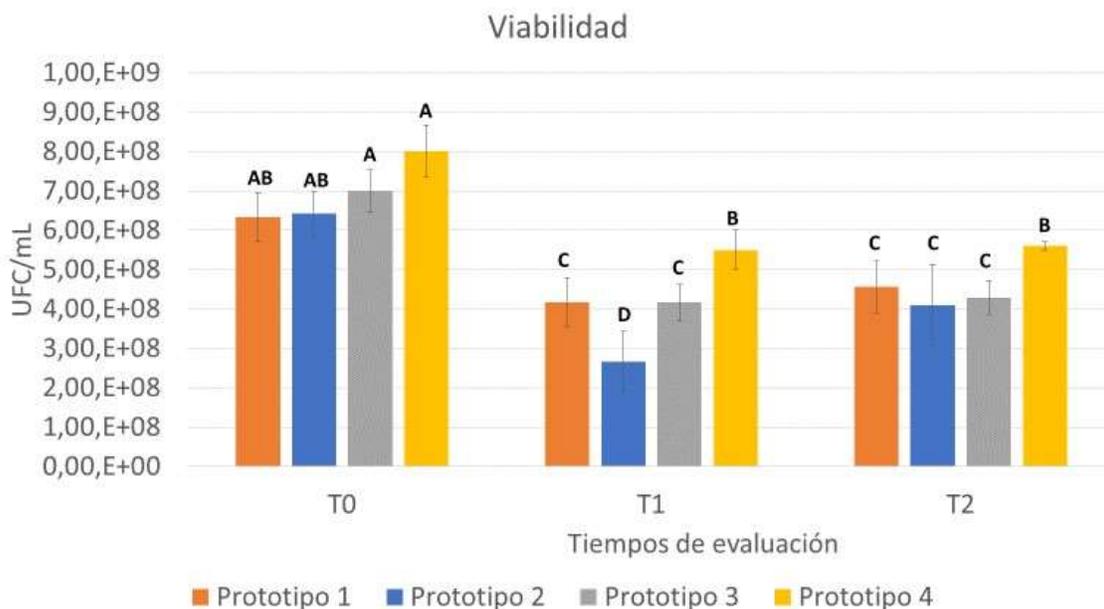


Figura 15: Viabilidad de prototipos de formulación almacenados a temperatura ambiente y evaluados a diferentes tiempos. Los prototipos están compuestos por: 1. Esporas liofilizadas (EspL) 30% +Talco 68,9%, CMC 0,1%, CaCO<sub>3</sub> 1.0%, este prototipo es tomado como control para determinar la influencia de la adición de azúcares en los otros prototipos. 2 EspL 30% +Talco 67,9, CMC 0,1%, CaCO<sub>3</sub> 1.0% + Glucosa 1.0%. 3 EspL 30% +Talco 67,9, CMC 0,1%, CaCO<sub>3</sub> 1.0% + sacarosa 1.0% y el 4 EspL 30% +Talco 67,9, CMC 0,1%, CaCO<sub>3</sub> 1.0% + sorbitol 1.0%. Los tiempos de evaluación fueron T0 = tiempo inicial cuando se formuló, T1= al mes de formular y T3= a los 2 meses de formular. Diferentes letras mayúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p<0.05).

El prototipo de formulación número cuatro se destacó por presentar la viabilidad significativamente más alta en los tres tiempos evaluados, en comparación con los otros prototipos; los prototipos uno y tres presentaron recuentos celulares muy similares entre sí y sin diferencia significativa, por último, el prototipo número 2 presentó los recuentos más bajos de viabilidad, los compuestos y proporciones de cada uno de ellos están en la tabla número 1. En cuanto a la pérdida de viabilidad entre los tres tiempos evaluados, el prototipo número uno tuvo una pérdida de viabilidad entre el 27 y 35%, el número dos fue entre 36 y 58%, el tercero fue entre 38 y 41%, y el cuarto fue entre 30 y 31% siendo este estadísticamente significativo a los otros tratamientos. La pureza de los diferentes prototipos se confirmó al presentar en las diferentes diluciones del conteo en placa, colonias con morfología correspondiente únicamente a la de la cepa IM2C6.

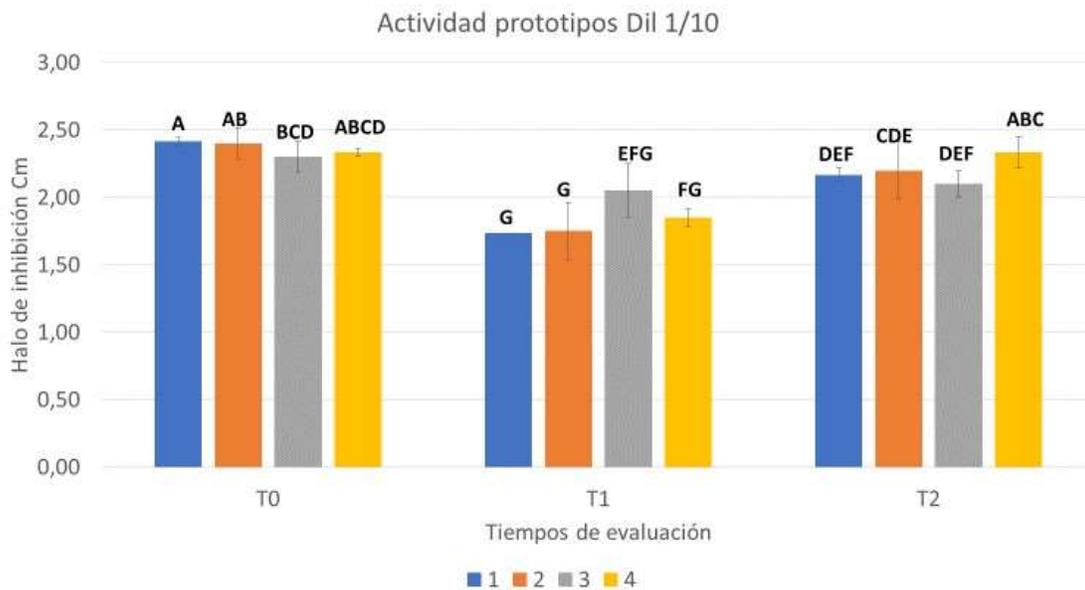


Figura 16: Actividad antagónica de los cuatro prototipos de formulación, de la dilución 1/10 en los tres tiempos de evaluación. Los tiempos corresponden: T0 a mes 0, T1 a un mes después de la formulación y T2 a dos meses después de formular. Las columnas hacen referencia a los cuatro prototipos evaluados. Diferentes letras mayúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

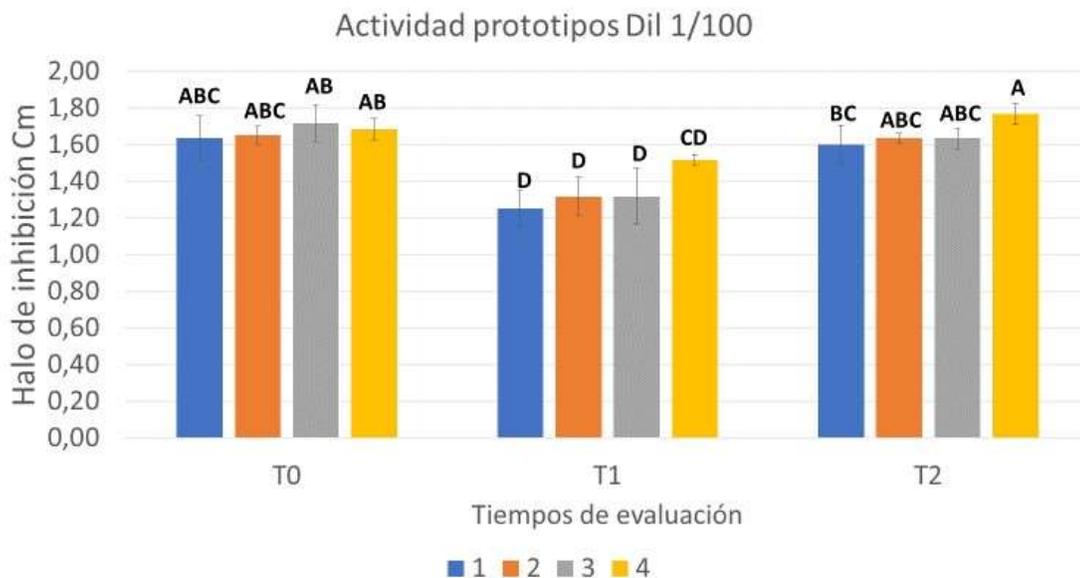


Figura 17: Actividad antagónica de los cuatro prototipos de formulación, de la dilución 1/100 en los tres tiempos de evaluación. Los tiempos corresponden: T0 a mes 0, T1 a un mes después de la

formulación y T2 a dos meses después de formular. Las columnas hacen referencia a los cuatro prototipos evaluados. Diferentes letras mayúsculas en las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

En los ensayos de actividad se observó que había una disminución significativa entre la actividad de la dilución 1/10 y 1/100 de cada uno de los tiempos de medición (Figura 16 y 17), pero entre los prototipos el que mejor actividad presentó a lo largo de las tres mediciones fue el número 4, pero no hubo diferencia con los otros tres prototipos.

En el primer prototipo las pérdidas de actividad entre la dilución 1/10 y 1/100 osciló entre 26 y 36%; en el segundo oscilaron entre 24 y 56%; en el tercero oscilaron entre 22 y 36% y por último en el cuarto prototipo oscilaron entre 18 y 28%, presentando este último las menores pérdidas de actividad entre las dos diluciones evaluadas.

## 8. DISCUSION

Este trabajo partió del hecho de que la cepa bacteriana IBUN IM2C6 presentó potencial biocontrolador frente al fitopatógeno *B. cinerea*, en post cosecha, Piraquive en el 2019 llevó a cabo una formulación líquida de la cepa<sup>47</sup>, pero presentó el inconveniente de requerir cadena de frío para su almacenamiento, pues redujo la pérdida de viabilidad, en comparación de cuando se almacenaba a temperatura ambiente. En este campo se han llevado a cabo diversos trabajos donde han desarrollado formulaciones secas, mayoritariamente granulados, cuyo ingrediente activo consta de cepas fúngicas, levaduriformes y bacterianas esencialmente, empleadas para el control de agentes fitopatógenos de postcosecha. En los prototipos de formulación cuyo principio activo eran especies del género *Bacillus*, fueron utilizados como vehículo gran variedad de compuestos donde se destacaron el talco y diversos tipos de arcillas, que junto con el agente de biocontrol presentaron resultados favorables. Sin embargo, en su gran mayoría las formulaciones realizadas al ser de tipo granuladas tienen mayor probabilidad de perder viabilidad

y a su vez de contaminarse, por lo cual se planteó la idea de realizar un prototipo de formulación de tipo polvo humectable, formulado a partir de la producción de una cepa biocontroladora liofilizada, mezclada con algunos excipientes evaluados en otras formulaciones de tipo polvo humectable, pues específicamente para formulaciones cuyo principio activo se encuentra liofilizado, la información es limitada.

En la primera fase de estudio, al evaluar el comportamiento de la cepa IBUN IM2C6, en una curva de crecimiento de 120 horas, se corroboró lo dicho por Piraquive en el 2019<sup>65</sup>, donde evidenció que la máxima producción de la cepa no supera los  $8 \times 10^9$  UFC/mL, y que además presenta antagonismo frente al hongo *B. cinera*. En este ensayo se pudo demostrar que el tiempo en el cual el microorganismo se encontraba en su máxima producción de células esporuladas, siendo su número igual a las células vegetativas, es a las 96 horas de incubación, con este dato obtenido se logró reducir el tiempo de incubación y a su vez disminuir el costo de producción<sup>69</sup>.

Los datos obtenidos sirvieron de base para la formulación sólida en forma de polvo humectable, la técnica usada fue liofilización, debido a que con esta se reducen las probabilidades de contaminación, comparada con las otras metodologías de formulaciones sólidas, y su estabilidad en el tiempo es buena<sup>67</sup>.

Una vez definido el intervalo de tiempo, se llevaron a cabo los ensayos preliminares de liofilización; de acuerdo con la bibliografía la leche descremada<sup>48,67</sup>, algunos azúcares y el glicerol son los mejores criopreservantes y por estudios previos del grupo de Microbiología Agrícola se sabía que crioprotectores como la leche descremada en polvo y sacarosa eran afines a la cepa IBUN IM2C6<sup>47</sup>, además de la facilidad para su manejo y su accesibilidad comercial, por lo cual se decidió continuar trabajando con estos compuestos.

El uso de crioprotectantes resultó tener un efecto positivo al reducir la pérdida de viabilidad de la cepa tras ser sometida al estrés físico del proceso de liofilización en comparación de cuando no se usaba ningún crioprotectante. Resultados similares han sido reportados por Grauer y colaboradores en el 2015<sup>66</sup>, quienes encontraron que los mejores preservantes eran la leche descremada y la sacarosa, alcanzando

estabilidades superiores al 96%. En el género *Bacillus sp* se han evaluado diferentes crioprotectores donde se destacan la sacarosa, leche descremada y trehalosa principalmente, debido a que forman estructuras porosas que ayudan a la rehidratación y estabilizan a las membranas celulares y a las proteínas<sup>70</sup>. Este proceso permite que tras el proceso de liofilización se logre mantener la viabilidad inicial por lo menos sobre el 80%, además son muy estables por los primeros 4 meses de almacenamiento y hasta por años<sup>66</sup>, según Yanez y colaboradores, las condiciones de almacenamiento no presentan diferencia significativa en la estabilidad de los liofilizado<sup>48,69</sup>.

En la elección de los excipientes basada en la bibliografía consultada de formulaciones secas, cuyo principio activo era alguna de las especies del género *Bacillus sp*<sup>20,22,29</sup>, arrojaron diferentes excipientes usados en cada una de ellas, se eligieron los que presentaron mejores resultados y que además fueran de fácil manipulación y adquisición<sup>14,22,25</sup>, las proporciones de cada excipiente fueron seleccionadas de acuerdo con finalidad y función de cada uno de ellos y de la formulación misma, es decir, se tuvo en cuenta a que producto va dirigida y el modo de aplicación principalmente<sup>20,25</sup>.

Los prototipos evaluados a pesar de que presentaron pérdida de viabilidad representan una alternativa promisoriosa para el control *in vivo* del hongo fitopatógenos pues mantienen su capacidad antagónica a lo largo del tiempo. El prototipo número uno se usó como control de la evaluación del efecto de los diferentes azúcares en términos de viabilidad y actividad, pues según Omer en el 2010, los azúcares actúan como fuente de enriquecimiento para la bacteria lo que ayuda a mantener su viabilidad celular. En las formulaciones secas, uno de los carriers o vehículos más comúnmente evaluados es el Talco, pues al ser un material inerte no interfiere en la viabilidad ni actividad antagónica de la bacteria<sup>20,25</sup>, como estabilizante se escogió el carbonato de calcio<sup>18,22,25</sup> y la carboximetil celulosa se agregó como adherente y estabilizante<sup>25</sup>, la proporción de esta última fue la más baja en comparación con los otros excipientes seleccionados, pues es un adherente potente y si su concentración fuera alta podría dejar residuos en las rosas

provocando un efecto adverso debido a que disminuiría su valor comercial por su aspecto.

Al evaluar los cuatro diferentes prototipos se evidenció que los azúcares si contribuyen en la estabilidad del ingrediente activo a lo largo del tiempo, aunque no todos de igual forma, pues se comprobó que la glucosa generó un impacto negativo, pues contribuyó en la pérdida de viabilidad del prototipo, mientras que la sacarosa y el sorbitol si mantuvieron la viabilidad a lo largo del tiempo de evaluación. El prototipo que presentó diferencia significativa fue el que contenía el sorbitol, postulándolo como promisorio para ensayos in vivo en pétalos de rosas.

Al comparar la formulación desarrollada por Piraquive en el 2019 con la formulación del presente trabajo<sup>47</sup>, teniendo en cuenta que ambas contaron con la cepa IBUN IM2C6 como ingrediente activo, pero la primera fue una formulación líquida y la segunda sólida; se observó que para la formulación líquida es recomendable almacenarla a temperaturas de refrigeración, pues reduce la pérdida de viabilidad con respecto a las que se almacenan a temperatura ambiente<sup>47</sup>. Por tal razón se decidió hacer el prototipo de formulación sólida donde el principio activo estuviera liofilizado y así poder mantener la viabilidad estable, pues al retirar el agua de las células, no se llevan a cabo los diferentes procesos metabólicos, es como si su efecto estuviera latente y se activa cuando se resuspende el liofilizado. Con los resultados de este trabajo se observó que, aunque inicialmente tras el proceso de liofilización la viabilidad se ve afectada de forma significativa, su estabilidad se mantiene a lo largo del tiempo, haciéndola de gran interés para el desarrollo de futuras formulaciones, además cuenta con la capacidad de permanecer estable a temperatura ambiente, siempre y cuando luego de formular se selle adecuadamente el recipiente, para evitar hidrataciones “accidentales” a causa de la humedad relativa. Con esta metodología se podría evitar a los floricultores la cadena de frío, sin mencionar la facilidad de almacenamiento tanto por el volumen que ocuparía como por los equipos necesarios para su manutención y aplicación.

## 9. CONCLUSIONES

- El uso de crioprotectores para la cepa IBUN IM2C6, tiene un impacto positivo al mantener la viabilidad hasta en un 93%, en comparación de cuando no se usa o esta diluida la suspensión celular; permitiendo tener recuentos celulares altos y así tener mayor eficacia al momento de la aplicación en campo, se observó que de los crioprotectores evaluados, el más eficaz fue la leche descremada en polvo que alcanzo recuentos entre  $6.7 \times 10^8$  UFC/mL y  $7.7 \times 10^8$  UFC/mL en las tres repeticiones en el tiempo que se llevaron a cabo, mientras que el control alcanzo recuentos entre  $5 \times 10^8$  UFC/mL y  $6.5 \times 10^8$  UFC/mL.
- El prototipo de formulación número cuatro cuya composición consta de 30% esporas liofilizadas, 67,9% talco, 0,1% CMC, 1.0%  $\text{CaCO}_3$  y 1.0% sorbitol, fue el que presentó mejores tasas de crecimiento y cuya actividad no se vio afectada luego de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente, considerándolo prometedor para llevar a ensayos in vivo y evaluar su actividad biocontroladora en pétalo o en flor.
- Es necesario realizar más pruebas en todas las fases para tener más probabilidad de producir una formulación prometedora para el mercado, que pueda partir de recuentos celulares más altos y sea estable a través del tiempo, para que su almacenamiento sea por periodos prolongados sin afectar sus propiedades iniciales. Por ejemplo, evaluar más crioprotectores o realizar diferentes mezclas de los que se manejaron y evaluar las diferentes proporciones. También es necesario evaluar más excipientes para asegurar que estos no interfieren en desarrollo de la cepa biocontroladora.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ICONTEC. Evaluación de la Conformidad FLORVERDE [Internet]. Icontec.org. 2016 [citado 09 Mar 2019]. disponible en: <https://www.icontec.org/Ser/EvCon/Paginas/TCP/flor.aspx>.

2. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Cadena de Flores. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. Febrero 2019. .[citado 09 Sep 2019]  
Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Flores/Documentos/201902-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
3. PROCOLOMBIA . Flores [Internet]. Procolombia.co. [citado 09 Mar 2019].  
Disponible en: <http://www.procolombia.co/node/1255>.
4. Ministerio de Agricultura. CADENA DE FLORES Y FOLLAJES. 2018 Bogotá D.C.[citado 09 Oct 2018] Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Flores/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/002%20-%20Cifras%20Sectoriales%20-%202018%20Febrero%20Flores.pdf>
5. DANE. Boletín técnico Exportaciones (EXPO) Julio 2018. Bogotá D.C.; 2018. [citado 09 Mar 2019]Disponible en: [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol\\_ex\\_p\\_jul18.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol_ex_p_jul18.pdf)
6. Flórez G., Calderón P. Análisis de beneficios socio-ambientales por la implementación de estrategias de producción más limpias en el sector agropecuario de la cuenca media del río Chinchiná, Colombia. Acta Agronómica.2014: 63(3):193-203 .[citado 09 Oct 2018] Disponible en: [https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/40255/46164](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/40255/46164)
7. Uribe D, Rodríguez A, Sánchez J. GRUPO DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA. La microbiología, al servicio de un desarrollo en términos económicos y ambientales sostenibles. Revista Colombiana de Biotecnología. 2017::63-64.[citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/776/77653191013.pdf>
8. Benito P, Arranz M, Eslava A. Factores de patogenicidad de Botrytis cinerea. Rev Iberoam Micol 2000; 17:43-46 .[citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>
9. Ge B, Liu B, Nwet TT, Zhao W, Shi L, Zhang K. Bacillus methylotrophicus Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. PLoS ONE. 2016;11(11): e0166079. doi:10.1371/journal.pone.0166079

10. Álvarez Romero PI, García Velasco R, Mora Herrera ME, González Díaz JG, Siclán S, Lidya M. Estado actual de *Peronospora sparsa*, causante del Mildiu Velloso en rosa (*Rosa* sp.). *Revista mexicana de fitopatología* 2013;31(2):113-125.
11. Albornoz B, Silva P, Torres M. Fertiriego con silicio en variedades de rosa sobre la severidad de mildío polvoso (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*). *Revista de Ciencias Agrícolas* 2016;33(2):84-94.
12. Lee JP, Lee S, Kim CS, Son JH, Song JH, Lee KY, et al. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological control* 2006;37(3):329-337.
13. Yourman LF, Jeffers SN, Dean RA. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. 2011, *Phytopathology*, 91: 307 - 315.
14. Martínez-Álvarez JC, Castro-Martínez C, Sánchez-Peña P, Gutiérrez-Dorado R, Maldonado-Mendoza IE. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2016;32(5):75.
15. Gotor-Vila A, Usall J, Torres R, Abadias M, Teixidó N. Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. *Biocontrol* 2017;62(4):545-555
16. Kim H, Lee S, Kim C, Lim E, Choi K, Kong H, et al. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *Journal of microbiology and biotechnology* 2007;17(3):438.
17. Schisler DA, Slininger PJ, Behle RW, Jackson MA. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 2004;94(11):1267-1271.
18. Cheng H, Linling LI, Juan H, Honghui Y, Cheng S. A preliminary preparation of endophytic bacteria CE3 wettable powder for biological control of postharvest diseases. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2015;43(1):159-164

19. Revelo J. Efectos ocasionados por la aplicación de triazoles en el cultivo de rosas en el Cantón Espejo, provincia del Carchi [INGENIERO AGRÓNOMO]. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO; 2018. [citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://dspace.utB.edu.ec/bitstream/49000/4352/1/E-UTBFACIAG-ING%20AGRON-000106.pdf>
20. Omer AM. Bioformulations of Bacillus spores for using as biofertilizer. Life Sci J 2010;7(4):124-131.
21. Bautista J, Barbosa H, Uribe D. Prototipo de formulación a base de Rhodotorula mucilaginosa para el control de Botrytis cinerea en Rosas. Revista Colombiana de Biotecnología 2016;18(2):13-23 .[citado 09 Oct 2018] DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomB.biote.v18n2.55826>
22. Chiou AL, Wu WS. Formulation of Bacillus amyloliquefaciens B190 for control of lily grey mould (Botrytis elliptica). J Phytopathol 2003;151(1):13-18
23. Jayaraj J, Radhakrishnan NV, Kannan R, Sakthivel K, Suganya D, Venkatesan S, et al. Development of new formulations of Bacillus subtilis for management of tomato damping-off caused by Pythium aphanidermatum. Biocontrol Sci Technol 2005;15(1):55-65
24. Hang NTT, Oh S, Kim G, Hur J, Koh Y. Bacillus subtilis S1-0210 as a biocontrol agent against Botrytis cinerea in strawberries. The Plant Pathology Journal 2005;21(1):59-63
25. Rangeshwaran R, Vajid NV, Ramanujam B, Sriram S, Bhaskaran TV, Satendar K. Additives in powder based formulation for enhanced shelf life of Pseudomonas fluorescens and Bacillus sp. J Biol Control 2010;24(2):158-163.
26. Cotes M., Zapata J., Diaz A., García M., Medina C., Cristancho D, Uribe D. Selección de levaduras filamentosas con potencial para el control biológico de Botrytis cinerea. FITOPATOLOGÍA COLOMBIANA. 2011:51-56 .[citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://ascolfi.org/archivos/revista%20352.pdf#page=20>
27. Larrea I, Falconí C, Arcos A. Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus spp. con actividad contra Tetranychus urticae Koch en cultivos comerciales de rosas. Revista Colombiana de Biotecnología. 2015;17(2):140148 .[citado 09 Oct 2018] DOI: 10.15446/rev.colomB.biote

28. Han L, Pu T, Wang X, Liu B, Wang Y, Feng J, et al. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology* 2018;81:101-106
29. Uribe L, Bolaños C, Zapata J, Gómez M, Villamizar L. Desarrollo de prototipos de bioplaguicida a base de la levadura *Rhodotorula glutinis* LvCo7 para el control de *Botrytis cinerea* en mora. CORPOICA , MADR. 2013 [citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13072>
30. ICA. Listado de productos pesticidas usados en floricultura a Agosto de 2018. Registros Nacionales PQUA ICA a Abril 2018.
31. Cerón J, Velasquez L, Rojas D. Proteínas CRY con actividad tóxica hacia algunos insectos lepidópteros y coleópteros. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2017; 56-57
32. Rivera H. Desarrollo y evaluación de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras contra *Botrytis cinerea* en rosas [Magíster en Ciencias-Microbiología]. Universidad Nacional de Colombia; 2014. [citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/48498/1/2635143.2014>
33. Ramírez L, Ramírez N, Fuentes L, Jiménez J, Hernández J. Estandarización de un bioensayo y evaluación preliminar de tres formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2010: 12(1):12-21.[citado 09 Oct 2018] DOI: 10.15446/rev.colomB.biote
34. Alvarez E, Sánchez L. C. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*. 2016:14(26):53-62. [citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
35. DANE. Boletín Técnico Exportaciones (EXPO) Diciembre 2018 [Internet]. Dane.gov.co. 2019 [citado 09 Mar 2019]. Disponible en: [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol\\_exp\\_dic18.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol_exp_dic18.pdf).
36. Web a. ASOCOLFLORES - Bienvenidos al sitio web de la floricultura colombiana [Internet]. Asocolflores.net.co. 2018. [citado 09 Mar 2019] Disponible en: <http://asocolflores.net.co/servicios/cifras-estadisticas/36>

37. ICONTEC. Evaluación de la Conformidad Certificación Agroalimentaria [Internet]. Icontec.org. 2016 [citado 09 Mar 2019]. Disponible en: <https://www.icontec.org/Ser/EvCon/Paginas/TCP/ca.aspx>
38. Cerón S., JA, Velasquez, LF, Rojas Torres, D. GRUPO DE BIOPESTICIDAS. Proteínas CRY con actividad tóxica hacia algunos insectos lepidópteros y coleópteros. Revista Colombiana de Biotecnología [Internet]. 2017;:56-57. [citado 09 Oct 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77653191011>
39. Flowers Of Colombia. Florverde joins floriculture sustainable initiatives | Flowers Of Colombia [Internet]. Flowersofcolombia.co. 2019 [cited 21 March 2019]. Available from: <https://flowersofcolombia.co/biodiversity/florverdejoins-floriculture-sustainable-initiatives/>
40. FSI 2020 – The Floriculture Sustainability Initiative [Internet]. Fsi2020.com. 2017 [cited 21 March 2019]. Available from: <http://fsi2020.com/#details>
41. FSI 2020. Chain Transparency 2 [Internet]. <http://fsi2020.com>. 2017 [cited 21 March 2019]. Available from: <http://fsi2020.com/pf/chain-transparency-2-0/>
42. Agrios G. Plant Pathology [Internet]. 5th ed. San Diego, California; 2005 [cited 21 March 2019]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/plantpathology/agrios/978-0-08-047378-9>
43. Droby S, Lichter A. Post-Harvest Botrytis Infection: Etiology, Development and Management [Internet]. Springer, Dordrecht. 2007 [cited 21 March 2019]. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_19)
44. Caicedo A. Diseño de un prototipo de formulación líquida a base de levaduras filosféricas para el control biológico de Botyitis cinerea en rosas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca: Bogotá; 2014. [citado 09 Mar 2019].
45. Kader. Enfermedades poscosecha de frutas de clima templado, capítulo de libro, Tecnología de posecosecha de cultivos hortofrutícolas. [En línea], 2011. [consultado 13 marzo 2019] Disponible en <http://books.google.com.co/books?id=x62K8WYwAt4C&pg=PA193&dq=control+enfermedades+poscosecha&hl=es&sa=X&ei=NHZOU82HNI3FsATVhIBo&ved=0CDMQ6AEwAQ#v=onepage&q=control%20enfermedades%20poscosecha&f=false>,

46. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Netherlands S. Botrytis: Biology, Pathology and Control [Internet]. Kluwer Academic Publisher. Boston. London:1-24.2007 [cited 21 March 2019]. Available from: <https://www.springer.com/us/book/9781402026249>
47. Piraquive Riveros KP. Diseño y evaluación de un prototipo de formulación a partir de Bacilos Aerobios Formadores de Endosporas (BAFEs) para el control de Botrytis cinerea en rosas. 2019
48. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. Molecular plant pathology; 2007. 8:5, 561580.
49. NCBI. Taxonomy Botrytis cinerea. [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [citado 09 Nov 2019]. disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=40559>
50. Montenegro P, Hernández Y. Biotecnología aplicada al desarrollo agropecuario colombiano. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 2015; 6(2): 97-108. [citado 09 Oct 2018] doi: <https://doi.org/10.22490/21456453.1408>
51. Villamizar L, García M, Cotes A. Desarrollo de un bioplaguicida a base de Trichoderma koningiopsis Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco (Sclerotinia sclerotiorum y Sclerotinia minor). CORPOICA. 2010. [citado 09 Oct 2018] Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/308631815\\_Produccion\\_de\\_Trichoderma\\_koningiopsis\\_Th003](https://www.researchgate.net/publication/308631815_Produccion_de_Trichoderma_koningiopsis_Th003)
52. Yepes GYF, Cuartas PAC. Análisis de beneficios socioambientales por la implementación de estrategias de producción más limpias en el sector agropecuario de la cuenca media del río Chinchiná, Colombia. Acta Agronómica 2014;63(3):193-203.
53. Serrano L, Galindo E. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 2007;58(1):77-88.
54. Cueva FD. El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. Contabilidad y Negocios: Revista del Departamento Académico de Ciencias Administrativas 2012;7(14):81-100.

55. Lozano M. Formulación de Bioplaguicidas. Control biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. 2nd ed. Corpoica. 2000. 108:112
56. Florverde, ICA. Listado de productos pesticidas usados en floricultura a Agosto de 2018. [consultado 13 marzo 2019]
57. Lisboa M. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid vinífera. Memoria de Título para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca. Facultad deficiencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Talca, Chile 2003. [citado 09 Mar 2019]
58. Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, EstradaAlvarado MI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology 2018;36(1). [citado 09 Mar 2019]
59. Lim SM, Yoon M, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Shin TS, et al. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. The plant pathology journal 2017;33(5):488.
60. Instituto Colombiano Agropecuario. Resolución 000375 del 27 de febrero de 2004. [consultado 08 de Noviembre 2019]
61. Instituto Colombiano Agropecuario. Resolución 000187 del 31 de julio de 2006. [consultado 08 de Noviembre 2019]
62. Instituto Colombiano Agropecuario. Resolución 000698 del 4 de febrero de 2011. [consultado 28 de Agosto 2019]
63. Melin P, Håkansson S, Schnürer J. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. Appl Microbiol Biotechnol 2007: 73:1008–1016. Melin P, Håkansson S, Schnürer J. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. Appl Microbiol Biotechnol 2007: 73:1008–1016

64. Álvarez A, Silva H, Leyva S, Marbán N, Rebollar A. Resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) to fungicides in Michoacan Mexico. *Agrociencia*. 2017;51(7):783-798. Available at: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S140531952017000700783&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140531952017000700783&lng=es&tlng=en)
65. Burges H, Jones K. Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Chapter 1 technology of formulation and application. 1998. Kluwer academic publishers; 2-27.
66. Carrillo Fasio, JA, García Estrada, RS, Muy Rangel, MD, Sañudo Barajas, A, Márquez Zequera, I, Allende Molar, R, de la Garza Ruiz, Z, Patiño Vera, M, Galindo Fentanes, E. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* [Internet]. 2005;23(1):24-32. [citado 09 Mar 2019]. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223104> .
67. Perry, S. F. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular biotechnology*, (1998). 9(1), 59-64.
68. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*; 2003. 46:3, 205-229.
69. Girmé Vila G. Caracterització microbiològica i enzimàtica de la llet d'Euga gestant. Avaluació de les propietats probiòtiques, antimicrobianes i preservadores. 2015
70. Grauer Liurner A, Grunberg Eskenazi K, Zardo Vila SI. Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos. 2015