

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
FACULTAD DE CIENCIAS TECNOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y ANTAGONISMO IN
VITRO DE *Bacillus subtilis* FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS DE INTERÉS
AGRÍCOLA.**

POR:

RONY JOSE MARTINEZ ALAS

INFORME DE TESIS



CATACAMAS

OLANCHO

DICIEMBRE, 2025

EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y ANTAGONISMO IN
VITRO DE *Bacillus subtilis* FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS DE INTERÉS
AGRÍCOLA.

POR:

RONY JOSE MARTINEZ ALAS.

Asesor principal

M. Sc. FRANCISCO ENRIQUE SÁNCHEZ

INFORME DE TESIS

PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

CATACAMAS

OLANCHO

DICIEMBRE, 2025

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo, primeramente, a Dios, porque él ha sido mi inspiración y fortaleza en los peores momentos. Siempre me ha llevado con bien y ha llenado de bendiciones mi camino.

A mis padres, Dennis Isaac Martinez Hernandez y Ada Arcenia Alas Mejia, a mis hermanos, Yeimy Josely Martinez Alas y Yeisson Isaac Martinez Alas, por siempre aver estado para mi apoyándome en todo mi recorrido, dándome palabras de ánimo y apoyo moral.

A mis sobrinos, Jasmin Rebeca Duarte Martinez y Richarth Isaac Duarte Martinez, por ser mi inspiracion y motivacion a superarme y ser una mejor persona, por una de las principales razones por las que yo quiero mejorar para ser un buen ejemplo.

Y finalmente a mi tia, Olivia Isabel Martinez Hernandez y mis primos, Adner Eli Acosta Martinez, Kevin Jasser Carias Martinez, Josue Samuel Rodriguez Martinez y Moises Alejandro Rodriguez Martinez por siempre estar ahí para mi inspirandome y Apoyandome incondicionalmente y especialmente a mi tio Wilfredo Rodriguez Martinez por averme inspirado e instruido a seguir con mis estudios.

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, agradezco a Dios por brindarme la fortaleza, sabiduría y salud necesarias para enfrentar los retos que se presentaron a lo largo de este camino. Su guía fue fundamental en cada etapa de este proyecto, permitiéndome avanzar con confianza y gratitud.

A mi asesor principal de tesis M.sc. Francisco Sánchez, por su invaluable orientación, dedicación y rigor impuesto a lo largo de este proyecto. Su experiencia y sabiduría han sido fundamentales para el desarrollo y éxito de esta investigación. así como la de mis asesoras auxiliares M.Sc. Nellys Herrera y M.Sc. Eleazar Turcios por su apoyo y consejos.

A mis padres, Dennis Isaac Martínez Hernández y Ada Arcenia Alas Mejía, a mis hermanos, Yeimy Joselyn Martínez Alas y Yeisson Isaac Martínez Alas, a mi primo Adner Eli Acosta Martínez, por su gran apoyo incondicional.

Finalmente, agradezco al alma mater Universidad Nacional de Agricultura y a los docentes de la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos por las herramientas y enseñanzas que moldearon mi formación profesional. A todos quienes me acompañaron en este proceso, mi sincera gratitud.

CONTENIDO.

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo General:.....	5
2.2. Objetivos Específicos:	5
III. HIPÓTESIS.....	6
3.1. Hipótesis nula (Ho).....	6
3.2. Hipótesis alternativa (H1).....	6
IV. REVISIÓN LITERARIA.....	7
4.1. Bacterias como controladores o agentes de control biológicos.....	7
4.2. Generalidades de <i>Bacillus Subtilis</i>	7
4.3. Mecanismo de acción de <i>Bacillus Subtilis</i> como controlador Biológico.....	8
4.3.1. Metabolitos antimicrobianos	8
4.3.2. Aplicaciones prácticas en agricultura.....	9
4.4. Parámetros de cultivo que afectan que determinan la acción de <i>Bacillus subtilis</i> como controlador Biológico.....	13
4.4.1. Parámetros de cultivo que afectan a <i>Bacillus subtilis</i>	13
V. MÉTODOS Y MATERIALES.....	15
5.1 Lugar de la investigación.....	15
5.2. Materiales y Equipo.....	15
5.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	16
5.3.1. Microorganismos y preparación de la sepa.....	16
5.3.1. Medio de cultivo.....	17
5.3.2. Preparación del medio de cultivo.....	17
5.3.3. Preparación para el fermento.....	18
5.3.4. Preparación del Inoculo.....	18

5.3.5. Condiciones de operación.	18
5.3.6. Muestreo.....	19
5.4 Diseño estadístico.	19
5.4.1. Los factores de estudio que se aplicaron en la siguiente investigación son:..	19
5.5. Variables de respuesta.	21
5.6. CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS.	22
Velocidad Específica de Crecimiento	22
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	23
6.1. Producción de Biomasa.	23
6.2. Halos de Inhibición.	24
6.3. Parámetros Cinéticos.	25
6.3.1. Análisis de Biomasa (g/L).....	25
6.3.2. Análisis de Halos de inhibición.....	27
6.3.3. Velocidad Especifica de Crecimiento.	29
VII. CONCLUSION.....	32
.....	32
VIII. RECOMENDACIONE.....	33
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	34
X. ANEXOS.....	38

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Es la representación esquemática de los beneficios que aporta <i>Bacillus subtilis</i> a las plantas (González-León et al., 2022a).....	11
Figura 2: Resultados de producción de biomasa por Absorbancia medido con espectrofotómetro por cada 6 horas del <i>Bacillus subtilis</i> en sus diferentes tratamientos.	24
Figura 3. halos de inhibición en mm del <i>Bacillus subtilis</i> en sus diferentes tratamientos.	25
Figura 4. Importancia de los factores experimentales sobre la producción de biomasa.	26
Figura 5. Superficie de respuesta aplicado a la producción de biomasa ante las variables de estudio.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Importancia de los factores experimentales sobre los halos de inhibición. ...	28
Figura 7. Superficie de respuesta aplicado a los halos de inhibición ante las variables de estudio.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Importancia de los factores experimentales sobre la velocidad de crecimiento.	30
Figura 9. Superficie de respuesta aplicado a la velocidad de crecimiento ante las variables de estudio.	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1: Relación del efecto de bacillus subtilis como agente antagónico de hongos fitopatógenos. (González-León et al., 2022a).....	11
Tabla 2, Materiales, instrumentos de laboratorio, equipos y reactivos utilizados.....	15
Tabla 3. Concentraciones y componentes del medio de cultivo.....	17
Tabla 4. Matriz estadística experimental.....	20
Tabla 5, Factores experimentales.	20
Tabla 6, Factores respuestas.	20
Tabla 7, Análisis de varianza en la producción de biomasa.	26
Tabla 8. Condiciones óptimas para la producción de biomasa del bacillus subtilis.....	27
Tabla 9, Análisis de varianza para Halos de inhibición.	27
Tabla 10. Condiciones óptimas para los halos de inhibición del bacillus subtilis.....	29
Tabla 11, Análisis de varianza para Velocidad de crecimiento.....	29
Tabla 12. Condiciones óptimas para la velocidad de crecimiento del bacillus subtilis.	30

LISTA DE ANEXOS.

Anexo 1: Curva de Calibrado de Biomasa.	38
Anexo 2. Siembra de hongos en medios PDA utilizando la escala de turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland.....	42
Anexo 3. Medicion de Halos de inhibicion.....	42
Anexo 4. Medicion de biomasa en espectofotometro.	43
Anexo 5. Ependor con Bacillus Subtilis esteriles.....	43
Anexo 6. Medicion del diametro del halo del tratamiento D	44
Anexo 7. Pesado de capacho vacio.	44
Anexo 8. Halos de inhibicion de bauberia.	45
Anexo 9. Hongo Metarizum con discos impregnados de Bacillus subtilis.	45
Anexo 10. Preparacion de placas petri con hongos.....	46
Anexo 11. Extencion del matras Inicial a los secundarios.....	46
Anexo 12. Matrazes del tratamiento en la incubadora con agitacion.....	47
Anexo 13. Placas petri con hongo Metarizum con discos impregnados de Bacillus subtilis.	47
Anexo 14. Placas petri con hongo Bauberia con discos impregnados de Bacillus subtilis en observacion.	48
Anexo 15. Placas petri con hongo Metarizium con discos impregnados de Bacillus subtilis en observacion.	48
Anexo 16. Pesado de capacho con biomasa seca.	49
Anexo 17. Medicion de el diametro del halo de inhibicion.	49

MARTINEZ ALAS, R, J, 2025 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y ANTAGONISMO IN VITRO DE *Bacillus subtilis* FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS DE INTERÉS AGRÍCOLA. Tesis Ing. En Tecnología Alimentaria, Catacamas, Olancho, Honduras. Universidad Nacional de Agricultura. 58 pg.

RESUMEN.

El presente trabajo de tesis evalúa la efectividad de *Bacillus subtilis* como agente de control biológico y analiza cómo las condiciones de cultivo influyen en su crecimiento y capacidad antagonista frente a hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Se estudiaron los efectos de la temperatura de incubación (30 °C y 40 °C) y la velocidad de agitación (150 rpm y 220 rpm) en un medio de cultivo definido, utilizando un diseño experimental 2x2 con puntos al centro. Las variables de respuesta incluyeron la producción de biomasa a través de la absorbancia, la velocidad específica de crecimiento analizado con un modelo exponencial integrado y la capacidad de inhibición frente a los hongos *Bauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por medio de halos de inhibición. Los resultados demostraron que la combinación de 30 °C y 220 rpm favorece la producción de biomasa alcanzando hasta 4.21 g/L, al igual que la capacidad antagonista, alcanzando un diámetro promedio de 14.57 mm contra *Bauveria bassiana*. No se observó inhibición sobre *Metarhizium anisopliae* bajo ninguna condición evaluada y se observó que la variable temperatura afectará significativamente la producción de biomasa. El análisis estadístico (ANOVA y modelos de superficie de respuesta) validó la significancia de estos hallazgos, siendo la temperatura de 30 °C y la velocidad de agitación de 220 rpm los valores más óptimos para la producción de biomasa, halos de inhibición y velocidad de crecimiento. Los parámetros identificados permiten maximizar tanto el crecimiento como la actividad antifúngica de la bacteria, ofreciendo una base científica para el desarrollo de formulaciones biológicas más eficientes y sostenibles, con potencial para reducir el uso de plaguicidas químicos en la agricultura.

Palabras clave: halos de inhibicion, biomasa, antagonismo, hongos fitopatógenos, optimización.

I. INTRODUCCIÓN.

En la agricultura moderna, las plagas y patógenos como *Fusarium spp.* y *Botrytis cinerea* generan pérdidas económicas de hasta el 40% en cultivos clave, agravadas por el uso excesivo de agroquímicos que contaminan suelos y aguas (Compant et al., 2005). Frente a esto, el control biológico emerge como una solución sostenible. El control biológico se ha posicionado como una alternativa sostenible frente al uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura, ofreciendo soluciones eficaces para el manejo de patógenos sin generar impactos negativos en el ecosistema (Mendes et al., 2013).

Entre los agentes de biocontrol más estudiados se encuentra *Bacillus subtilis*, una bacteria Gram-positiva, aerobia facultativa, reconocida por su capacidad para producir metabolitos antifúngicos, competir por nichos ecológicos e inducir resistencia sistémica en plantas (Ongena & Jacques, 2008) (González-León et al., 2022a). No obstante, su eficacia depende en gran medida de las condiciones de cultivo, factores como la temperatura, agitación, disponibilidad de nutrientes y el pH, son determinantes influyen en su crecimiento y actividad antagónica (X.-H. Chen et al., 2008) (Stein, 2005). El *Bacillus subtilis* sintetiza una variedad de metabolitos secundarios, lipopéptidos, polipéptidos y bacteriocinas. con actividad antimicrobiana, Estos compuestos actúan directamente sobre los patógenos, inhibiendo su crecimiento o causando su muerte. (Ongena & Jacques, 2008).

Hay evidencia en la literatura que el nivel de agitación influye en el crecimiento, producción de enzimas, y la síntesis de metabolitos valiosos como la surfactina (Feist et al., 2007a). Por otro lado, condiciones sin agitación favorecen la esporulación y producción de antibióticos, pero disminuye drásticamente la biomasa («A Sequence of Changes», 2010). Por otro lado, la temperatura es un factor crítico en el crecimiento y

metabolismo de *Bacillus subtilis* ya que determina la producción de biomasa, enzimas líticas y metabolitos como la acetona (Schallmey et al., 2004a). Tanto el nivel de agitación y la temperatura son parámetros de fermentación determinantes en el perfil metabólico de *B. subtilis*, por lo que es importante realizar exploraciones para identificar condiciones de cultivo adecuadas para las aplicaciones industriales y agrícolas de este microorganismo en cuestión (Xiao & Xu, 2007).

Por lo antes descrito, este estudio pretende evaluar el desempeño de *B. subtilis* como agente de biocontrol bajo distintas condiciones de cultivo, analizando su cinética de crecimiento y capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) mediante pruebas de inhibición in vitro.

II. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo General:

- Evaluar la efectividad de *Bacillus subtilis* como agente de control biológico bajo distintas condiciones de cultivo y determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

2.2. Objetivos Específicos:

- Analizar la cinética de crecimiento de *Bacillus Subtilis* en el medio de cultivo variando su velocidad de agitación y temperatura de incubación, para identificar las condiciones que favorezcan su desarrollo.
- Identificar la capacidad antagonista de *Bacillus Subtilis* frente a *Bauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* de importancia agrícola mediante a pruebas de inhibición del crecimiento fúngico.

III. HIPÓTESIS.

3.1. Hipótesis nula (H₀)

- Las condiciones de cultivo, como la velocidad de agitación y la temperatura de incubación, no influyen significativamente en la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* ni en su capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

3.2. Hipótesis alternativa (H₁)

- Al menos uno de los factores de estudio ya sea la velocidad de agitación o la temperatura de incubación, si influyen significativamente en la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* y en su capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

IV. REVISIÓN LITERARIA.

4.1. Bacterias como controladores o agentes de control biológicos.

El control biológico es una estrategia sustentable que utiliza organismos vivos para reducir o eliminar poblaciones de plagas o patógenos que afectan a los cultivos. Entre estos organismos, las bacterias han ganado relevancia por su capacidad para suprimir enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenas, así como por su bajo impacto ambiental en comparación con los pesticidas químicos (Beneduzi et al., 2012). El uso de bacterias como controladores biológicos ha demostrado ser efectivo en cultivos como tomate, papa y trigo. Sin embargo, su eficacia puede verse afectada por factores ambientales, como la temperatura y la humedad, así como por la interacción con otros microorganismos del suelo (Mendes et al., 2013). Sin embargo, las bacterias utilizadas en el control biológico pertenecen principalmente a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Serratia*. Estas bacterias actúan mediante mecanismos como la producción de antibióticos, enzimas líticas, sideróforos (moléculas que capturan hierro) y la inducción de resistencia sistémica en las plantas. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* es ampliamente estudiada por su capacidad para producir lipopéptidos antifúngicos, como la surfactina, que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Fusarium* y *Botrytis* (Ongena & Jacques, 2008).

4.2. Generalidades de *Bacillus Subtilis*.

Bacillus subtilis es una bacteria Grampositiva, aeróbica facultativa y formadora de esporas, ampliamente distribuida en el suelo y otros ambientes naturales. Es conocida por su versatilidad metabólica y su capacidad para producir una amplia gama de

compuestos bioactivos, lo que la convierte en un organismo modelo en estudios de microbiología y biotecnología. *Bacillus subtilis* es un organismo modelo en estudios de genética y biología molecular debido a su genoma completamente secuenciado y su facilidad de manipulación genética. Ha proporcionado descubrimientos fundamentales sobre procesos como la esporulación, la formación de biopelículas y la regulación génica (Kunst et al., 1997).

La morfología y estructura de *Bacillus subtilis* tiene forma de bastón y mide aproximadamente 4-10 µm de longitud. Es capaz de formar endosporas, estructuras resistentes que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como altas temperaturas, desecación y exposición a químicos (Setlow, 2006). Por otra parte, se puede mencionar e utilizar una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, lo que le permite adaptarse a diferentes ambientes (Sonenshein et al., 2001).

4.3. Mecanismo de acción de *Bacillus Subtilis* como controlador Biológico.

4.3.1. Metabolitos antimicrobianos

Bacillus subtilis sintetiza una variedad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, que incluyen lipopéptidos, polipéptidos y bacteriocinas. Estos compuestos actúan directamente sobre los patógenos, inhibiendo su crecimiento o causando su muerte (Ongena & Jacques, 2008).

Los lipopéptidos, cíclicos en el *B. subtilis* ejerce sus efectos benéficos en la agricultura a través de múltiples mecanismos. Por un lado, produce lipopéptidos antimicrobianos como la surfactina, que actúa como biosurfactante con propiedades antifúngicas, antibacterianas e incluso antiviral y antitumoral, al desestabilizar membranas celulares y provocar lisis. De manera similar, sintetiza otros lipopéptidos como la iturina y fengicina, que muestran actividad antifúngica específica contra patógenos como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Botrytis*; la iturina forma poros en membranas fúngicas, mientras que la

fengicina interfiere con la síntesis de la pared celular (Ongena & Jacques, 2008). Además, *B. subtilis* forma biopelículas que le permiten adherirse a superficies, protegerse de condiciones adversas y colonizar eficientemente las raíces de las plantas, lo que favorece el crecimiento vegetal y la supresión de patógenos (Branda et al., 2005). Estos procesos se complementan con la producción de diversos metabolitos secundarios antimicrobianos, como antibióticos, sideróforos y compuestos volátiles, que amplían su capacidad para controlar enfermedades en cultivos (Stein, 2005).

Los polipéptidos en el *B. subtilis* produce una variedad de compuestos antimicrobianos, entre los que destacan los polipéptidos y las bacteriocinas, que le confieren ventajas competitivas en su entorno. Los polipéptidos, sintetizados por complejos enzimáticos incluyen moléculas como la bacilaena, la cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas al interferir en la biosíntesis de ácidos grasos (Butcher et al., 2007). Adicionalmente, *B. subtilis* sintetiza la difficidina, un polipéptido con actividad antibiótica de amplio espectro que actúa uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma, bloqueando así la síntesis proteica en bacterias competidoras (Miyazaki & Mori, 2017).

4.3.2. Aplicaciones prácticas en agricultura.

Bacillus subtilis compete con los patógenos por recursos esenciales, como el hierro, mediante la producción de sideróforos. Estos compuestos quelantes tienen una alta afinidad por el hierro, limitando su disponibilidad para los microorganismos patógenos y suprimiendo su crecimiento (Mendes et al., 2013). Además, *B. subtilis* coloniza rápidamente las raíces de las plantas, ocupando los mismos nichos ecológicos que los patógenos. Esta colonización competitiva previene la adhesión y establecimiento de patógenos en la superficie de las raíces (Mendes et al., 2013).

El *B. subtilis* activa los mecanismos de defensa de las plantas a través de la inducción de resistencia sistémica (ISR). Este proceso implica la producción de compuestos señalizadores, como ácido salicílico, jasmonato y etileno, que activan genes de defensa en la planta. Como resultado, la planta se vuelve más resistente a infecciones posteriores

por patógenos (Mendes et al., 2013). Por ejemplo, en estudios con tomate, la aplicación de *Bacillus subtilis* indujo la producción de enzimas defensivas como la quitinasa y la glucanasa, que degradan las paredes celulares de los hongos (Cawoy et al., 2011).

La capacidad de *Bacillus subtilis* para formar biopelículas en las raíces de las plantas es crucial para su eficacia como controlador biológico. Las biopelículas son comunidades microbianas encapsuladas en una matriz extracelular que protege a las bacterias de condiciones ambientales adversas, como la desecación y la presencia de antibióticos (Ongena & Jacques, 2008). La función de las biopelículas, protegen a *Bacillus subtilis* de la competencia microbiana, facilitan la liberación continua de metabolitos antimicrobianos en la rizosfera y mejora la colonización de las raíces, lo que aumenta la eficacia del control biológico (Y. Chen et al., 2013). El *B. subtilis* es un importante productor de enzimas líticas como proteasas (subtilisina), amilasas, lipasas y lisozimas, las cuales son secretadas al medio extracelular mediante sistemas de transporte específicos y tienen aplicaciones industriales en detergentes, alimentos y farmacéutica (Harwood & Wipat, 1996) (van Dijl & Hecker, 2013).

Bacillus subtilis se ha utilizado con éxito en el control de diversas enfermedades vegetales, como la pudrición de la raíz: Causada por *Fusarium oxysporum*, el mildiu: Causado por *Phytophthora infestans*, y mancha foliar causada por *Alternaria solani*. Además, su aplicación como biofungicida ha demostrado ser efectiva en cultivos como tomate, papa, trigo y arroz, reduciendo la dependencia de pesticidas químicos y promoviendo prácticas agrícolas sostenibles (Cawoy et al., 2011).

Sumado a lo anterior, *Bacillus subtilis* es una bacteria clave en la agricultura por su doble función como biofertilizante y agente de control biológico. Promueve el crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de fitohormonas, mientras combate patógenos con metabolitos antimicrobianos (surfactina, iturina) e induce resistencia sistémica en plantas (figura 1). Su capacidad para colonizar raíces mediante quimiotaxis, formación de biopelículas y movilidad en enjambre ("swarming") asegura una acción eficiente. Su rendimiento mejora en consorcios

microbianos (ej. con *Glomus* y *Bradyrhizobium*), aumentando cosechas hasta un 45%. Para maximizar su impacto, se recomiendan formulaciones adaptadas que combinen células y metabolitos, posicionándolo como una solución sostenible para reducir agroquímicos y mejorar la productividad agrícola, se muestran algunos casos de la relación del efecto de *Bacillus subtilis* como agente antagónico de hongos fitopatógenos en la **Tabla 1** (González-León et al., 2022a).

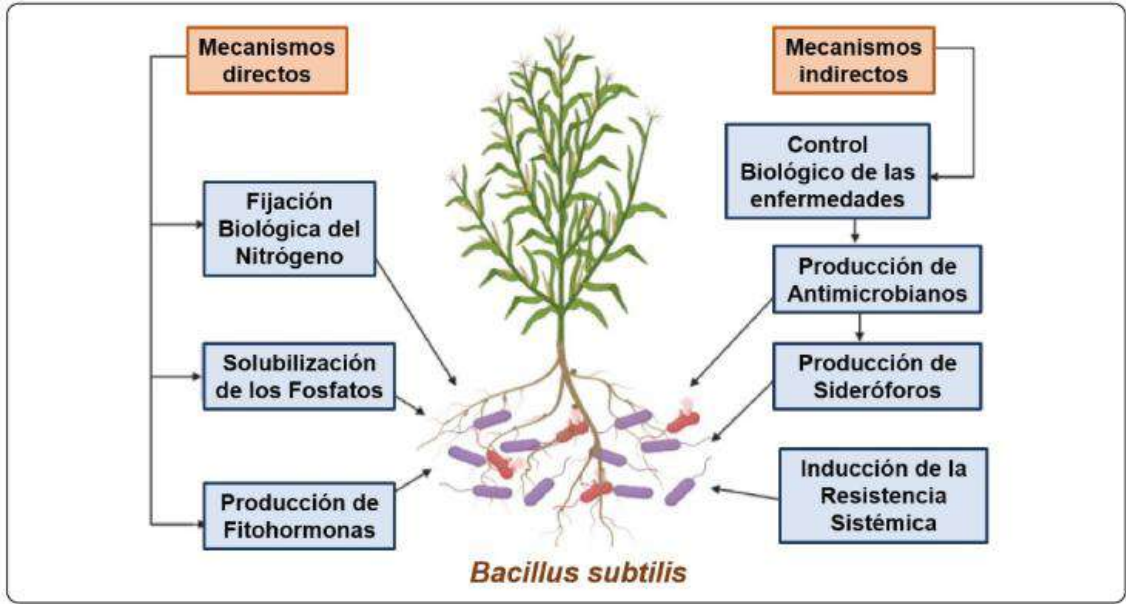


Figura 1: Es la representación esquemática de los beneficios que aporta *Bacillus subtilis* a las plantas (González-León et al., 2022a).

Tabla 1: Relación del efecto de *bacillus subtilis* como agente antagónico de hongos fitopatógenos. (González-León et al., 2022a).

Cepa- <i>Bacillus</i> .	Fitopatógeno.	Hallazgos.
<i>B. subtilis</i> YBC 151B1	y <i>Fusarium solani</i>	En las hojas de maracuyá se presentó un efecto preventivo y curativo.

<i>B. subtilis</i> MF497446	<i>Cephalosporium maydis</i>	La inoculación de la bacteria en las pruebas de invernadero con plantas de maíz disminuyó la incidencia de la enfermedad. En el campo se observó el mismo efecto, que fue potenciado con la co-inoculación de la cepa de <i>Pseudomonas koreensis</i> MG209738.
<i>B. subtilis</i> RH5	<i>Rhizoctonia solani</i>	Presentó un fuerte efecto antagónico sobre el fitopatógeno y en pruebas de invernadero con plantas de arroz, promovió el desarrollo vegetal y estimuló los mecanismos de defensa.
<i>B. subtilis</i> 10-4, 2D	<i>Phytophthora infestans</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Inhibió el desarrollo de los fitopatógenos en papas postcosecha. En combinación con el ácido salicílico, aportó una vida útil prolongada y un aspecto fresco del tubérculo.
<i>B. subtilis</i> RSS-1	<i>Phytophthora sojae</i>	Inhibió el crecimiento micelial del fitopatógeno y estimuló la respuesta de defensa en las plantas de soja, promoviendo la lignificación y la producción de la fitoalexinas.
<i>B. subtilis</i> WXCDD105	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Cladosporium fulvum</i>	Redujo el daño causado por los fitopatógenos en las plantas de tomate. También estimuló la germinación de la semilla y el desarrollo de las plántulas.
<i>B. subtilis</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	En condiciones <i>in vitro</i> y en granos de pistacho hubo un efecto antifúngico y la reducción en la producción de las aflatoxinas.

<i>B. subtilis</i> 160	<i>Sporisorium reilianum</i>	Inhibió el desarrollo de la levadura <i>in vitro</i> . En el campo se redujo el porcentaje de la incidencia de la enfermedad y se incrementó la productividad del maíz.
<i>B. subtilis</i> 160	<i>Stenocarpella maydis</i> y <i>Stenocarpella macrospora</i>	La cepa fue aislada de la rizósfera del maíz y presentó una capacidad antagónica sobre los fitopatógenos en estudio.

4.4. Parámetros de cultivo que afectan que determinan la acción de *Bacillus subtilis* como controlador Biológico.

La eficacia de *Bacillus subtilis* como controlador biológico depende en gran medida de las condiciones de cultivo y los parámetros ambientales. Factores como el pH, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, la oxigenación y la humedad influyen en su crecimiento, esporulación y producción de metabolitos antimicrobianos. Optimizar estos parámetros es crucial para maximizar su potencial como agente de biocontrol (Ongena & Jacques, 2008) .

4.4.1. Parámetros de cultivo que afectan a *Bacillus subtilis*.

4.4.1.1. Temperatura.

Para el crecimiento del *Bacillus subtilis* la temperatura es crucial debido a que el *Bacillus subtilis* presenta un rango óptimo de crecimiento entre 30 y 37 °C, donde a 37 °C alcanza su máxima producción de biomasa (OD~600nm = 4.5 en 12 h) y enzimas líticas como proteasas y amilasas (Schallmey et al., 2004a). Sin embargo, a temperaturas superiores a 45 °C se activa la respuesta al estrés térmico, reduciéndose la biomasa en un 30% y afectando negativamente la producción de metabolitos secundarios como la surfactina,

cuya síntesis disminuye un 50% (Zupke et al., 1995). Por otro lado, la producción de acetoina un metabolito clave en la industria alimentaria se ve favorecida a 37 °C, demostrando que la temperatura es un factor crítico que modula tanto el crecimiento como el perfil metabólico de este microorganismo (Xiao & Xu, 2007). Esto revela que es necesario el estudio de las temperaturas para ver el comportamiento que este influye a los metabolitos secundarios a diferentes temperaturas.

4.4.1.2. Oxigenación

El *B. subtilis* es un aerobio facultativo estricto, por lo que la disponibilidad de oxígeno (controlada por la agitación del medio) afecta directamente su crecimiento y metabolismo (Sonenshein et al., 2001). Estudios demuestran que a alta agitación (150–250 rpm): Favorece la biomasa y la producción de enzimas líticas (proteasas, amilasas) debido a una mayor transferencia de oxígeno (Feist et al., 2007a). Sin embargo, puede inhibir la síntesis de metabolitos secundarios como surfactina, que requiere condiciones de estrés oxidativo moderado (Zupke et al., 1995). Por el contrario sin agitación se promueve la esporulación y reduce drásticamente la biomasa, pero puede inducir la síntesis de antibióticos («A Sequence of Changes», 2010). La aplicación en campo en lo que es suelos compactados o con baja aireación, la actividad de *B. subtilis* puede verse limitada. Por lo tanto, es recomendable mejorar la estructura del suelo para garantizar una oxigenación adecuada (Compant et al., 2005).

V. MÉTODOS Y MATERIALES.

5.1 Lugar de la investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Tecnológicas y laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Agricultura, municipio de Catacamas, Olancho, Honduras, Barrio el Espino, carretera que conduce hacia Dulce Nombre de Culmí.

5.2. Materiales y Equipo.

Tabla 2, Materiales, instrumentos de laboratorio, equipos y reactivos utilizados.

Materiales.	Equipos.	Reactivos.
Placas Petri	Incubadora termostática biobase modelo BJPX-200B.	Caldo nutritivo
Papel filtro	Termómetro.	Agar nutritivo
Tubos de ensayo	Microscopio.	Agar TSA
Erlenmeyer	Espectrofotómetro Lavibon XD7500.	Solución salina 0.85%
Puntas estériles	Centrifuga.	Alcohol etílico 70%
Bolsas rojas para autoclave.	Autoclave All American.	Hipoclorito de sodio
Hisopos estériles	Balanza analítica OHAUS Explorer.	Cloro
Papel aluminio	Placas calefactoras Biobase.	Cepas de <i>Bacillus subtilis</i>

Mas King tape	Horno de secado.	Hongos <i>Bauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>
Papel toalla	Pie de rey Truper.	Nitrato de potasio
Marcador	Micropipetas	Azúcar
Algodones	Ph metro HANNA.	Fosfato diaposatico
Guantes	Refrigeradora LG.	Sulfato de manganeso
Mascarillas		Cloruro de potasio
		Cloruro de calcio
		Sulfato de magnesio heptahidratado
		El sulfato de hierro (II)
		Molibdato de sodio
		Papa para PDA

5.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.3.1. Microorganismos y preparación de la cepa.

Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis*, la cual se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador LG, almacenada en viales de 1.5 mL con glicerol al 85% como agente crioprotector. Para la preparación del cultivo, se empleó un matraz de 250 mL con 90 mL de medio de cultivo definido, al cual se le añadió 1 mL del contenido de el vial que contenía *B. subtilis* puro. Posteriormente, el matraz se incubó en la incubadora con agitacion a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 220 rpm durante 16 horas, tiempo en el que la bacteria incrementó su biomasa.

Luego, se tomaron 45 mL del cultivo y se transfirieron a tubos de ensayo de 50 mL, agregando 1 mL de NaCl al 0.1%. Las muestras se centrifugaron a 7000 rpm por 15 minutos, se resuspendieron en 20 mL de agua destilada previamente esterilizada y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones, con el propósito de concentrar las células bacterianas. Finalmente, se tomaron 700 μL del concentrado y se colocaron en

viales de 1.5 mL, a los que se añadieron 300 µL de glicerol antes de llevarlos nuevamente a refrigeración.

5.3.2. Medio de cultivo.

Se utilizó un medio definido según (Schaeffer et al., 1965) en el cual se sustituyó algunos componentes y cambio algunas concentraciones que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones y componentes del medio de cultivo.

Producción por L.	
Pesar en	GR
Agua destilada	1 (L)
Azúcar (Sacarosa)	5
Nitrado de potasio (NKO3)	3
fosfato de potasio (K2HPO4)	1
Cloruro de potasio (KCl)	0.5
Cloruro de Calcio (CaCl2)	0.3
Sulfato de Magnesio (MgSO4. 7H2O)	0.5
sulfato ferroso heptahidratado (FeSO. 7H2O)	0.1

5.3.3. Preparación del medio de cultivo.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron las concentraciones mostradas en la **Tabla 3** y se hicieron 3 soluciones con las mezclas de algunos reactivos por separados. Para la solución 1 por cada 1000 mL de Agua destilada, se le agregaron 5.88 gr de azúcar, 3.53 gr de nitrato de potasio (KNO₃) y 1.17 gr de fosfato de potasio (KH₂PO₄). La solución 2 por cada 500 mL de agua destilada se le agregaron únicamente 3.75 gr de Cloruro de Calcio (CaCl₂). Y la solución 3 por cada 500 mL de agua destilada se le

agregaron 25 gr de cloruro de potasio (KCL), 25 gr de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 5 gr de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

5.3.4. Preparación para el fermento.

Para la preparación del medio de cultivo a fermentar se hizo un matraz de 250 mL inicial que contenía 100 mL del medio el cual se le agregaron 95 mL de la solución 1, 4 mL de la segunda solución y 1 mL de la tercera solución. Para los demás matraces de 250 mL se le agrego 85 mL de la de la primera solución, 4 mL de la segunda solución y 1 mL de la tercera solución. Estos matraces de 250 mL se esterilizaron en una autoclave a una temperatura de 120 °C y 15 psi durante 15 minutos. Después de la esterilización, se dejaban enfriar y se comenzó con los diferentes tratamientos.

5.3.5. Preparación del Inoculo.

Para la preparación del inoculo se utilizó, el medio definido mostrado en la tabla 3, utilizando un matraz inicial de 250 mL con 100 mL de medio definido previamente esterilizado, se tomó un vial que contenía la cepa del *bacillus subtilis*, y con la ayuda de una micropipeta con punta estéril, se tomó 1 mL de la cepa de *bacillus subtilis* de manera líquida, directamente del vial y bajo mechero se agregó al matraz que contenía el medio de cultivo definido.

5.3.6. Condiciones de operación.

El trabajo experimental fue desarrollado en 2 etapas, la primera etapa se enfocó en caracterizar la cinética de crecimiento bajo 2 niveles de temperatura y 2 niveles de velocidades de agitación. En el caso de la segunda etapa se enfocó a la producción de biomasa y la tercera etapa consistió identificar la capacidad antagónica a través de los halos de inhibición. Todos los cultivos fueron desarrollados con un pH inicial de 7, con

sus temperaturas y velocidades de agitación según cada tratamiento a los cuales por cultivo se les realizó un duplicado.

5.3.7. Muestreo.

Se tomaron muestras de 10 ml de cada uno de los matraces cada 6 horas descartando matraces durante 90 horas para realizar mediciones de biomasa y para realizar técnica de antagonismo para determinar los halos de inhibición.

5.4 Diseño estadístico.

5.4.1. Los factores de estudio que se aplicaron en la siguiente investigación son:

Temperatura.

Se considera un elemento crucial en el desarrollo y metabolismo de *Bacillus subtilis*, dado que controla la generación de biomasa, enzimas líticas y metabolitos (Schallmey et al., 2004a).

Velocidades de Agitación.

Se tomó como una principal variable de estudio ya que existen pruebas en la literatura que el grado de agitación en una agitación afecta el crecimiento, la generación de enzimas y la producción de metabolitos útiles como la surfactina (Feist et al., 2007a). En cambio, condiciones sin agitación promueven la esporulación y la generación de antibióticos, pero reducen significativamente la biomasa («A Sequence of Changes», 2010).

Se aplicó un diseño cribado de 2 por 2 con 3 puntos al centro, en donde se evaluaron todas las posibles combinaciones de los 2 niveles de temperatura (30 °C y 40 °C) y 2 velocidades de agitación (150 rpm y 220 rpm) como se muestra en la **Tabla 5**, en 7 corridas experimentales tal como muestra en la **Tabla 4**, para obtener como variables

respuesta la biomasa por absorbancia, el antagonismo por halos de inhibición y la velocidad específica de crecimiento mediante un modelo exponencial integrado mostrado en la **Tabla 6**. Posteriormente, se evaluaron los resultados experimentales mediante un análisis de varianza ANOVA, utilizando el software estadístico Statgraphics. Además, se realizó un análisis de superficie respuesta, un análisis de diagrama de Pareto y un análisis de optimización de respuesta.

Tabla 4. Matriz estadística experimental.

Tratamientos.	Temperatura (°C).	Velocidad de Agitación (rpm).	Biomasa (g/L).	Halos de inhibición (mm).	Velocidad de crecimiento (μ).
A	30 °C	220 rpm.			
B	40 °C	150 rpm.			
C	30 °C	150 rpm.			
D	40 °C	220 rpm.			
E	35 °C	185 rpm.			
F	35 °C	185 rpm.			
G	35 °C	185 rpm.			

Tabla 5, Factores experimentales.

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuo
Temperatura.	30	40	°C	Si
Velocidad de agitación.	150	220	RPM	Si

Tabla 6, Factores respuestas.

Respuestas.	Unidades.
Biomasa.	g/L
Halos de Inhibición.	mm
Velocidad de crecimiento.	μ

5.5. Variables de respuesta.

5.5.1. Biomasa.

Por medio de estudios se ha demostrado que, ante las diferentes temperaturas y velocidades de agitación, la producción de biomasa del *Bacillus subtilis* puede variar. Por lo tanto, se determinaron por medición de densidad óptica con un Espectrofotómetro Lavibon XD7500 a 600 nm (OD_{600}). Esta técnica se basó en el principio de que las células en suspensión dispersan la luz, y esta dispersión es proporcional a la concentración celular dentro de un rango lineal determinado. Las muestras fueron previamente homogeneizadas y diluidas para asegurar la linealidad de la lectura. Se realizó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones conocidas de células para correlacionar absorbancia y concentración de biomasa por medio del peso seco (Sezonov et al., 2007).

5.5.2. Halos de inhibición.

Se demostró que las temperatura y velocidad de agitación pueden afectar la producción de metabolitos antimicrobianos por lo tanto su capacidad antagónica y esto se identifica mediante el diámetro de los halos de inhibición. Para determinar los halos de inhibición se utilizó una técnica de ensayo de difusión en agar modificados con discos impregnados adaptado a hongos filamentosos. El cual se adapta a el método “Kirby-Bauer” en este método estándar se evaluó el antagonismo del *Bacillus subtilis* ante los hongos patógenos con interés agrícola (*Bauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*). Para la inoculación se preparó un cultivo de hongos en caldo PDA hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland ($\sim 1.5 \times 10^8$ UFC/mL). Luego se sembró uniformemente en agar nutritivo, luego se colocaron discos con el *Bacillus subtilis* en el agar y se presionó ligeramente con pinzas anteriormente esterilizadas para asegurar el contacto, luego se dejó incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16–18 horas, al concluir su tiempo de incubación, utilizando el pie de rey se midió el diámetro de los halos de inhibición y comparo la diferencia de ellos según cada tratamiento (Bauer et al., 1966).

5.6. CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS.

Velocidad Específica de Crecimiento (μ).

El método que se utilizó para analizar la velocidad específica de crecimiento del *Bacillus subtilis* a diferentes ambientes de crecimiento se necesita como variable respuesta se calcularon tomando en cuenta que lo siguiente. La velocidad específica de crecimiento (μ) se representa mediante la ecuación del modelo exponencial (Ec 1) donde X es la concentración de biomasa y μ es la velocidad específica de crecimiento. Al analizar el cambio en la concentración de biomasa a lo largo del tiempo, se pudo estimar la rapidez con la que el microorganismo se reproduce y crece en un medio de cultivo. Utilizando el modelo exponencial integrado (Ec 2), para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) de un cultivo bacteriano mediante regresión lineal, primero se mide la densidad óptica del cultivo en diferentes momentos durante la fase exponencial, luego se transforma cada valor a su logaritmo natural ($\ln X$) y se grafica $\ln X$ en función del tiempo. Si el crecimiento es verdaderamente exponencial, los puntos formarán una recta cuya pendiente corresponde a μ (Fernández-Martínez et al., 2024).

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$\ln(x) = \mu t + \ln(x_0) \quad \text{Ecuación 2.}$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. Producción de Biomasa.

En la **figura 2**, se puede observar las concentraciones de biomasa del *Bacillus subtilis* para los diferentes tratamientos evaluados de la **tabla 4**, donde el tratamiento con una temperatura de 30°C y una velocidad de agitación 220 rpm, se presentó una mayor producción de biomasa con 4.21 g/L, a las 66 horas. Por lo contrario que con una temperatura de 40°C y una velocidad de agitación 220 rpm, que presentó la menor producción de biomasa con 1.03 g/L, a las 60 horas. Esto evidencia la influencia significativa en los cambios de temperatura en la producción de biomasa. Por otra parte, en el tratamiento con una temperatura de 30°C y una velocidad de agitación 150 rpm presentó la menor producción de biomasa con 4.12 g/L, a las 66 horas, fue similar al tratamiento con una temperatura de 30°C y una velocidad de agitación 220 rpm. Por otra parte, en el tratamiento con una temperatura de 40°C y una velocidad de agitación 150 rpm presentó una producción de biomasa de 3.32 g/L, a las 48 horas, como se observa en la **figura 2**. Por lo tanto se produjo más biomasa a bajas temperaturas refutando los estudios de (Schallmey et al., 2004b) sobre un rango óptimo de 30–37 °C, y que la agitación no mostró un efecto tan marcado, en contraste con (Feist et al., 2007b) quienes indican que altas velocidades de agitación favorecen la producción de biomasa y que las temperaturas óptimas de producción de biomasa del *Bacillus subtilis* están dentro de un rango de 30 a 37 °C.

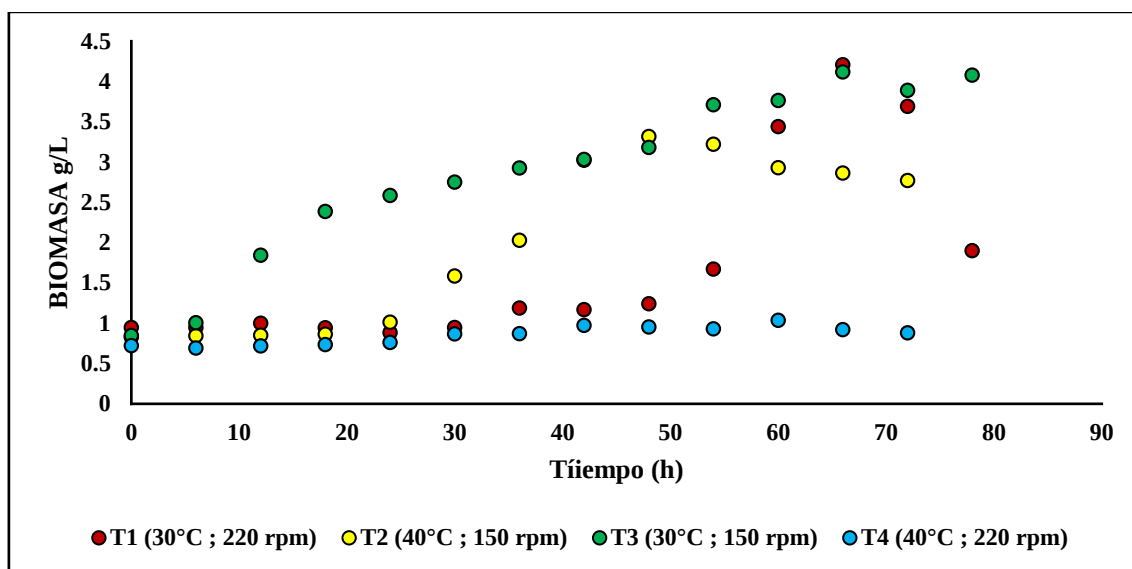


Figura 2. Resultados de producción de biomasa por Absorbancia medido con espectrofotómetro por cada 6 horas del *bacillus subtilis* en sus diferentes tratamientos.

6.2. Halos de Inhibición.

En la **figura 3**, podemos observar de manera gráfica, los promedios en mm, de halos de inhibición del *Bacillus subtilis* ante los diferentes tratamientos. Se mostró capacidad inhibitoria únicamente contra *Beauveria bassiana*, mientras que no presentó efecto sobre *Metarhizium anisopliae*, esto debido a que el hongo tiene la capacidad de producir metabolitos como VOCs (compuestos orgánicos volátiles) con actividad antimicrobiana (Hummadi et al., 2022). El tratamiento más efectivo fue T1 (30 °C, 220 rpm), con un halo promedio de 14.54 mm con una desviación de 0.39 mm siendo significativamente superior al resto de tratamientos según los estudios de (Hmidet et al., 2017) especifican que a una temperatura de 30 °C hay una mayor producción de metabolitos antifúngicos, que a temperaturas superiores disminuye su producción. En comparación con T1, los halos disminuyeron en T2 (40 °C, 150 rpm) a 11.98 mm con una desviación de 1.73 mm, en T4 (40 °C, 220 rpm) a 11.25 mm con una desviación de 1.06 mm, y en T3 (30 °C, 150 rpm) a 10.75 mm con una desviación de 2.12 mm, siendo este último el menos efectivo. El análisis de varianza con prueba de Tukey ($p > 0.05$) mostró diferencias significativas únicamente en T1, indicando que las condiciones de menor temperatura y mayor agitación favorecen la actividad inhibitoria de *B. subtilis*. Estos resultados difieren parcialmente de

lo reportado por (González-León et al., 2022b), quienes documentan distintos niveles de inhibición para esta especie.

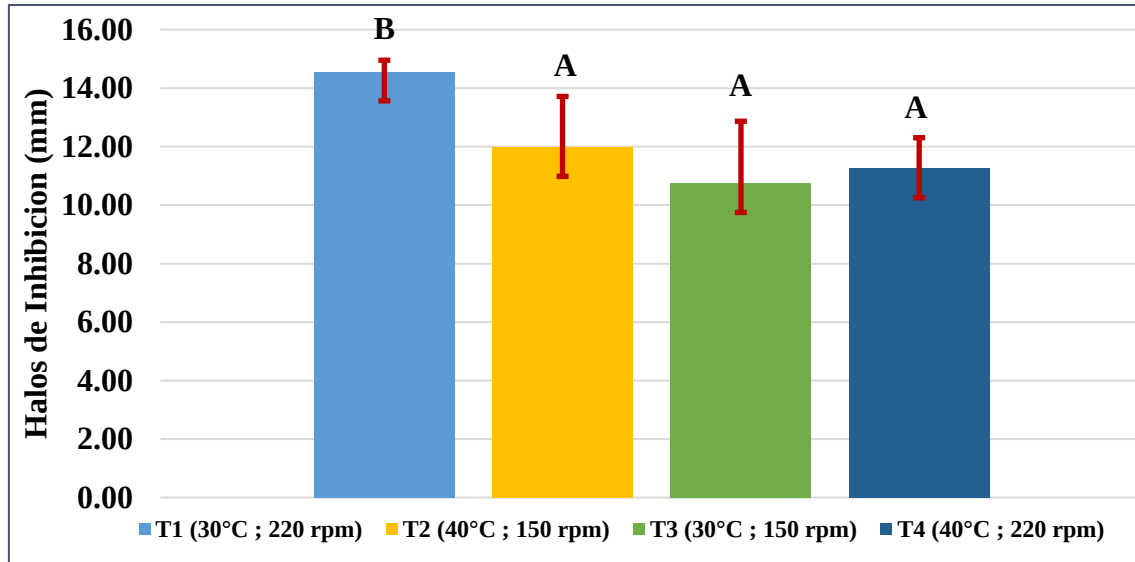


Figura 3. Halos de inhibición en mm del *Bacillus subtilis* en sus diferentes tratamientos.

6.3. Parámetros Cinéticos.

6.3.1. Análisis de Biomasa (g/L).

En la **tabla 7**, podemos observar el análisis de varianza y se encontró que el factor de temperatura presenta una diferencia significativa, es decir que es una variable influyente para la producción de biomasa y que su efecto si es significativo para la producción de biomasa del *B. subtilis*. Así mismo, la interacción de los factores AB (Temperatura y velocidad de agitación) y la variable de velocidad de agitación presenta diferencia estadística con un R-cuadrado de 76.898% de determinación, por lo que se ratifica en el diagrama de Pareto en la **figura 4 (A)**, que la producción de biomasa si se ve beneficiada por la temperatura más que por velocidad de agitación y la interacción de ambos factores de estudio.

Tabla 7, Análisis de varianza en la producción de biomasa.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	8.26211	1	8.26211	18.96	0.0018
Velocidad de Agitación	2.19451	1	2.19451	5.04	0.0515
AB	2.58781	1	2.58781	5.94	0.0376
bloques	0.0106426	1	0.0106426	0.02	0.8793
Error total	3.92206	9	0.435785		
Total (corr.)	16.9771	13			

R-cuadrada = 76.898%

Fuente: Statgraphis Centorum

El grafico 3D de la Figura 4 (B), evidencia el aumento de la biomasa conforme a la baja temperatura, confirmando que dicho factor contribuye a la producción de biomasa. El modelo visualiza como la biomasa aumenta al combinar la temperatura de 30 °C, con la velocidad de agitación de 220 rpm.

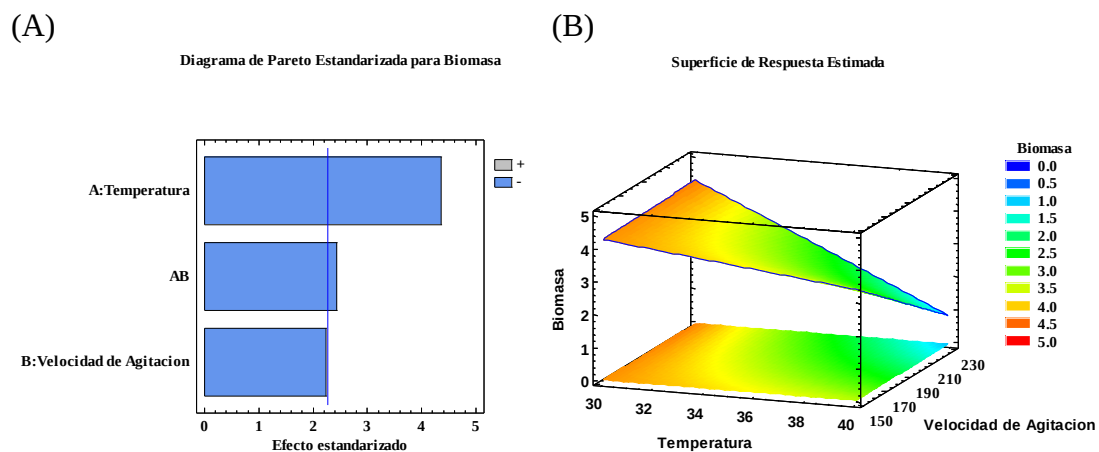


Figura 4. Diagrama de Pareto y Superficie de respuesta sobre la producción de biomasa.

Fuente: Statgraphis Centorum.

En la **tabla 8**, se puede observar la combinación óptima para la producción de biomasa, para el *Bacillus subtilis*. Dado que se tiene factores o combinación de estos que, sus efectos provocan diferencias estadísticas significativas. Se procedió a buscar en el programa Statgrafhis Centorum la combinación de los factores que al optimizarlo presentan la mayor producción de biomasa y se encontró que esta combinación corresponde al uso de una temperatura de 30 °C y una velocidad de agitación de 220 rpm. alcanzando un valor óptimo de 4.35 g/L de biomasa.

Tabla 8. Condiciones óptimas para la producción de biomasa del *bacillus subtilis*.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30.0	40.0	30.0
Velocidad de Agitación	150.0	220.0	220.0

Fuente: Statgrafhis Centorum. Biomasa = Coeficiente – Temperatura + Velocidad de agitación – (Temperatura * Velocidad de agitación).

6.3.2. Análisis de Halos de inhibición.

En la **tabla 9**, podemos observar el análisis de varianza y se encontró que la combinación de temperatura y velocidad de agitación presenta una diferencia significativa, es decir que el efecto de su combinación si es significativo para aumentar el antagonismo en los halos de inhibición del *B. subtilis*. Así mismo, el factor de Temperatura y el factor de velocidad de agitación no presentan diferencia estadística con un R-cuadrado de 62.3762% de determinación, por lo que se ratifica en el diagrama de Pareto en la **figura 5 (A)**, que la inhibición si se ve beneficiada por la combinación de ambos factores (AB).

Tabla 9, Análisis de varianza para Halos de inhibición.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	2.1632	1	2.1632	1.88	0.2041
Velocidad de Agitación	4.7432	1	4.7432	4.11	0.0732

AB	10.3058	1	10.3058	8.93	0.0152
bloques	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Error total	10.382	9	1.15355		
Total (corr.)	27.5942	13			

R-cuadrada = 62.3762%

Fuente: Statgrafhis Centorum.

El grafico 3D de la **Figura 5 (B)**, evidencia el aumento de los halos conforme a la baja combinación de variables, confirmando que dicha combinación si contribuye a los halos de inhibición. El modelo visualiza como hay un aumento al combinar la temperatura de 30 °C, con la velocidad de agitación de 220 rpm.

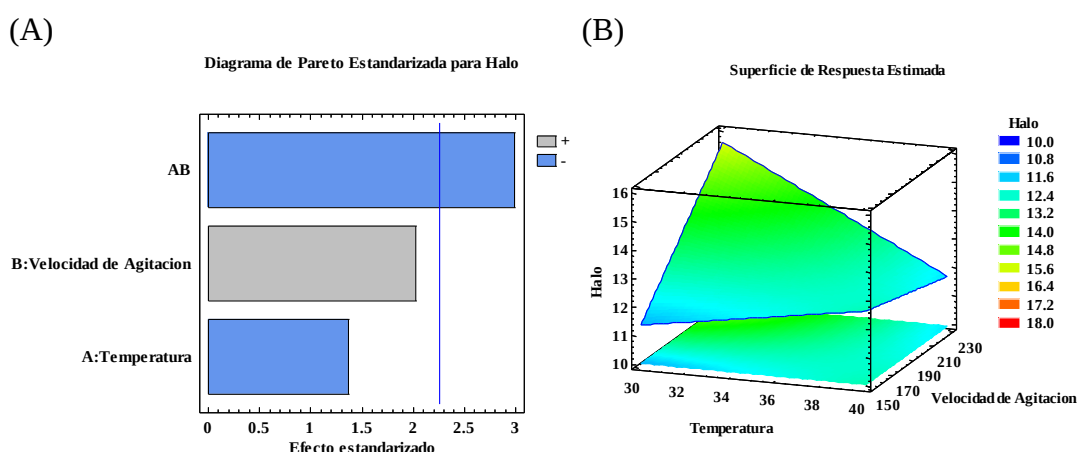


Figura 5. Importancia de los factores experimentales sobre los halos de inhibición.

Fuente: Statgrafhis Centorum.

En la **tabla 10**, se puede observar la combinación óptima para la producción de halos de inhibición, para el *Bacillus subtilis*. Dado que se tiene factores o combinación de estos que sus efectos provocan diferencias estadísticas significativas. Se procedió a buscar en el programa Statgrafhis Centorum la combinación de los factores, que al optimizarlo presentan un mayor halo de inhibición y se encontró que esta combinación corresponde al uso de una temperatura de 30 °C y una velocidad de agitación de 220 rpm. alcanzando un valor óptimo de Halos de 15.15 mm.

Tabla 10. Condiciones óptimas para los halos de inhibición del *bacillus subtilis*.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30.0	40.0	30.0
Velocidad de Agitación	150.0	220.0	220.0

Fuente: Statgrafhis Centorum. Halos de inhibición = Coeficiente – Temperatura + Velocidad de agitación – (Temperatura * Velocidad de agitación).

6.3.3. Velocidad Especifica de Crecimiento.

En la **tabla 11**, podemos observar el análisis de varianza y se encontró que la combinación de temperatura y velocidad de agitación presenta una diferencia significativa, es decir que el efecto de su combinación si es significativo para aumentar la velocidad de crecimiento del *B. subtilis*. Así mismo, el factor de Temperatura y el factor de velocidad de agitación no presentan presenta diferencia estadística con un R-cuadrado de 79.2759% de determinación, por lo que se ratifica en el diagrama de Pareto en la **figura 6 (A)**, que la velocidad de crecimiento si se ve beneficiada por la combinación de ambos factores (AB).

Tabla 11, Análisis de varianza para Velocidad de crecimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0.000015125	1	0.000015125	0.12	0.7422
Velocidad de Agitación	0.000015125	1	0.000015125	0.12	0.7422
AB	0.00427813	1	0.00427813	32.55	0.0003
bloques	0.000216071	1	0.000216071	1.64	0.2318
Error total	0.00118277	9	0.000131419		
Total (corr.)	0.00570721	13			

R-cuadrada = 79.2759%

Fuente: Statgrafhis Centorum

El grafico 3D de la Figura 6 (B). evidencia el aumento de la velocidad de crecimiento conforme a la combinación de variables, confirmando que dicha combinación si contribuye a la velocidad de crecimiento. El modelo visualiza como hay un aumento al combinar la temperatura de 30 °C, con la velocidad de agitación de 220 rpm.

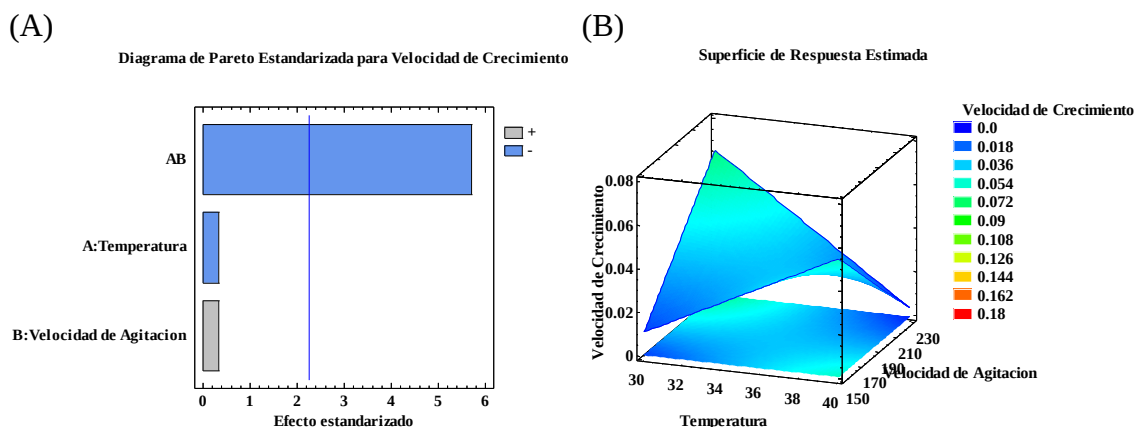


Figura 6. Diagrama de Pareto y Superficie respuesta sobre la velocidad de crecimiento.

Fuente: Statgrafhis Centorum.

En la **tabla 12**, se puede observar la combinación óptima para la velocidad de crecimiento, en el *Bacillus subtilis*. Dado que se tiene factores o combinación de estos que sus efectos provocan diferencias estadísticas significativas. Se procedió a buscar en el programa Statgrafhis Centorum la combinación de los factores que al optimizarlo presentan la mayor velocidad de crecimiento y se encontró que esta combinación corresponde al uso de una temperatura de 30 °C y una velocidad de agitación de 220 rpm. alcanzando un valor óptimo de 0.059% de velocidad de crecimiento.

Tabla 12. Condiciones óptimas para la velocidad de crecimiento del *bacillus subtilis*.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30.0	40.0	30.0
Velocidad de Agitación	150.0	220.0	220.0

Fuente: Statgrafhis Centorum. Velocidad de crecimiento = Coeficiente – Temperatura + Velocidad de agitación – (Temperatura * Velocidad de agitación).

VII. CONCLUSION.

Bajo las condiciones evaluadas se ha determinado que tanto la temperatura, como la interacción entre la Temperatura y la velocidad de agitación son significativos en la cinética de crecimiento. Siendo más determinante la temperatura para la producción de biomasa. Concretamente, una temperatura de 30 °C con una velocidad de agitación 220 rpm favorece la máxima producción de biomasa. Por el contrario, para la velocidad específica de crecimiento celular, únicamente la interacción de los factores temperatura y velocidad de agitación son significativo.

Se determina que la interacción de los factores temperatura y velocidad de agitación tienen una significancia sobre los halos de inhibición. Específicamente una temperatura de 30 °C con una velocidad de agitación de 220 rpm se alcanza la máxima capacidad antagónica del *bacillus subtilis*.

VIII. RECOMENDACIONE.

Mantener una sola temperatura y velocidad de agitación y variar las concentraciones de azúcar en el medio de cultivo.

Analizar la producción de lipopeptidos que produce el *bacillus subtilis* a través de pruebas microbiológicas.

Sustituir el medio definido por diferentes medios complejos para identificar que medio es el que más beneficia la producción de biomasa y la capacidad antagonista del *Bacillus subtilis*.

Investigar diferentes maneras en las cuales el *bacillus subtilis* puede aplicarse a los cultivos agrícolas e identificar cuales tiene una mejor adaptación.

Hacer pruebas de halos de inhibición en hongos que afectan la madera.

Compara la capacidad antagónica del *bacillus subtilis* como controlador biológico ante otros controladores biológicos en los mismos hongos.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- A sequence of changes. (2010). *Nature Reviews Microbiology*, 8(2), 85-85. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2310>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1044-1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Butcher, R. A., Schroeder, F. C., Fischbach, M. A., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., & Clardy, J. (2007). The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1506-1509. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610503104>
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M., Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. En *Pesticides in the Modern World—Pesticides Use and Management*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/17184>
- Chen, X.-H., Koumoutsis, A., Scholz, R., & Borriss, R. (2008). More than Anticipated – Production of Antibiotics and Other Secondary Metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1-2), 14-24. <https://doi.org/10.1159/000142891>

- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *acillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15(3), 848-864. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., Broadbelt, L. J., Hatzimanikatis, V., & Palsson, B. Ø. (2007a). A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular Systems Biology*, 3(1), 121. <https://doi.org/10.1038/msb4100155>
- Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., Broadbelt, L. J., Hatzimanikatis, V., & Palsson, B. Ø. (2007b). A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular Systems Biology*. <https://doi.org/10.1038/msb4100155>
- Fernández-Martínez, L. T., Javelle, A., & Hoskisson, P. A. (2024). Microbial Primer: Bacterial growth kinetics. *Microbiology*, 170(2), 001428. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001428>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022a). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25(0), Article 0. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022b). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25(0), Article 0. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>

- Harwood, C. R., & Wipat, A. (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*, 389(1), 84-87. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00524-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00524-8)
- Hmidet, N., Ben Ayed, H., Jacques, P., & Nasri, M. (2017). Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. *BioMed Research International*, 2017(1), 5893123. <https://doi.org/10.1155/2017/5893123>
- Hummadi, E. H., Cetin, Y., Demirbek, M., Kardar, N. M., Khan, S., Coates, C. J., Eastwood, D. C., Dudley, E., Maffei, T., Loveridge, J., & Butt, T. M. (2022). Antimicrobial Volatiles of the Insect Pathogen *Metarhizium brunneum*. *Journal of Fungi*, 8(4), 326. <https://doi.org/10.3390/jof8040326>
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessi res, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Miyazaki, K., & Mori, H. (2017). Origin of high oxygen reduction reaction activity of Pt₁₂ and strategy to obtain better catalyst using sub-nanosized Pt-alloy clusters. *Scientific Reports*, 7(1), 45381. <https://doi.org/10.1038/srep45381>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Schaeffer, P., Millet, J., & Aubert, J. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(3), 704-711. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.3.704>

Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004a). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>

Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004b). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.01368-07>

Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., & Losick, R. (2001). *Bacillus subtilis*: From Cells to Genes and from Genes to Cells. En *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives* (pp. 1-5). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555817992.ch1>

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>

van Dijl, J., & Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-3>

Xiao, Z., & Xu, P. (2007). Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.1080/10408410701364604>

Zupke, C., Sinskey, A. J., & Stephanopoulos, G. (1995). Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(1-2), 27-36. <https://doi.org/10.1007/BF00164476>

X. ANEXOS.

Anexo 1: Curva de Calibrado de Biomasa.

Reactivos

- NaCl al 0,1 M
- Agua destilada

Equipos

- Centrífuga
- Secador de horno a 85°C
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Cámara de cultivo para incubación
- Baño de agua para ajuste de temperatura

Materiales

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Crisoles o capachos de aluminio
- Tubos de centrifugación 45 mL de plástico
- Pipetas automáticas y puntas estériles
- Papel de aluminio

Procedimiento

- Realizar un cultivo de *Bacillus subtilis* en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 150 rpm y 30°C, asegurando obtener células en la etapa de crecimiento a las 24 horas.
- Tomar 15 mL del caldo de cultivo por duplicado, colocar las muestras en un baño frío y agregar 1 mL de NaCl al 0.1 M.
- Centrifugar las muestras a 7000 rpm durante 15 minutos.
- Resuspender la biomasa dos veces en 15 mL de agua destilada y centrifugar nuevamente a 7000 rpm durante 15 minutos.
- Depositar el pellet de biomasa en capas de aluminio o crisoles previamente secados a 85°C hasta peso constante dentro de 16 horas y pesado.
- Determine la concentración celular por diferencia de peso del capacho o crisol antes y después de secar la muestra a 85°C hasta peso constante, considerando el volumen de 15 mL.

Medición espectrofotométrica:

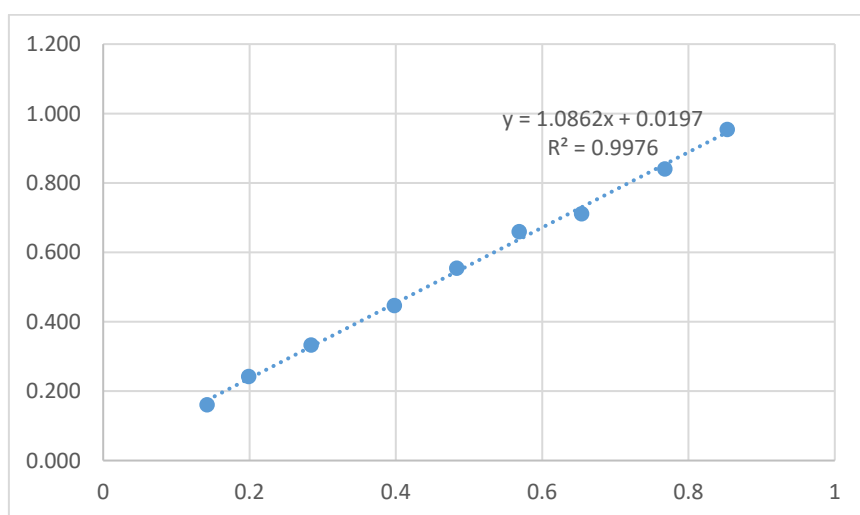
Tomar mL necesarios del caldo de cultivo del matraz y realizar diluciones con factores de dilución de entre 1.67 y 10, asegurándose de que la absorbancia esté entre 0.1 y 0.9.

2. Medir la absorbancia de estas diluciones a 600 nm, utilizando agua destilada como blanco.

Cuadro: Lectura de la ABS del espectrofotómetro

OD 600	Absorbancia (600 nm)	Absorbancia (600 nm)	promedio	DE
0.142	0.157	0.165	0.161	0.01
0.199	0.250	0.235	0.243	0.011
0.284	0.325	0.341	0.333	0.01

0.398	0.461	0.433	0.447	0.02
0.484	0.561	0.548	0.555	0.01
0.569	0.651	0.668	0.660	0.01
0.654	0.703	0.720	0.712	0.01
0.768	0.829	0.852	0.841	0.02
0.853	0.964	0.945	0.955	0.01



Análisis de datos:

- Graficar los valores de absorbancia obtenidos a 600 nm contra la biomasa determinada por peso seco (en g L⁻¹).
- Utilizar la ecuación de la recta obtenida de la gráfica de calibración para determinar la biomasa en futuras muestras.

Ejemplo para Determinación de Biomasa

Datos:

- Ecuación de la recta de calibración: $y = 1.0862x + 0.0197$
- Factor de Dilución (FD): 10
- Absorbancia medida a 600 nm (y): 0.5 (este es un valor de ejemplo)

Paso 1: Calcular la biomasa (x) usando la ecuación de la recta

Primero, despejamos la ecuación para encontrar la concentración de biomasa x:

$$y = 1.0862x + 0.0197$$

$$x = (y - 0.0197) / 1.0862$$

Sustituyendo el valor de la absorbancia $y = 0.5$:

$$x = (0.5 - 0.0197) / 1.0862$$

$$x = 0.4803 / 1.6513 = 0.2908 \text{ g L}^{-1}$$

Paso 2: Ajustar la concentración de biomasa al factor de dilución (FD)

Debido a que la muestra fue diluida 10 veces ($FD = 10$), la concentración real de biomasa en

la muestra original se obtiene multiplicando por el FD:

$$\text{Biomasa} = 0.2908 \text{ g L}^{-1} \times 10 = 2.9 \text{ g L}^{-1}$$



Anexo 2. Siembra de hongos en medios PDA utilizando la escala de turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland.



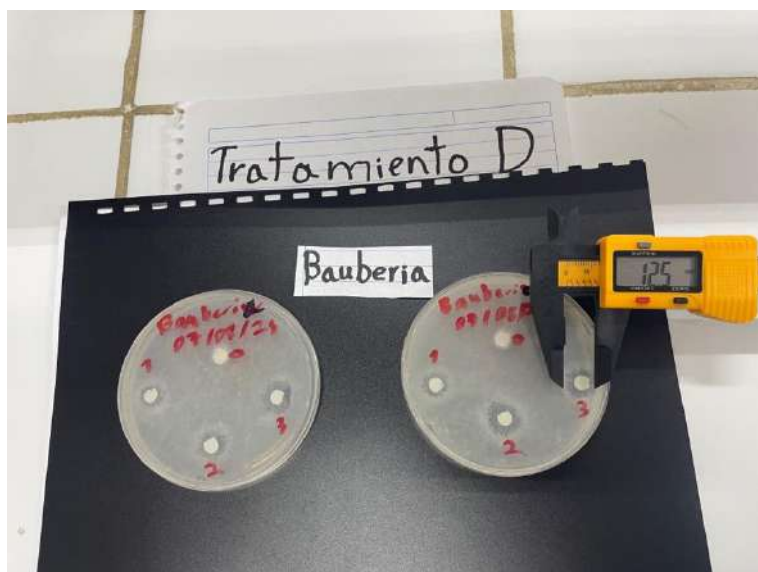
Anexo 3. Medicion de Halos de inhibicion.



Anexo 4. Medicion de biomasa en espectofotometro.



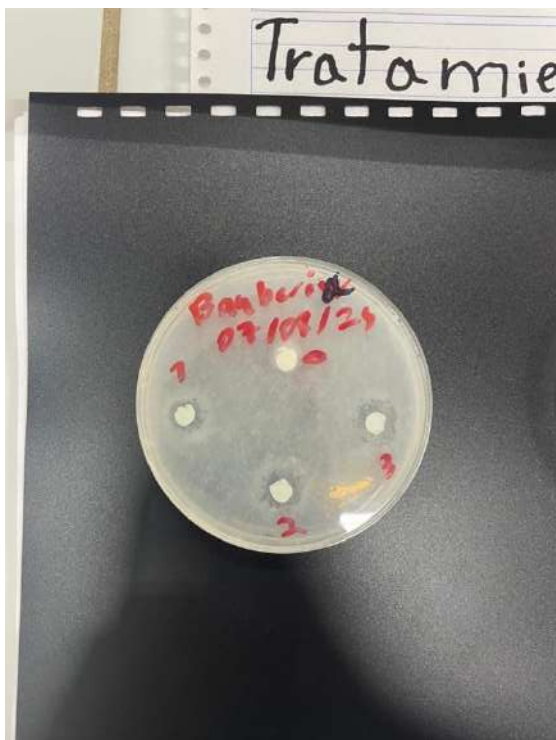
Anexo 5. Ependor con *Bacillus Subtilis* esteriles.



Anexo 6. Medicion del diametro del halo del tratamiento D



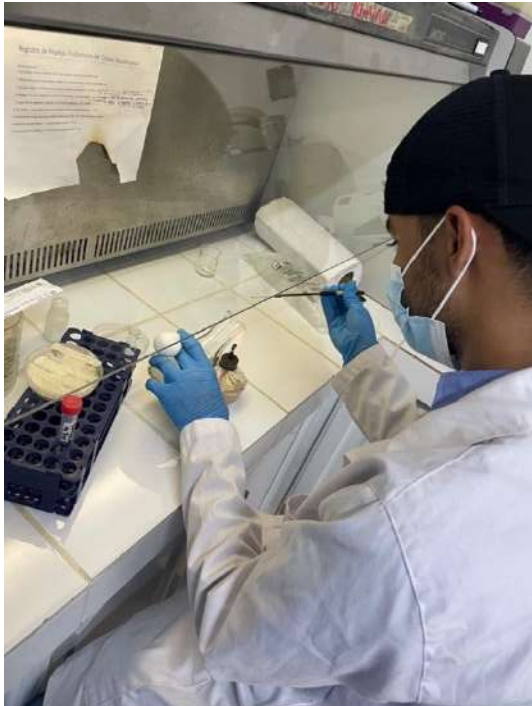
Anexo 7. Pesado de capacho vacio.



Anexo 8. Halos de inhibicion de *bauberia*.



Anexo 9. Hongo *Metarizum* con discos impregnados de *Bacillus subtilis*.



Anexo 10. Preparacion de placas petri con hongos.



Anexo 11. Extencion del matras Inicial a los secundarios.



Anexo 12. Matrazes del tratamiento en la incubadora con agitacion.



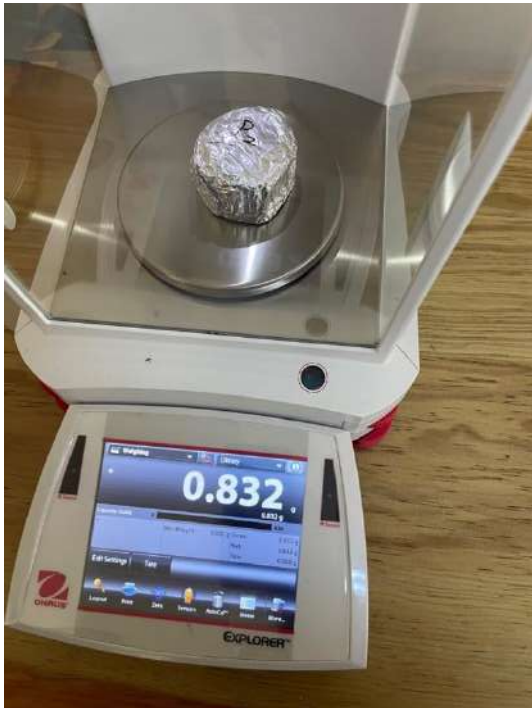
Anexo 13. Placas petri con hongo *Metarizum* con discos impregnados de *Bacillus subtilis*.



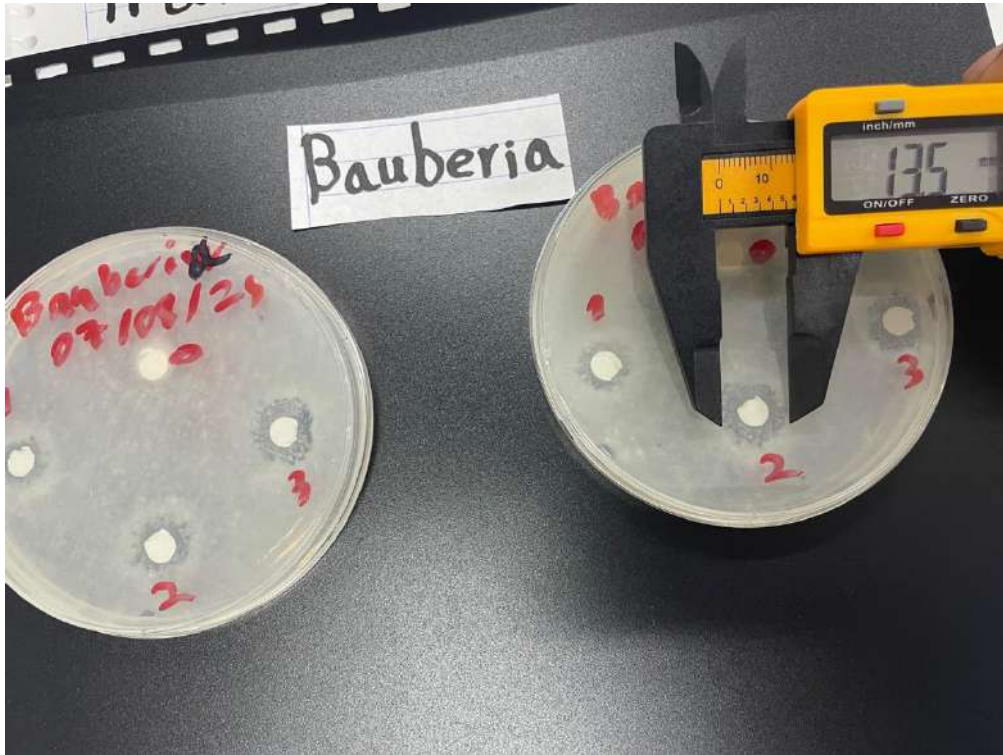
Anexo 14. Placas petri con hongo *Bauberia* con discos impregnados de *Bacillus subtilis* en observacion.



Anexo 15. Placas petri con hongo *Metarizium* con discos impregnados de *Bacillus subtilis* en observacion.



Anexo 16. Pesado de capacho con biomasa seca.



Anexo 17. Medicion de el diametro del halo de inhibicion.