



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGÍSTER
EN AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

**EFFECTO ANTAGONISTA *in vitro* DE *Bacillus* spp SOBRE
HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN
DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

AUTORES:

**DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR
LENIN ANTONIO VERA MACÍAS**

TUTOR:

Mg. SERGIO MIGUEL VÉLEZ ZAMBRANO

COTUTOR:

Mg. CARLOS BANCHON BAJAÑA

CALCETA, AGOSTO 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR y **LENIN ANTONIO VERA MACÍAS**, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR

LENIN ANTONIO VERA MACÍAS

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

ING. SERGIO MIGUEL VÉLEZ ZAMBRANO, certifica haber tutelado el trabajo de titulación: **EFFECTO ANTAGONISTA *in vitro* DE *Bacillus* spp SOBRE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*)**, que ha sido desarrollado por **DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR** y **LENIN ANTONIO VERA MACÍAS**, previo la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Mg. Sergio Miguel Vélez Zambrano

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **EFFECTO ANTAGONISTA *in vitro* DE *Bacillus spp* SOBRE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.)**, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por **DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR** y **LENIN ANTONIO VERA MACÍAS**, previa la obtención del título de Magíster en Agroindustria, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Ing. Sofía Velásquez Cedeño, Mg

MIEMBRO

Ing. Benito Eduardo Valarezo, PhD

MIEMBRO

Ing. Ely Fernando Sacón Vera, PhD

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A Dios por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar este trabajo de investigación. Gracias por su infinito amor y bendiciones.

A mi esposo Lenin Vera Macías por su apoyo incondicional, gracias por tanto amor.

A mis padres César y Antonia, gracias por su motivación, por su cariño, su apoyo, su dedicación y empeño por ayudarme a ser una persona mejor cada día

A mi querida Sra. Tati por su ayuda incondicional, compañía, consejos, gracias por tanto amor.

A mis hermanas por ser mi motivo de superación e inspiración.

A mis cuñadas Leonor y Liceth, gracias por su apoyo siempre estuvieron presente en todo momento.

A todos mis familiares y amigos que de una u otra manera estuvieron pendientes a lo largo de este proceso, brindado su apoyo incondicional.

A mi apreciado tutor Ing. Sergio Vélez gracias por su ayuda y su aporte con sus conocimientos en cada etapa del desarrollo de este trabajo de investigación, su ayuda fue primordial, gracias por estar en todo momento.

Al Ing. Diego Zambrano Pazmiño gracias por su ayuda en el proceso operativo de la tesis y sus enseñanzas.

DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A mi esposa Diana Carolina Cedeño Alcívar, que con su valor y entrega ha sido una persona incondicional en mi vida, ha sido mi soporte, mi mejor amiga, mi consejera, mi apoyo, mi luz, mi guía, mi todo para seguir adelante y no bajar los brazos en los momentos difíciles, sobre todo por amar a Dios, por ser la mujer que Dios me presentó en la vida para ser muy feliz y por su innegable dedicación, amor y paciencia.

A mis padres por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron. Gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ustedes.

LENIN ANTONIO VERA MACÍAS

DEDICATORIA

A mi Señor, Jesús, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo.

A mi esposo Lenin Vera Macías quien, con su apoyo incondicional, paciencia, dedicación y esfuerzo, logró que pudiésemos culminar nuestro trabajo de investigación.

A mis padres Antonia y César quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanas Anny y Keira por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

DIANA CAROLINA CEDEÑO ALCÍVAR

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi amada esposa Diana Carolina, por su apoyo y ánimo que me brinda día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mis hermanos, quienes son mi guía desde mi infancia.

LENIN ANTONIO VERA MACÍAS

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
DEDICATORIA	viii
CONTENIDO GENERAL.....	ix
CONTENIDO DE CUADROS Y ANEXOS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. Planteamiento y formulación del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	4
1.4. Hipótesis	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Presencia de hongos en el ambiente	5
2.1.1. Hongos filamentosos	5
2.1.2. Ocratoxina A (OTA).....	6
2.2. Controles poscosecha en granos de cacao	6
2.2.1. Control de calidad en proceso poscosecha	7
2.2.2. Control biológico	8
2.2.3. Cepas de <i>Bacillus</i> spp como controladores biológicos	8
2.2.4. Dosis de cepas de <i>Bacillus</i> spp	13
2.3. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp sobre hongos.....	13
2.4. Microorganismos utilizados en la investigación	16
2.4.1. Cepas de <i>Bacillus</i> spp	16
2.4.2. Hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao	17
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	23
3.1. Ubicación	23
3.2. Duración.....	23
3.3. Factores en estudio.....	23
3.4. Niveles del factor.....	23

3.5. Tratamientos	23
3.6. Delineamiento experimental	24
3.6.1. Diseño experimental.....	24
3.6.2. Análisis estadístico.....	24
3.7. Unidad experimental	25
3.8. Manejo del experimento	25
3.8.1. Obtención de los hongos filamentosos en muestras de cacao	25
3.8.2 Reactivación de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	28
3.8.3. Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	30
3.9. Variable de respuesta y método de evaluación	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Aislamiento e identificación morfológica de los hongos filamentosos	33
4.1.1. Aislamiento de los hongos.....	33
4.1.2. Identificación de los aislados fúngicos.....	34
4.2. Control <i>in vitro</i> de cepas de <i>Bacillus</i> spp sobre los aislados fúngicos.....	37
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1. Conclusiones	41
5.2. Recomendaciones	41
Bibliografía	42
Anexos.....	51

CONTENIDO DE CUADROS Y ANEXOS

CUADROS:

2. 1. Condiciones de crecimiento de <i>B. subtilis</i>	11
2. 2. Requerimientos nutricionales del <i>B. subtilis</i>	11
2. 3. Características morfológicas y microscópicas de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> spp.	21
3. 1. Niveles de los factores.	23
3. 2. Combinación de los niveles de los factores en estudio.	24
3. 3. Esquema de ADEVA.....	24
3. 4. Codificación de las muestras de granos de cacao de los centros de acopio.....	25
3. 5. Número de hongos aislados por muestra de cacao.	27
4. 1. Número de siembra y coloración de los aislados fúngicos.	33
4. 2. Descripción de las características macroscópicas de los hongos (anverso y reverso).....	34
4. 3. Descripción y observación de las características microscópicas de los hongos.....	35
4. 4. Aislados fúngicos con los respectivos géneros asociados.....	37
4. 5. Promedio del control de las cepas de <i>Bacillus</i> spp sobre los aislados fúngicos (valores transformados mediante la ecuación 3.1).....	38

ANEXOS:

1	Toma de muestras de granos de cacao fermentados	52
2-A	Cámara húmeda en recipientes plásticos	52
2-B	Cámara húmeda en fundas herméticas	53
2-C	Cámara húmeda en recipientes y fundas plásticos	54
2-D	Crecimiento de estructuras fúngicas en cámara húmeda	55
3-A	Aislamiento de estructuras fúngicas de cámara húmeda a medio de cultivo PDA	56
3-B	Crecimiento de aislados fúngicos	57
4-A	Purificación de aislados fúngicos	58
4-B	Siembra de aislados fúngicos purificados en tubos de ensayo de medio PDA	58
5	Crecimiento de aislados fúngicos purificados	59
6	Refrescamiento de los aislados fúngicos	60
7	Identificación morfológica de los aislados fúngicos	61
8-A	Reactivación de las cepas bacterianas	63
8-B	Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	64
8-C	Medición de distancia micelial	65
9-A	Contraste de <i>Bacillus subtilis</i> 31 BMC sobre <i>Aspergillus</i> spp	65
9-B	Contraste de <i>Bacillus subtilis</i> E-44 sobre <i>Penicillium</i> spp	65
10	Crecimiento radial de los aislados fúngicos	66
11	Supuesto de normalidad de los datos	66

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue controlar, en condiciones *in vitro*, el crecimiento de hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao mediante la aplicación de *Bacillus* spp. Los aislados fúngicos se obtuvieron a partir de muestras de granos de cacao provenientes de cuatro centros de acopio de la parroquia Calceta del cantón Bolívar. Se aislaron, purificaron e identificaron morfológicamente mediante técnica de cámara húmeda y preparación de láminas con azul de lactofenol. Las cepas de *Bacillus* spp se tomaron del cepario del laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL, se emplearon cinco cepas de *B. subtilis* (21BMC, 20BP, E-54, 50BP y 31BMC) y una cepa de *B. licheniformis* (E-44) que se aplicaron en dosis de 100 y 200 μ L en cada variante. El experimento se condujo con un Diseño Completamente al Azar y cinco réplicas. Los ensayos de antagonismo *in vitro* se realizaron en cajas de Petri de 90 x 16 mm con medio PDA ajustado a un pH de 7 y autoclavado a 15 psi/15 min. Se identificaron cuatro cepas de hongos, siendo tres de *Aspergillus* y una de *Penicillium* spp. Las cepas que presentaron mayor % de inhibición fueron *B. subtilis* 31BMC sobre las cepas de *Aspergillus* spp (74,43%), y *B. licheniformis* E-44 sobre la cepa de *Penicillium* spp (76,96%), independientemente de la dosis de aplicación. Se concluye que las cepas de *B. subtilis* 31BMC y *B. licheniformis* E-44 son microorganismos promisorios para el control de hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao.

PALABRAS CLAVE

OTA, poscosecha de cacao, aislamiento, enfrentamiento dual, microorganismos, inhibición.

ABSTRACT

The objective of this research was to control, *in vitro* conditions, the growth of filamentous fungi associated with the fermentation of cocoa through the application of *Bacillus* spp. The fungal isolates were obtained from samples of cocoa beans from four collection centers in the Calceta parish of Bolívar canton. They were isolated, purified and morphologically identified by means of a wet chamber technique and preparation of sheets with lactophenol blue. The strains of *Bacillus* spp. Were taken from the molecular Biology Laboratory of ESPAM MFL, five strains of *B. subtilis* (21BMC, 20BP, E-54, 50BP and 31BMC) and a strain of *B. licheniformis* (E-44) were used that were applied in doses of 100 and 200 μ L in each variant. The experiment was conducted with a Completely Random Design and five replicas. The *in vitro* antagonism assays were performed in 90 x 16 mm Petri dishes with PDA medium adjusted to a pH of 7 and autoclaved at 15 psi/15 min. Four strains of fungi were identified, three of *Aspergillus* and one of *Penicillium* spp. The strains that showed the highest % inhibition were *B. subtilis* 31BMC on the strains of *Aspergillus* spp (74.43%), and *B. licheniformis* E-44 on the strain of *Penicillium* spp (76.96%), regardless of the dose of application. It is concluded that the strains of *B. subtilis* 31BMC and *B. licheniformis* E-44 are promising microorganisms for the control of filamentous fungi associated with the fermentation of cocoa.

KEY WORDS

OTA, Cocoa post-harvest, isolation, dual confrontation, microorganisms, inhibition.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Según el Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones-Ecuador [PRO-ECUADOR] (2018) se estima que del total de la exportación ecuatoriana de cacao el 75% corresponde a fino de aroma y el 25% a las demás variedades. Ecuador es el tercer productor y exportador mundial de este grano y representamos alrededor del 12% de participación en el comercio internacional (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao-Ecuador [ANECACAO], 2018).

ESPAC (2016) indicó que el cacao se produce en 21 provincias del país. Se destacan Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas y el Oro con 80% del volumen producido (como se citó en ANECACAO, 2018), mientras que el resto se distribuye en las provincias de Chimborazo, Bolívar, Cotopaxi, Pichincha, Azuay, Sucumbíos, Orellana, Napo y Zamora Chinchipe (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2018).

En el Ecuador existen 150337 productores de cacao distribuidos en 56387 hectáreas (ha) (Mar, 2018). Los cantones Bolívar, Chone, Portoviejo, Junín y Tosagua pertenecientes a la provincia de Manabí contribuyen con 2115 ha de este cultivo. La corporación Fortaleza del Valle ubicada en Calceta, cantón Bolívar acopia actualmente alrededor de 600 t/anual con aproximadamente 961 productores distribuidos en los cantones mencionados.

La producción que llega a los centros de acopio es sometida a varios procesos que consiste en la recepción del cacao en baba, fermentación, secado, preselección del grano seco y almacenamiento. La fermentación tiene una duración de 5-7 días (Hii, Law, Cloke y Suzannah, 2009). La primera etapa de la producción de chocolate consiste en una fermentación microbiana natural de la pulpa pectinácea que rodea los granos (Schwan y Wheals, 2004). Los microorganismos que intervienen en el proceso fermentativo se desarrollan en sucesión: primero levaduras, luego bacterias lácticas, seguidas por acéticas y, finalmente, por esporulados aeróbicos (Cascante, García y Marín, 1991).

Los hongos filamentosos crecen en la etapa final de la fermentación del cacao produciendo Ocratoxina A (OTA). Las OTA causan efectos nefrotóxicos, inmunosupresores, carcinogénicos y teratogénicos en el ser humano (Ravelo, Armendáriz, Gutiérrez, y Hardisson, 2011), específicamente el género *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius* son productores de OTA en el cacao (World Health Organization [WHO] y Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer [IARC], 1993).

Toaza (2012) encontró contaminación por Ocratoxina A con niveles de 10 µg/kg en muestras de cacao en las provincias de Esmeraldas, El Oro, Los Ríos y Guayas, evidenciando la presencia de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Epicoccum* y *Alternaria* como principales causantes de estas toxinas.

Los granos contaminados por estos microorganismos, inciden en el aspecto visible de las almendras presentando características físicas defectuosas asociadas a granos mohosos y sabores indeseables que llegan hasta el chocolate, una alternativa en el campo agroindustrial para la reducción e inhibición de estos agentes patógenos es el control con las bacterias del género *Bacillus* spp como antagonista.

Con los antecedentes anteriormente citados se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es la eficacia *in vitro* de las cepas de *Bacillus* spp en el control de los hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de *Bacillus subtilis* ha reportado antagonismo sobre *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeoconiella chlamydospora*, y también ha mostrado actividad antifúngica sobre *Verticillium dahliae* y *Botryosphaeria rhodina* (Alfonzo, Conigliaro, Torta, Burruano, y Moschetti, 2009). Estudio realizado por Nawaz et al. (2018) han demostrado que cepas de *Bacillus licheniformes* tienen capacidad antagónica en la germinación del micelio de *Colletotrichum gossypii*. En Ecuador se ha reportado que *B. subtilis* posee

actividad antifúngica frente a *Colletotrichum acutatum* tanto en tratamientos *in vitro* e *in vivo* (Samaniego, 2016).

La metodología desarrollada se aplicó a nivel *in vitro* con la utilización de cepas *Bacillus* spp como antagonistas. En el estudio se emplearon dos niveles de dosis 100 μ L y 200 μ L, el primer nivel está basado en la experimentación de Figueiredo et al. (2010) y Sukkasem, Kurniawan, Kao, y Chuang, (2018) y el segundo nivel está fundamentado en lo estudiado por Chitarra, et al. (2003) en ambas investigaciones se han reportado la capacidad antagónica que poseen las cepas de *Bacillus* spp.

Las cepas de *Bacillus* spp actualmente la están aplicando en las carreras de Ingeniería Agrícola y Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL. Estudio efectuado por Gutiérrez (2017) empleó *B. subtilis* en la crianza de pollos Cobb 500 para mantener en un nivel óptimo los parámetros inmunológicos obteniendo como resultados que el suministro de este microorganismo en la alimentación de aves ayuda a mejorar los parámetros inmunológicos, así como a disminuir el porcentaje de mortalidad.

Este estudio procede del programa de cacao de la unidad de docencia, investigación y vinculación de la carrera de Ingeniería Agrícola y forma parte del proyecto “Caracterización morfológica, molecular y patogénica de hongos asociados a plagas cultivadas en Manabí”, el cual se ejecuta dentro del grupo de investigación PROINBIO de la ESPAM MFL. Además, este proyecto corresponde a la línea de investigación del programa de la maestría en agroindustria, (aprobado en la ESPAM MFL): Desarrollo de procesos y/o productos agroindustriales, así como también, se alinea al perfil de egreso de maestría investigativo el cual hace énfasis en lo siguiente: Optimiza los procesos agroindustriales en micro, pequeñas y medianas empresas a fin de mejorar sus ingresos, contribuyendo al desarrollo local.

Esta investigación aporta con el Plan Nacional de Desarrollo 2017 – 2019. Toda una vida. Eje 2: Economía al Servicio de la Sociedad. Objetivo 6: Desarrollar las capacidades productivas y del entorno para lograr la soberanía

alimentaria y el Buen Vivir Rural, y con los objetivos del Milenio (ONU), objetivo 12 (Producción y consumo responsables).

El estudio deja un impacto positivo en la Zona de Planificación 4–Pacífico (provincias: Manabí y Santo Domingo de Los Tsáchilas), debido a que son escasos los estudios de antagonismo *in vitro* para controlar microorganismos indeseables en el proceso fermentativo del cacao; sin duda, los resultados promisorios contribuirán a futuras investigaciones para que efectúen la aplicación *in situ* donde se beneficiarán los acopiadores de cacao, fabricantes de chocolates y consumidores. Los acopiadores mejorarán el proceso de fermentación inhibiendo el crecimiento de hongos filamentosos, los fabricantes elaborando productos libres de OTA y el consumidor adquiriendo productos saludables.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Controlar el crecimiento de hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao mediante la aplicación de *Bacillus* spp en condiciones *in vitro*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar morfológicamente los hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao.
- Determinar las cepas de *Bacillus* spp más eficaces en el control *in vitro* sobre los hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao.

1.4. HIPÓTESIS

Las cepas de *Bacillus* spp controlarán eficazmente a los hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao en condiciones *in vitro*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. PRESENCIA DE HONGOS EN EL AMBIENTE

Los hongos se encuentran presentes en todos los ambientes que tengan las condiciones favorables para su desarrollo, el crecimiento de estos microorganismos es promovido principalmente por condiciones cálidas y húmedas (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA], 2010). La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el establecimiento de los hongos. Estos se desarrollan a partir de valores de actividad de agua [aw] de 0,60 y 0,70; mientras que la temperatura óptima se encuentra entre 25 y 30°C y el límite máximo entre 40 y 45°C, aunque existen especies como *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus* que se desarrollan a 55°C. Los hongos toleran un gran intervalo de pH entre 2,5-7,5 (Gimeno, 2002).

Una investigación realizada en Ecuador reportó que los géneros que mayormente prevalecen en el ambiente son *Aspergillus* sp (≈53%), *Cladosporium* sp (≈ 17%), y *Penicillium* sp (≈28%) en época seca con una temperatura [T] de 18 – 20°C y una humedad relativa [HR] de 33 a 55%, mientras que en la época lluviosa (T: 17 a 19°C y HR: 53 a 70%) las condiciones ambientales son mucho más favorables para que exista una mayor cantidad de brotes fúngicos (Mayorga y Flores, 2018).

2.1.1. HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos son aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente (Arias, Espinosa y Andera, 2008). De acuerdo con Moreno (2000) estos microorganismos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, su desarrollo en sustratos puede ser con concentraciones de azúcares elevados, hasta el 10%, debido a que estos microorganismos no son sensibles a la presión osmótica elevada; creciendo muy lentamente de 5 a 7 días, y resistiendo condiciones de acidez relativamente altas (pH entre 2 - 9, óptimo 5 - 6) (como se citó en Arias et al., 2008).

Estudios han reportado el desarrollo de hongos filamentosos al final de la fase alcohólica y los géneros identificados son *Penicillium*, *Exosporiella*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *Curvularia*, *Mucor* y *Hormodendrum* (Cascante et al., 1991).

2.1.2. OCRATOXINA A (OTA)

La OTA es una toxina generada por hongos especialmente del género *Aspergillus* y *Penicillium*, con propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas (Malir, Ostry, Pfohl y Novotna, 2013). Se ha demostrado que la mayor concentración de hongos productores de OTA se encuentran en la etapa final de la fermentación del cacao, descartando la presencia en la cosecha, secado y almacenado (Ramos et al., 2016). La Unión Europea establece que los requisitos de OTA para productos de cacao es de 2 µg/kg para cacao en polvo y en chocolate 1 µg/kg (Ravelo et al., 2011).

Estudios de Copetti et al. (2014) han reportado presencia del 5% de OTA en muestras de cacao fermentado (como se citó en Ramos et al., 2016). Igualmente, en estudio efectuado en Ecuador se encontró la presencia de 14% de OTA en muestras analizadas de cacao (1,66 µg/kg–5,53 µg/kg) (Toaza, 2012). Además, se ha determinado presencia de 96,6% de OTA en chocolates artesanales expendidos en Cuenca, este efecto se lo atribuye al deficiente control poscosecha de cacao (Bonilla, 2013).

2.2. CONTROLES POSCOSECHA EN GRANOS DE CACAO

FUNDACITE (2000) indica que el control poscosecha constituye parte fundamental y decisiva para obtener una buena calidad del grano y permitir su correcta comercialización. El manejo adecuado desarrolla en las almendras los principios fundamentales del sabor y aroma inconfundibles del cacao, lo que determina en gran medida su condición de finos y aromáticos, es decir la calidad del producto final (como se citó en Bermúdez y Mendoza, 2015).

Reyes, Vivas y Romero (2000) definen al control poscosecha como el conjunto de prácticas interrelacionadas que tienen que ver con la transformación

biológica que deben sufrir las almendras de cacao (como se citó en Sánchez, 2007).

2.2.1. CONTROL DE CALIDAD EN PROCESO POSCOSECHA

De acuerdo con Calderón (2002) el proceso poscosecha del cacao es el factor de mayor influencia en el desarrollo del sabor y aroma a chocolate, sea cual sea su condición genética. Este proceso incluye dos fases: la fermentación y el secado (como se citó en Bermúdez y Mendoza, 2015).

- **Fermentación**

July y Vargas (2010) indican que la fermentación de los granos de cacao es la etapa más importante (como se citó en Camino, 2014); sin embargo, no existen controles sobre las masas de cacao que se fermentan ni sobre el proceso poscosecha en general (Bermúdez y Mendoza, 2015). La fermentación puede realizarse de diferentes formas, las más comunes utilizadas en Ecuador son: cajas de madera, sacos de cabuya, montones y marquesinas. El proceso de fermentación es importante ya que este se debe efectuar durante 48 horas, luego hacer la remoción y dejarlo nuevamente 48 horas (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro [AGROCALIDAD], 2012).

Según Reyes et al. (2000) los granos de cacao sobre fermentados dan lugar a almendras con olores pútridos, desagradables, provenientes de la fermentación prolongada que originan la formación de ácido butírico y almendras mohosas, esto se produce al fermentar granos, provenientes de frutos enfermos, o cuando durante el proceso de fermentación aparecen hongos sobre la masa de cacao en fermentación, provenientes de la contaminación de las mismas cajas, pilas o canastos donde se fermentan los granos (como se citó en Bermúdez y Mendoza, 2015).

- **Secado**

De acuerdo con La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] (2007) este proceso debe ser realizado únicamente mediante la luz solar; sin embargo, dependiendo de las condiciones del sitio del

proceso, es necesario utilizar métodos artificiales de secado que no contaminen el cacao, como son los secadores a gas (como se citó en Bermúdez y Mendoza, 2015).

2.2.2. CONTROL BIOLÓGICO

Yáñez (2004) manifiesta que el control biológico es la manipulación directa e indirecta por parte del hombre a los agentes vivos que de forma natural tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca un aumento de su capacidad de ataque sobre las enfermedades (como se citó en Pérez y Zorrilla, 2017).

El control biológico en los problemas poscosecha se puede lograr con ciertas cepas de virus, bacterias, levaduras y hongos antagónicos. Los mecanismos de acción son muy diversos, y varios mecanismos pueden actuar simultáneamente. Los mecanismos incluyen la competencia por nutrientes y nichos, antibiosis por medio de antimicrobianos y enzimas líticas, metabolitos inhibidores volátiles, disminución del pH, parasitismo e inducción de respuestas de defensa en el producto vegetal cosechado (Montesinos, Francés, Badosa y Bonaterra, 2015).

Falconí (2007) indica que la aplicación del control biológico representa una de las alternativas eficientes para controlar hongos patógenos. Los estudios que han realizado con suspensiones de *B. subtilis*, *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas putida* dieron indicio de eficiencia bacteriana para el control de *Moniliophthora roreri* en cacao (como se citó en Pérez y Zorrilla, 2017).

Pérez y Zorrilla (2017) demostraron tener control de *moniliasis* en mazorcas de cacao usando los microorganismos *B. subtilis* y *Trichoderma harzianum* obteniendo el mayor porcentaje de frutos sanos con el 82,58%.

2.2.3. CEPAS DE *Bacillus* spp COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS

Mondino y Silvana (2006) mencionan que las bacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos biológicos que existen como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, y están presentes en la rizosfera (como se citó en Pérez y Zorrilla, 2017). De acuerdo con Petras y Casida

(1985) las bacterias del género *Bacillus* poseen gran potencial para ser usadas como agentes de control biológico, pues mantienen su viabilidad cuando están almacenadas por largos períodos (como se citó en Figueiredo et al., 2010).

Rosa da Silva y Gomes (2016) evaluaron el efecto de bacterias del género *Bacillus* spp. sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus* los resultados obtenidos en este estudio mostraron características prometedoras de *Bacillus* spp. para ser utilizados como agentes de biocontrol en *A. flavus* en sistemas agroecológicos de maíz. Los aislados fueron capaces de reducir el crecimiento de hongos y la capacidad de dispersión *in vitro* en granos de maíz, así como reducir la producción aflatoxina AFB1 en las condiciones probadas; además, los aislados fueron capaces de mantener el dominio en la interacción con *A. flavus*, incluso en condiciones de temperatura y de estrés hídrico.

Estudios de Kupper et al. (2003) reportaron que aislados de *Bacillus* spp han inhibido el crecimiento de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la caída prematura de los frutos cítricos (*Citrus*), tanto bajo condiciones *in vitro* como *in vivo* (como se citó en Figueiredo et al., 2010).

- ***Bacillus subtilis***

Es una rizobacteria presente en el suelo en un promedio de aproximadamente 10^8 células/gramo (Stein, 2005). Posee baja o nula toxicidad para el medio ambiente y no es patógeno para los seres humanos (Chen et al., 2013). *B. subtilis* es una bacteria gram positiva (Cristiano, Serrano y Galindo, 2011) con forma de bastón, presenta bajos requerimientos nutricionales para su crecimiento, posee resistencia a condiciones ambientales adversas, irradiación y desecación (Kunst et al., 1997), a agentes químicos (solventes, ácidos, desinfectantes, etc.) y enzimáticos (lisozima, mutanolisina) (López, 2002).

De acuerdo con Jiménez y Baheza (2005) *B. subtilis*, tiene la capacidad de formar esporas en diversas condiciones de estrés, presenta motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevive en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), produce una amplia variedad de antibióticos, lipopéptidos cíclicos de las familias surfactina, iturina y fengina (Cawoy et al.,

2015) y enzimas hidrolíticas extracelulares, tales como quitinasas y otras enzimas que degradan la pared celular (Sadfi, Cherif, Hajlaoui, Boudabbous y Belanger, 2002).

Microchem Laboratory (2018) informa que los *B. subtilis* secretan antibióticos durante la esporulación para aumentar las posibilidades de supervivencia del microorganismo y matar a los microorganismos competidores.

- **Metabolismo de inactivación sobre hongos**

El metabolismo de *B. subtilis* es predominantemente respiratorio, siendo el oxígeno el aceptor terminal de electrones, por tanto, en presencia de oxígeno resulta abundante crecimiento con la formación de 2,3-butanodiol, acetoína y CO₂ como productos principales (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales y Sánchez, 2011). La identificación de los productos de fermentación mediante el uso de exploraciones de resonancia magnética nuclear in vivo de cultivos enteros indicó que *B. subtilis* crece por fermentación mixta ácido-butanodiol pero no produce formato (Nakano, Dailly, Zuber y Clark, 1997).

Estudio realizado por Nakano y Zuber (1998) han demostrado que *B. subtilis* crece anaeróbicamente, ya sea usando nitrato o nitrito como aceptor de electrones terminal. En ausencia de aceptores de electrones externos, crece por fermentación. También se ha reportado que *B. subtilis* tiene la ventaja de disminuir los tiempos de fermentación en alimentos fermentados con soja acortando los tiempos de fermentación de 2-3 días a 40°C, además, se ha evidenciado que el valor nutricional y la vida útil de estos alimentos mejoraron (Lee, Kim y Lee, 2018).

- **Condiciones de crecimiento**

En el cuadro 2.1. se evidencia que este microorganismo crece a pH de 4–9,5 y temperaturas desde los 4 hasta los 50°C (Trimulyono, 2018). De acuerdo con Jiménez y Baeza (2005) *B. subtilis* crece en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C).

Cuadro 2. 1. Condiciones de crecimiento de *B. subtilis*.

Parámetros	Efecto en crecimiento
	<i>B. subtilis</i>
pH	4–9,5
Temperatura °C	4–30–50

Calvo y Zuñiga (2010) han reportado que *B. subtilis* se desarrolló a bajas temperaturas (4, 10, 15 y 20°C), además, observaron que el 100% de las cepas, crecieron en pH 4 y 5,5, lo que evidenció una buena adaptación del crecimiento a pH ácidos.

- **Requerimientos nutricionales**

En el cuadro 2.2. se observa que las fuentes de carbono de este microorganismo es la glucosa, sacarosa, harina de maíz y el almidón, así como las fuentes de nitrógeno son peptona, polvo de levadura, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ y sales minerales como MgSO₄, FeSO₄, CaCO₃ y KH₂PO₄ (Álvarez y Sánchez, 2016).

Cuadro 2. 2. Requerimientos nutricionales del *B. subtilis*.

Fuentes de carbono	glucosa, sacarosa, harina de maíz y almidón.
Fuentes de nitrógeno	peptona, polvo de levadura, NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ NO ₃ , KNO ₃ , NaNO ₃ y sales minerales MgSO ₄ , FeSO ₄ , CaCO ₃ , KH ₂ PO ₄ .

- **Esporulación**

López (2002) ha demostrado que, en condiciones de inanición nutricional, *B. subtilis* deja de crecer e inicia respuestas para restaurar el crecimiento al aumentar la diversidad metabólica. Estas respuestas incluyen la inducción de la motilidad y la quimiotaxis, y la producción de hidrolasas macromoleculares (proteasas y carbohidrasas) y antibióticos. Si estas respuestas no logran restablecer el crecimiento, las células son inducidas a formar endosporas químicamente resistentes a irradiación y desecación (Kunst et al., 1997), a agentes químicos (solventes, ácidos, desinfectantes, etc.) y enzimáticos (lisozima, mutanolisina) (López, 2002).

Según Nicholson et al. (2000) la resistencia de las esporas al calor húmedo está determinada en gran medida por el contenido de agua del núcleo de la espora, que es mucho menor que en el protoplasto de la célula en crecimiento. El bajo contenido de agua del núcleo reduce la capacidad de la radiación ionizante para generar radicales hidroxilos dañinos. Además, menciona que las esporas son también 10 a 50 veces más resistentes que las células en crecimiento a la radiación UV a 254 nm, la longitud de onda más eficiente para la muerte de esporas (como se citó en Setlow, 2006).

- ***Bacillus licheniformis***

B. licheniformis es una bacteria Grampositiva en forma de bastón, tiene un alto parecido genómico con *B. subtilis* (Veith et al., 2004). Gibson y Gordon (1974) indican que *B. licheniformis* es anaerobio facultativo (como se citó en Rodríguez, Cousin y Nelson, 1992), este microorganismo se desarrolla bajo condiciones ambientales extremas, además, posee la capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas extracelulares directamente al medio de cultivo en condiciones aeróbicas (Dueñas, Tengerdy y Gutiérrez, 1995).

- **Metabolismo de inactivación sobre hongos**

B. licheniformis exhibe actividad antifúngica y presenta la producción de forlantibiótico y 2,3-butanediol (Sukkasem et al., 2018).

- **Condiciones de crecimiento**

El medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *B. licheniformis* tiene la siguiente composición: sacarosa (3,0%), peptona (1,0%), K_2HPO_4 (0,2%), $MnSO_4$ (0,005%) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1%) (Dong, Zhang, Zhang, Li y Jin, 2010). *B. licheniformis* tiene la capacidad de tolerar altas temperaturas ($>55^\circ C$), pH (6-8) y concentraciones de sal (hasta 8%), y las propiedades de resistencia a los antibióticos de los aislamientos antagonistas termófilos de *Bacillus* pueden mantenerlos como posibles candidatos de control biológico, especialmente bajo estrés (Pawar y Borkar, 2018).

2.2.4. DOSIS DE CEPAS DE *Bacillus* spp

Sukkasem et al. (2018) disolvieron un gramo de compost que contenían cepas de *B. subtilis* en 100 mL de agua esterilizada y la solución resultante la diluyeron en serie de dosis de 10^4 y 10^6 . Luego, colocaron 100 μ L de la dilución en medio agar nutriente y las placas se incubaron a 28°C.

Figueiredo et al. (2010) colocaron 100 μ L de *B. subtilis* en placas que contenían medio Luria-Bertani (LB) y medio agar GC-Lect BD (BDA) semisólidos e incubados por 7 a 30 días a 28°C.

Saltos et al. (2018) han realizado la activación de cada una de las cepas inoculadas en agar nutritivo por el método de agotamiento en superficie, incubándolo durante 24 horas a 37°C. Luego del período de incubación han extraído una colonia aislada para la multiplicación del cultivo celular.

Corrales et al. (2014) han sembrado las cepas aisladas de *Bacillus* spp en tubos con agar nutriente inclinado para su respectiva multiplicación, realizaron la incubación durante 24 h a 37°C, posteriormente tomaron una porción de cada una de las cepas y las inocularon en 100 mL de caldo nutriente durante 24 h a 37°C y este cultivo representó la dilución madre.

Chitarra, et al. (2003) colocaron 200 μ L de *B. subtilis* en medio Plate Count Agar (PCA) las placas se incubaron durante 3 días a 30°C y, posteriormente, se midió el diámetro de la zona de inhibición. Todos los experimentos se llevaron a cabo con dos réplicas por hongo.

2.3. ANTAGONISMO *in vitro* DE *Bacillus* spp SOBRE HONGOS

De acuerdo con Pérez, Terrón y Muñoz (2014) el antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos (causa la muerte por envenenamiento) o negativos a la otra. Lisboa (2003) ha reportado que *B. subtilis* actúa evitando la germinación de esporas de patógenos; interrumpe el

crecimiento del tubo germinativo y del micelio. Además, esta bacteria ha demostrado inducir una resistencia contra patógenos y fungosos.

Ramos (2014) ha realizado ensayos *in vitro* de efecto antagonista de *B. subtilis* sobre *S. sclerotium* en cajas de Petri con medio PDA, colocando una porción de 5 mm de diámetro de micelio del hongo crecido previamente a 27°C durante 7 días en medio PDA. En uno de los extremos de la caja agregó 0,1 mL de caldo de cultivo. La muestra la incubó durante 3 días a 37°C y midió los diámetros de crecimiento del micelio. El efecto antagonista lo reportó como el porcentaje de inhibición de *B. subtilis* sobre *S. sclerotium*, calculado mediante la ecuación [2.1]. Nawaz et al. (2018) indica que la zona de inhibición debe ser medida y analizada manualmente después de un periodo de 7 días de la incubación.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{DMCT * 100}{DMST} \quad [2.1.]$$

En donde,

- DMCT: Distancia de crecimiento micelial con tratamiento antagonista.
- DMST: Distancia de crecimiento micelial sin tratamiento antagonista.

Bharose y Gajera (2018) han efectuado prueba antagonista de *Bacillus* spp. sobre *A. flavus*, cultivando el aislado fúngico en 20 mL de PDA durante 7 días, culminado este tiempo de crecimiento cortaron y extrajeron discos de 5 mm de diámetro de los bordes de crecimiento de las colonias y las transfirieron a otras placas con medio PDA. El hongo de prueba se colocó en el centro de la placa y aproximadamente a 3 cm de distancia se colocó *Bacillus* spp. de manera extendida en forma redonda alrededor del hongo. Las placas inoculadas se incubaron a una temperatura de 28°C y se observaron después de 10 días. Al final del período de incubación, se midió el crecimiento radial y se determinó el índice de antagonismo de acuerdo con la ecuación [2.2.] aplicada por Zarrín et al. (2009) (como se citó en Bharose y Gajera 2018).

$$\% \text{ inhibición del crecimiento} = \frac{C - T}{C} * 100 \quad [2.2.]$$

Donde:

- C: diámetro de colonia del patógeno en control.
- T: diámetro de colonia del patógeno en placa de inhibición

Abeyasinghe (2009) demostró que *B. subtilis* inhibió el crecimiento radial de colonias de *Sclerotium rolfsii* Sacc, así como la germinación de esclerocios del patógeno *in vitro*, indicando la presencia de compuestos antifúngicos en el extracto de cultivo. Además, en este estudio se comprobó que *B. subtilis* posee no solo potencial protector sino también erradicador.

Estudios de Bacon et al. (2001) han demostrado que *B. subtilis* es capaz de reducir los niveles de micotoxinas acumuladas en las semillas de maíz por *Fusarium moniliforme*. Baldotto et al. (2010) y Raupach y Kloepper (1998) reportaron que *B. subtilis* redujo la incidencia de *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. y otros patógenos en la patata dulce (*Beta vulgaris* L.) y los tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (como se citó en Figueiredo et al., 2010).

Sukkasem et al. (2018) examinó la actividad antagonista de *B. licheniformis* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* mediante ensayos de cultivo dual, colocando 8 mm de diámetro de colonia crecida de *C. gloeosporioides* en el centro de medio PDA y la cepa bacteriana probada se colocó a 25 mm del centro del medio en ambos lados. La cantidad de bacterias utilizadas en el experimento fue de 10×10^8 UFC/mL. Este cultivo dual se incubó a 28°C durante 4 días. Este cultivo dual se incubó a 28°C durante 4 días. La tasa de inhibición del micelio en porcentaje se calculó utilizando la ecuación [2.3].

$$\% \text{ inhibición del crecimiento} = \frac{1-T}{C} * 100 \quad [2.3.]$$

Donde:

- C: diámetro del micelio en control.
- T: diámetro del micelio en placa de inhibición.

B. licheniformis disminuyó 98% de maíz contaminado con ZEA (zearalenona), además, esta cepa no fue hemolítica, no produjo enterotoxinas, y mostró altos

niveles de xilanas extracelular, celulasa, y actividades de proteasa. Este estudio demostró que *B. licheniformis* podría usarse para reducir las concentraciones de ZEA y mejorar la digestibilidad de nutrientes en piensos a la vez (Yi, Pai y Liu, 2011). Además, *B. licheniformis* demostró que degrada la aflatoxina B1 (AFB1) de manera eficiente (He et al., 2018).

Estudios realizados por Dusane et al. (2013) han reportado que *B. licheniformis* posee actividad antimicrobiana contra la patógena *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *B. pumilus*. Además, Bohm et al. (2000) y Petchkongkaew et al. (2008) han demostrado que *B. licheniformis* inhibe el crecimiento de *Aspergillus* y degrada la aflatoxina B1 (AFB1) y ocratoxina A (OTA) (como se citó en Yi et al., 2011).

Gao et al. (2018), en su estudio empleó *B. licheniformis* como probiótico para la supervivencia y el crecimiento de abulón de disco evidenciando que el alimento que contenía 10^5 UFC/mL de este microorganismo promovió la ingesta de alimentos y el crecimiento de estos y también mejoró su resistencia a la infección por *Vibrio parahaemolyticus*. Por lo que se demostró que *B. licheniformis* es un buen probiótico potencial.

2.4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN

2.4.1. CEPAS DE *Bacillus* spp

Las cepas de *Bacillus* spp se encuentran en el cepario de bacterias en el laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL, estas cepas han sido aisladas de ambientes poco perturbados y pasaron por un tiempo extenso de selección e identificación. Estas cepas se encuentran conservados en glicerol al 20% y a -20°C (Saltos, Solórzano y Zambrano, 2018). Uno de los trabajos para la obtención del cepario fue el realizado por Arteaga et al. (2017) quienes aislaron, seleccionaron e identificaron cepas del ciego de pollos de traspatio (*Gallus domesticus*) obteniendo 75 aislados de *Bacillus* spp, de las cuales solamente dos (20BP y 50BP) sobrevivieron a la acción del pH ácido y de sales biliares, presentaron actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas y fueron sensibles a 14 antimicrobianos. Estos dos aislados, fueron identificados

como *B. subtilis* ssp y *B. subtilis*, mostraron potencial para ser utilizados como probióticos.

2.4.2. HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL CACAO

Los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* spp se encuentran en las almendras de cacao que cumplen el proceso de fermentación en los centros de acopio ubicados en la parroquia Calceta del cantón Bolívar.

Técnicas de aislamiento de hongos

De acuerdo con Cuervo, Espadas y Zita (2018) para el aislamiento de los hongos filamentosos existen varias técnicas de aislamiento, tales como: aislamiento directo, partes vegetales en medio de cultivo y cámara húmeda.

Aislamiento directo

Si se observan las fructificaciones o el micelio en el ejemplar enfermo, se toma una muestra de este material con una aguja de disección estéril y se coloca en directo sobre el medio de cultivo. Se incuba a 24°C y se observan resultados después de 4 a 5 días.

Partes vegetales en medio de cultivo

La porción vegetal que muestra los síntomas se desinfecta con una solución de cloro (NaOCl) y agua destilada estéril 5:1. Se enjuaga con agua destilada estéril y se coloca en cajas de Petri con medio de cultivo. Se incuba a 24°C y se observan resultados después de 4 a 5 días.

Cámara húmeda

Cuando las partes vegetales afectadas presentan micelio, pero no hay fructificaciones, o cuando no se aprecia el crecimiento del patógeno, se recurre al uso de la cámara húmeda. Se toma una porción del tejido enfermo y se desinfecta en una solución de hipoclorito de cloro (NaOCl) y agua destilada

estéril 5:1. Se enjuaga con agua destilada estéril y se coloca en cajas de Petri con un papel filtro en su interior, previamente esterilizadas. Se humedece con agua destilada estéril y se tapa la caja. Se incuba a 24°C y se observan resultados después de 4 a 5 días.

Franco et al. (2014) aisló hongos filamentosos de granos desinfectándolos con hipoclorito de sodio al 3 y 1% sumergiéndolos por 10 segundos aproximadamente, luego en alcohol al 90-70-40-10% por 10 segundos cada uno y por último se sumergen en agua destilada estéril. Después de esta desinfección se colocan 4 granos en cajas individuales de Agar PDA (como se citó en Cajiao, 2017).

Posterior a esto según Abarca (2000); Carrillo (2003); Guevara et al. (2007) y Rojas (1997) indican que las cajas se incuban a 25°C durante 3-5 días; finalizado este tiempo se revisan las cajas periódicamente y si el crecimiento de hongos es positivo, se realizan las resiembras necesarias para obtener cultivos puros y proceder a su caracterización morfológica (como se citó en Cajiao, 2017).

Barnett y Hunter (1998) y López et al. (1998) seleccionaron bulbos con signos de moho azul en campo, posteriormente fueron colocados en cámaras de germinación sobre una bandeja de aluminio con papel filtro húmedo durante un periodo de 4 a 5 días, hasta el crecimiento del hongo. Los hongos fueron recuperados y transferidos a placas Petri con medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa, a razón de 2 mL de ácido láctico al 10% por 100 mL de medio) y se incubaron a 28–30°C por 72 horas. Seguidamente se realizó la caracterización e identificación a partir de la observación del crecimiento, color y aspecto de las colonias; por último, se identificaron a través de las claves taxonómicas para hongos imperfectos (como se citó en Astorga, Zuñiga y Rivera, 2014).

- **Identificación morfológica de hongos**

De acuerdo con la Norma Técnica Peruana 488 [NTP] (1998) la identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas. Las semejanzas macroscópicas, tales

como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación. En general, la morfología microscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. La identificación definitiva se basa en la forma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante conocer el tamaño y la disposición de las hifas. La preparación del material para la observación microscópica puede realizarse en fresco, con cinta de celofán adhesiva o mediante cultivo sobre portaobjetos.

Preparación en fresco

Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:

1. Seleccionar una colonia aislada.
2. Calentar a la llama el alambre de un asa de siembra, y doblar de forma que se convierta en un objeto cortante.
3. Con la ayuda del asa, extraer un fragmento triangular de la colonia que contenga además un poco de agar en la parte inferior.
4. Depositar el fragmento extraído sobre un portaobjetos en el cual, previamente, se ha depositado una gota de azul de lactofenol.
5. Cubrir con un cubreobjetos y presionar suavemente para dispersar la colonia y el agar; de esta forma, la muestra está disponible para su observación al microscopio.

Este procedimiento es el que utilizan la mayoría de los laboratorios, ya que las muestras se preparan con facilidad y rapidez; además permite identificar muchas de las especies de hongos más habituales. El mayor inconveniente de la observación en fresco es que se puede alterar el ordenamiento característico de las esporas al presionar con el cubreobjetos, por lo que este procedimiento no es válido en los casos en que es necesario conocer la disposición de las esporas.

Preparación con cinta de celofán adhesiva

El procedimiento se muestra a continuación:

1. Apoyar el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de una colonia.
2. Colocar la cinta bien extendida sobre una gota de azul de lactofenol o azul de anilina colocada, a su vez, sobre un portaobjetos.
3. Observar al microscopio para conocer la forma y ordenamiento característico de las esporas.

Este método puede considerarse como el más simple, económico y adecuado para la identificación de hongos, recomendable para los laboratorios microbiológicos de cualquier nivel. La preparación de la cinta transparente permite observar al microscopio como se desarrolla el microorganismo en el cultivo. Generalmente las esporas se mantienen intactas y la identificación se realiza con facilidad. Una de las desventajas de este método es que, si la cinta transparente no se presiona con suficiente firmeza sobre la superficie de la colonia, la muestra no es adecuada, ya que al no quedar bien adherida la cinta, las esporas o las hifas no se pueden identificar. En los casos en que mediante este método no se observen esporas deberá realizarse la preparación en fresco.

Cultivo sobre portaobjetos

Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:

1. Cortar un bloque pequeño de un medio sólido adecuado (agar), que ha sido vertido en una cápsula de Petri, hasta una altura de 2cm. El bloque puede cortarse con la ayuda de un bisturí estéril o con un tubo de ensayo estéril sin reborde (lo que permite obtener un taco redondo).
2. Colocar un portaobjetos estéril sobre una capa de agar al 2% contenida en una cápsula de Petri.
3. Colocar el bloque de agar sobre el portaobjetos.
4. Con una espátula de siembra cuyo alambre ha sido doblado en ángulo recto, inocular los cuatro cuadrantes del taco con el microorganismo a identificar.
5. Colocar un cubreobjetos estéril sobre la superficie del bloque de agar.
6. Tapar la cápsula de Petri que contiene el cultivo e incubar a 30°C.

7. Finalizado el período de incubación, retirar el cubreobjetos (este proceso debe realizarse en una cabina de seguridad biológica), y colocarlo en un portaobjetos que contenga azul de lactofenol o azul de anilina.
8. La observación al microscopio permite distinguir la forma y disposición de las esporas.
9. Si con este proceso no ha sido posible la identificación, el resto del cultivo puede ser usado más adelante si se continúa incubando. Entonces se retira el bloque de agar y se agrega una gota de azul de lactofenol o azul de anilina sobre la zona del cultivo y se coloca un cubreobjetos sobre ella. Es recomendable realizar dos cultivos sobre el mismo portaobjetos de modo que si en uno no se pueden observar las características microscópicas puede disponerse del segundo después de un período adicional de incubación.

Este método permite la observación microscópica del hongo mientras se desarrolla directamente debajo del cubreobjetos, de forma que las características microscópicas se distinguen con facilidad, las estructuras se mantienen intactas y puede observarse un gran número de áreas representativas.

• Identificación de principales hongos filamentosos

Las características morfológicas y microscópicas de las colonias de *Aspergillus* (Ministerio de Salud del Perú [MSP] e Instituto Nacional de Salud [INS], 2010) y *Penicillium* spp. (Link, 1809 como se citó en Fundación Química Argentina [FQA], 2018) se muestran en el cuadro 2.3.

Cuadro 2. 3. Características morfológicas y microscópicas de *Aspergillus* y *Penicillium* spp.

Características de las colonias	<i>Aspergillus</i> spp	Hongo filamento
Morfológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Colonias de rápido desarrollo sobre ASD o agar Czapek a 25 y 37°C. • Las colonias poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. • La textura de las colonias es granular, aterciopelada, afelpada, vellosa o algo plegada, con margen blanquecino o beige. • El reverso de la colonia es incoloro o 	<ul style="list-style-type: none"> • Las colonias son de crecimiento rápido, filamentosas y vello • Son inicialmente blancas y luego se convierten en verde az • El reverso de la colonia es pálido o amarillento.

	crema.	
Microscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Los conidióforos son de pared lisa, hialina o pigmentada y miden de 1,5 a 3 mm de largo y de 15 a 20 mm de diámetro. • La vesícula es globosa con 50-100 mm de diámetro y produce fiálides alrededor de ella. • Las fiálides son biseriadas, las ramas primarias miden 30 mm de largo y pueden estar tabicadas, mientras que las secundarias son cortas y miden 8 mm de longitud, a partir de las cuales brotan los conidios, los cuales son globosos y rugosos con 4 a 5 mm de diámetro, de color castaño o marrón a negro 	<ul style="list-style-type: none"> • Las especies de <i>Penicillium</i> (excepto <i>Penicillium marneffii</i>) producen mótulas, fiálides y conidias. • Las mótulas son ramificaciones secundarias que se forman en la punta de los conidióforos. • Las mótulas acarrear fiálides en forma de frasco. • La organización de las fiálides en la punta de los conidióforos es en forma de frasco. • Las conidias (2,5-5μ de diámetro) son redondas, unicelulares y se reproducen por gemación.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en cuatro centros de acopio de cacao de la parroquia de Calceta y en el laboratorio de Biología Molecular ubicado en la carrera de Medicina Veterinaria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López [ESPAM MFL], ubicada en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí.

3.2. DURACIÓN

El presente estudio tuvo una duración de 6 meses desde diciembre 2018 hasta mayo 2019.

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

- **Factor a:** Cepas de *Bacillus* spp
- **Factor b:** Dosis de cepas de *Bacillus* spp

3.4. NIVELES DEL FACTOR

Los niveles del Factor a y el Factor b se presentan en el cuadro 3.1.

Cuadro 3. 1. Niveles de los factores.

Factor a	Factor b
a1: <i>B. subtilis</i> 21BMc	
a2: <i>B. subtilis</i> 20BP	
a3: <i>B. subtilis</i> E-54	b1: 100 µL
a4: <i>B. subtilis</i> BP-50	b2: 200 µL
a5: <i>B. subtilis</i> 31BMc	
a6: <i>B. licheniformis</i> E-44	

3.5. TRATAMIENTOS

La combinación de los niveles de los factores en estudio da como resultado los tratamientos que se muestran en el cuadro 3.2.

Cuadro 3. 2. Combinación de los niveles de los factores en estudio.

Tratamientos	Códigos	Descripción	
		Cepas de <i>Bacillus</i> spp	Dosis (μ L)
T1	a1*b1	21BMC	100
T2	a1*b2	21BMC	200
T3	a2*b1	20BP	100
T4	a2*b2	20BP	200
T5	a3*b1	E-54	100
T6	a3*b2	E-54	200
T7	a4*b1	50BP	100
T8	a4*b2	50BP	200
T9	a5*b1	31BMC	100
T10	a5*b2	31BMC	200
T11	a6*b1	E-44	100
T12	a6*b2	E-44	200

3.6. DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

3.6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un Diseño Completamente al Azar [DCA] con arreglo factorial a*b, con 12 tratamientos y 5 réplicas. En el cuadro 3.3. se muestra el esquema de análisis de varianza bifactorial a*b.

Cuadro 3. 3. Esquema de ADEVA.

Fuente de variación	g libertad
Total	59
Factor a	5
Factor b	1
a*b	5
Error	48

3.6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de la principal variable respuesta se les efectuó los supuestos del ANOVA, normalidad (Kolmogorov smirnov), debido a que la variable en estudio no cumplió con los supuestos del ANOVA, se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Anexo 11). Para el tratamiento de los datos se utilizó el software estadístico *Infostat* versión 2018 (Di Rienzo et al., 1998).

3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituida por cajas de Petri de 90 x 16 mm. En cada caja de Petri se colocó 20 mL de agar papa dextrosa [PDA].

3.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para el cumplimiento de los objetivos de esta investigación se desarrollaron los siguientes procedimientos:

3.8.1. OBTENCIÓN DE LOS HONGOS FILAMENTOS EN MUESTRAS DE CACAO

- **Toma de muestra**

Se recolectaron granos de cacao de cuatro centros de acopio de la parroquia Calceta del cantón Bolívar. Las muestras de cacao fueron recolectadas en fundas plásticas herméticas y llevadas al laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL (Anexo 1).

- **Cámara húmeda**

Se utilizaron fundas y recipientes plásticos previamente esterilizados para someter a las almendras de cacao a cámara húmeda (Anexo 2). Este método consistió en colocar dentro de los recipientes una servilleta humedecida con agua destilada y posteriormente se colocaron los granos de cacao con un peso promedio de 1,2 g. La cantidad de granos de cacao colocados fueron de 20 a 25 granos por cámara húmeda. Esto se dejó en incubación a 37°C durante ocho días. Se dejaron dos muestras por cámara húmeda (fundas herméticas y recipientes plásticos), codificadas como se indica en el cuadro 3.4.

Cuadro 3. 4. Codificación de las muestras de granos de cacao de los centros de acopio.

Centro de acopio Anahí	CA-1.1.
	CA-1.2.
Centro de acopio Eddy Zamora	CE-1.1.
	CE-1.2.
Centro de acopio Fortaleza del Valle	CF-1.1.
	CF-1.2.
Centro de acopio Hugo Zamora	CH-1.1.
	CH-1.2.

- **Aislamiento y siembra de hongos**

Para el aislamiento se utilizó alcohol al 70% para desinfectar el área de trabajo. Se procedió a flamear la aguja en la llama del mechero hasta llegar al rojo vivo. Posteriormente, de las muestras colocadas dentro de las cámaras húmedas se observó aquellas donde existía un notable crecimiento fúngico y se tomó una pequeña porción de este tejido y se colocó en medio de cultivo PDA. Este procedimiento se repitió para las muestras de los cuatro centros de acopio. En total se dejaron sembrados 16 micelios en medio PDA, se sembró tres puntos por cada micelio en el medio de cultivo, obteniendo finalmente 48 cajas de Petri (Anexo 3).

- **Purificación de hongos**

Para la purificación de los hongos se procedió a preparar medio PDA (39 g/L) al cual se le agregó Gentamicina como antibiótico (600 μ L/1000 mL), con la finalidad de impedir el crecimiento de bacterias. Se aisló el micelio con una aguja previamente esterilizada y se procedió a realizar la siembra en medio PDA + Gentamicina. Luego, se dejó en incubación a 24°C durante 5 días, finalizado el tiempo de incubación se observaron los resultados (Anexo 4).

- **Siembra de hongos purificados en tubos de ensayo**

Para efectuar este procedimiento se prepararon 200 mL de medio PDA y se colocaron 4 mL de medio en los tubos de ensayo. Posteriormente, se esterilizaron a 120°C durante dos horas, finalizada la esterilización se dejaron reposar inclinados para la formación de la cuña y se llevaron a refrigeración.

La siembra de los hongos purificados en tubos de ensayo, primero se encendió el mechero, luego se flameó el asa de platino hasta llegar al rojo vivo y se flameó el tubo con medio PDA con cuña previamente efectuada, específicamente se flameó la boquilla del tubo. Se repitió el mismo procedimiento y se colocaron en una gradilla.

Para tomar una nueva muestra de hongo se procedió a flamear el asa de platino y de nuevo se flameó la boquilla del tubo de ensayo con medio PDA.

Finalmente, se dejaron los tubos de ensayos con la siembra de hongos durante cinco días y el día seis se procedió a la revisión del crecimiento de los hongos. La revisión del crecimiento de los hongos se reportó con la codificación que se indica en el cuadro 3.5.

Cuadro 3. 5. Número de hongos aislados por muestra de cacao.

Muestras	Número
CA-1.1 (1) *	1
CE-1.1 (1) *	3
CE-1.1 (2) *	3
CE-1.2 (1) *	3
CE-1.2 (1) *	4
CE-1.2 (2) *	4
CF-1.1 (1) *	2
CF-1.1 (2) *	1
CF-1.2 (1) *	2
CH-1.2 (1) *	2
CH-1.2 (2) *	2
CH-1.2 (3) *	1
CH-1.2 (4) *	2

*número de siembra de micelios.

Los 26 hongos reportados fueron observados minuciosamente para seleccionar las cepas puras, se descartaron seis cepas de hongos debido a que se evidenció el crecimiento de otros hongos. Las 20 cepas de hongos seleccionadas se almacenaron en refrigeración para proceder a efectuar la identificación morfológica y los ensayos de antagonismo *in vitro* (Anexo 5).

• **Identificación morfológica de hongos**

La identificación macroscópica se efectuó revisando las características de los hongos crecidos en las cajas de Petri. Las características que se observaron fueron forma de la colonia, crecimiento, color y textura del anverso, asimismo se observó el color en el reverso de la placa.

La identificación microscópica se realizó colocando una gota de azul de lactofenol en el centro de un portaobjeto previamente esterilizado, luego se tomó con un asa de platino una parte de una colonia y se transfirió al portaobjeto con la gota de azul de lactofenol. Posteriormente, se colocó un cubreobjeto sobre la muestra (Anexo 7).

Finalmente, se colocó en la platina del microscopio y se observaron las principales estructuras de los hongos. Luego, que se culminó con ambas identificaciones se procedió a reportar los resultados descritos y con evidencias fotográficas de las características macroscópicas y microscópicas.

3.8.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Bacillus* spp

Las cepas de *Bacillus* spp. fueron tomadas del cepario del laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL, se emplearon cinco cepas de *B. subtilis* y una cepa de *B. licheniformis*. Las cepas de *B. subtilis* que se emplearon fueron: 21BMc, 20BP, E-54, 50BP y 31BMc y la cepa de *B. licheniformis* E-44.

- **Reactivación de cepas en tubos Eppendorf**

La reactivación de las cepas de *Bacillus* spp se efectuó tomando cada cepa previamente almacenada en un tubo eppendorf, luego se llevó el tubo a refrigeración para posteriormente ser inoculadas, antes de la inoculación las cepas se llevaron a agitación en un vortex. La inoculación se efectuó colocando 100 μ L de cada cepa en 25 mL de caldo nutriente (pH 7), posteriormente se dejó en incubación a 37°C por 180 rpm, durante 12-14 horas, a este inóculo se le denominó muestra madre (Anexo 8-A).

Posteriormente, se procedió a tomar 1,5 μ L de la muestra madre para colocar en 30 tubos eppendorf, los tubos se llevaron a centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos, luego se eliminó el sobrenadante con una micropipeta con mucho cuidado dejando íntegro el pellet, el pellet obtenido se resuspendió en solución agua de peptona (1 mL), luego de colocada el agua de peptona se procedió a realizar un segundo centrifugado a 10 000 rpm durante 5 minutos, culminado este procedimiento se eliminó nuevamente el sobrenadante. Luego, se resuspendió nuevamente en agua de peptona (1 mL) y se llevó a agitación en el vortex para homogenizar el agua de peptona con el pellet, de este líquido homogenizado se tomó 0,1 mL para inocular en 100 mL de caldo nutriente + 5 g de cloruro de sodio. El inóculo se dejó en incubación a 37°C por 180 rpm durante 12-14 horas.

Culminada la inoculación se tomó 1 mL de inóculo para incorporar en un tubo eppendorf, luego se llevó a centrifugar a 10 000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante dejando íntegro el pellet, se agregó 1 mL de glicerol al 20%, posteriormente se homogenizó en vortex y se llevó a conservar a -20°C.

El procedimiento de reactivación antes descrito se realizó para las 6 cepas utilizadas obteniendo un total de 30 tubos eppendorf por cada cepa, dando un total de 180 tubos eppendorf, los cuales se conservaron a -20°C en cajas de almacenamiento de tubos eppendorf previamente esterilizadas con alcohol y rayos UV en la cámara de flujo laminar.

- **Reactivación de cepas en tubos Falcon**

La reactivación de cepas en tubos Falcon se realizó preparando 600 mL de caldo nutriente + 5 g de cloruro de sodio, luego se colocaron 100 mL de medio de cultivo en 6 Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizados. El pH del caldo nutriente se ajustó a 7 para la reactivación de las cepas bacterianas.

Los Erlenmeyer con 100 mL fueron inoculados con 100 µL de inóculo bacteriano de la muestra madre y se procedió a incubar a 37°C por 180 rpm, durante 12-14 horas, culminada la incubación se procedió a colocar 45 mL de inóculo bacteriano en un tubo Falcon y se conservó en refrigeración, el procedimiento antes descrito se realizó para las 6 cepas bacterianas.

La preparación de medio para reactivación de cepas incluyó caldo nutriente (13 g/L), cloruro de sodio (5 g/L) y agua de peptona (peptona 10 g/L; cloruro de sodio 5g/L; fosfato dipotásico 1,5 g/L).

- **Pruebas de tinción gram**

Las pruebas de tinción gram se efectuaron con la finalidad de obtener cepas puras para el enfrentamiento dual.

Tinción gram para bacterias crecidas en medio líquido

Se realizó tomando una gota del inóculo de bacteria para luego colarlo en un portaobjeto previamente esterilizado y flameado en el mechero, luego se selló con la llama y se procedió a realizar la tinción gram que consistió en:

1. Colocar cristal violeta durante 1 minuto.
2. Realizar un lavado con agua destilada.
3. Colocar lugol durante 1 minuto.
4. Realizar un lavado con agua destilada.
5. Colocar alcohol cetona durante 20 segundos.
6. Colocar safranina durante 1 minuto.
7. Realizar un lavado con agua estilada.

Tinción gram para bacterias crecidas en medio sólido

Se colocó una gota de agua estéril en un portaobjeto previamente esterilizado, luego se tomó una colonia del medio inoculado con la bacteria con un asa de platina previamente flameada hasta llegar al rojo vivo. Posteriormente, el portaobjeto se flameó con la muestra colocada hasta que se secase y luego se procedió hacer el procedimiento de la tinción gram antes descrito.

3.8.3. ENSAYOS DE ANTAGONISMO *in vitro*

Para realizar los ensayos de antagonismo *in vitro* primero se refrescaron las cepas de los hongos que quedaron en refrigeración en tubos de ensayo con cuña y luego se procedió a realizar el enfrentamiento dual (Anexo 8-B).

Refrescamiento de aislados fúngicos

El procedimiento para refrescar los aislados fúngicos se efectuó de la siguiente manera (Anexo 6).

1. Se preparó medio de cultivo PDA (39 g/L) el cual fue previamente autoclavado a 120 psi/15 minutos.
2. Posteriormente se plaquéó el medio de cultivo en las cajas de Petri previamente esterilizadas.

3. Luego se tomó un asa de platino y se flameó en el mechero hasta llegar al rojo vivo, asimismo se tomó el tubo de ensayo que contenía la cepa de hongos que se requería refrescar, se le retiró el tapón de gasa y se flameó la boquilla en el mechero.
4. Se introdujo el asa previamente esterilizada en el tubo y se tomó un micelio del hongo crecido y se colocó en la caja de Petri que contenía medio PDA, haciendo tres puntos en el medio de cultivo dando la unión para formar un triángulo.
5. Finalmente, se selló con Parafilm la caja de Petri con la muestra sembrada y se dejó en incubación a 37°C durante 5 días.

Enfrentamiento dual

El enfrentamiento dual *in vitro* se efectuó en cajas de Petri de 90 x 16 mm con medio PDA ajustado a un pH de 7 y autoclavado a 120 psi/215 minutos. Los ensayos de enfrentamiento dual se realizaron mediante los siguientes procedimientos:

1. Se inocularon las cajas de Petri según las dosis establecidas 100 μ L y 200 μ L de las cepas de *Bacillus* spp con el uso de micropipetas.
2. Luego, se disolvió la dosis inoculada en la caja de Petri con un asa drigalski de vidrio previamente esterilizada
3. Posteriormente, se dejó secar durante 15-25 minutos.
4. Luego de culminado el tiempo de secado del inóculo bacteriano, se colocó en el centro de la placa 5 mm de diámetro de micelio del hongo crecido previamente a 37°C durante 5 días en medio PDA.
5. Finalmente, se sellaron las cajas de Petri con Parafilm y se dejaron en incubación a 37°C durante 3 días.
6. Culminado el periodo de incubación se midieron los diámetros de crecimiento del hongo con el uso de calibrador VERNIER y se determinó el porcentaje de inhibición.

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la ecuación [3.1.], aplicada en la experimentación realizada por Ramos, (2014); Bharose y Gajera, (2018).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{DMCT * 100}{DMST} \quad [3.1].$$

En donde,

- DMCT: Distancia de crecimiento micelial con tratamiento antagonista.
- DMST: Distancia de crecimiento micelial sin tratamiento antagonista.

3.9. VARIABLE DE RESPUESTA Y MÉTODO DE EVALUACIÓN

La principal variable evaluada en el estudio fue:

- Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento de los hongos filamentosos.

El método de evaluación que se utilizó para medir el % de inhibición se evaluó en función de cuál es el efecto que tiene la bacteria sobre el hongo, este efecto se expresó en longitud (mm) usando un calibrador VERNIER donde se tomaron dos medidas de distancia de crecimiento micelial, esta medición se realizó de forma horizontal y vertical, tomado en cuenta que la caja de Petri es redonda se marcaron dos puntos uno que representó el lado horizontal y el otro el lado vertical, estos dos datos se promediaron y se obtuvo el resultado en longitud (mm) para luego representarlo en porcentaje (%) de inhibición aplicando la ecuación 3.1 (Anexo 8-C).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

4.1.1. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

El aislamiento de los hongos se realizó una vez culminado el proceso de incubación de las almendras de cacao en la cámara húmeda, se observó que en los recipientes plásticos los hongos se desarrollaron de mejor manera, presentando una mejor visibilidad de estructuras fúngicas con coloraciones blancas, negras, verdes, amarillas y con vellosidades. Las cámaras húmedas en fundas herméticas se descartaron, debido a que no generaron un medio adecuado para el desarrollo de los hongos. Dado el crecimiento de algunas estructuras fúngicas en las cámaras húmedas seleccionadas se procedió a sembrar de la siguiente manera: (Cuadro 4.1).

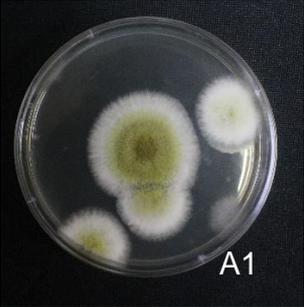
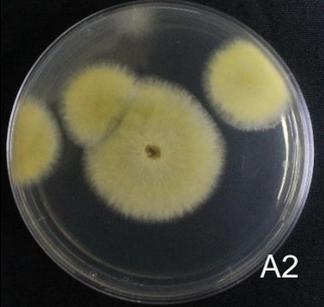
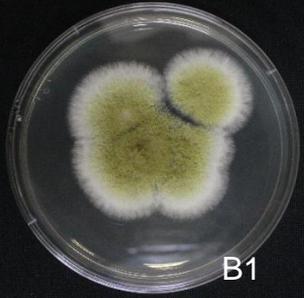
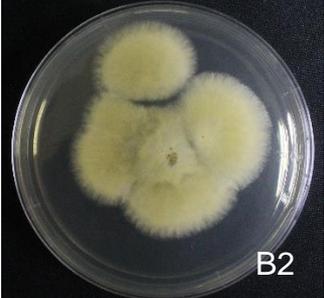
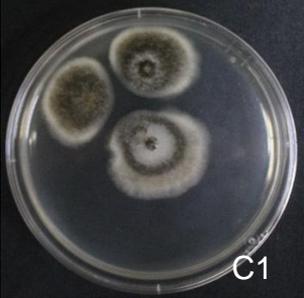
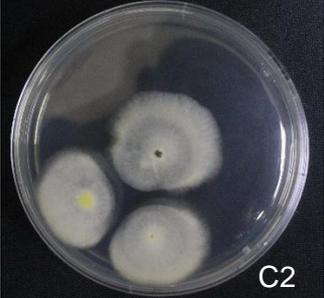
Cuadro 4. 1. Número de siembra y coloración de los aislados fúngicos.

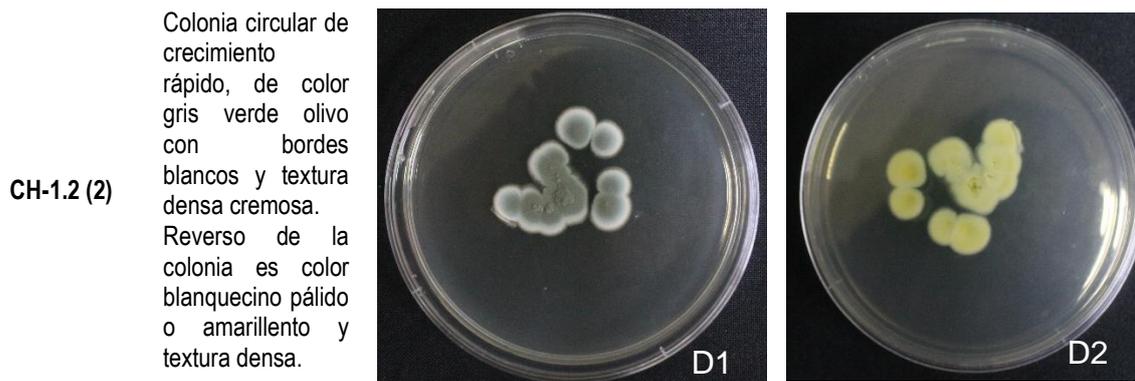
Codificación de los hongos	Número de siembra	Características macroscópicas de las colonias
CA-1.1.	4	Blanco
CA-1.2.	1	Blanco
CE-1.1.	4	Amarillo Verde Negro Blanco
CE-1.2.	5	Negro muy alto Negro bajo Verde Blanco Amarillo
CF-1.1.	1	Verde Blanco
CF-1.2.	1	Verde Blanco
CH-1.1.	2	Verde
CH-1.2.	2	Verde

4.1.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

De los cuatro centros de acopio de la parroquia Calceta del cantón Bolívar se aislaron 20 cepas de hongos las cuales resultaron tener características macroscópicas similares (Cuadro 4.2), por lo que se agruparon finalmente en cuatro cepas, las cuales presentaron características iguales en el anverso y reverso de las colonias. La descripción de macroscópica del anverso y reverso de los hongos filamentosos aislados se muestran en el cuadro 4.2.

Cuadro 4. 2. Descripción de las características macroscópicas de los hongos (anverso y reverso).

Aislado	Estructuras fúngicas (anverso y reverso)	Anverso	Reverso
CF-1.1 (1)	<p>Colonia irregular algodonosa de crecimiento rápido, de color verde con bordes blanco y textura algodonosa elevada. Reverso color blanco pálido y amarillento.</p>	 <p>A1</p>	 <p>A2</p>
CE-1.1 (1)	<p>Colonia irregular de color verde olivo y textura densa y algodonosa. Reverso de la colonia es una combinación de color blanco pálido y amarillento.</p>	 <p>B1</p>	 <p>B2</p>
CE-1.2 (1)	<p>Colonia de rápido crecimiento, color negro, con textura algodonosa. Reverso de color blanco pálido.</p>	 <p>C1</p>	 <p>C2</p>



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, ESPAM MFL.

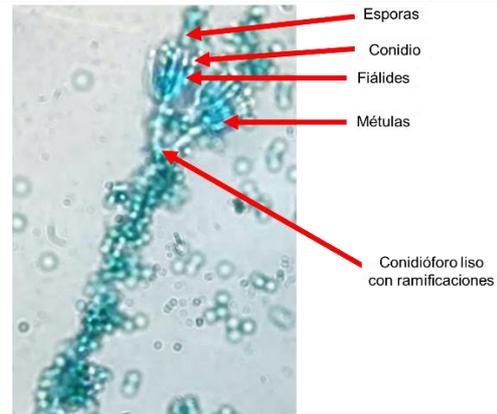
Las características microscópicas de las cuatro cepas de hongos aislados se describen en el cuadro 4.3.

Cuadro 4.3. Descripción y observación de las características microscópicas de los hongos.

Aislado	Características microscópicas	Observaciones microscópicas
CF-1.1 (1)	Presentación de conidióforo liso, vesícula globosa, sobre la vesícula se observa la formación de mótulas, sobre las mótulas formaciones de fiálides y abundantes conidios formados sobre los fiálides y presencia de esporas a su alrededor.	<p>Fiálides Mótulas Conidios Esporas Conidióforo liso</p>
CE-1.1 (1)	Presentación de conidióforo liso, vesícula globosa, sobre la vesícula se observa la formación de mótulas, sobre las mótulas formaciones de fiálides y abundantes conidios formados sobre los fiálides y presencia de esporas a su alrededor.	
CE-1.2 (1)	Presentación de conidióforo liso, conidio globoso ligeramente rugoso de color negro y presencia de esporas a su alrededor.	<p>Conidióforo liso Conidio rugoso Esporas</p>

CH-1.2 (2)

Presentación de conidióforo liso con ramificaciones, métulas formadas sobre las ramificaciones de los conidióforos, fiálides formadas sobre las métulas y micro conidios simples formados en las métulas y presencia de esporas. La coloración de las métulas, fiálides y micro conidios se presentaron de color blanco pálido, se evidencia a su alrededor la presencia de esporas.



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, ESPAM MFL.

En las observaciones microscópicas los géneros encontrados pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que las características de los aislados fúngicos son similares a lo establecido por Samson et al. (2014) y Seifert, Morgan, Gams y Kendrick (2011) quienes indican que los géneros de *Aspergillus* producen conidios además de las típicas cabezas conidiales y la presentación de cabezas biseriadas más grandes son características de los géneros *Penicillium*.

The University of Adelaide [UA] (2019) menciona que las principales características para identificar al género *Aspergillus* es la morfología de las cabezas de conidios, el color marrón oscuro a negro que estas tienen, la pared rugosa y con métulas dos veces más largas que las fiálides, radiantes y biseriadas. Las características anteriormente citadas están en relación con las encontradas en este estudio (Cuadro 4.2-C1).

Además, existen géneros de *Aspergillus* que presentan extensiones de colonias de color amarillo verdoso, estípites de pared rugosa, vesículas maduras que contienen fiálides en toda su superficie. Las estípulas de conidióforos son hialinas y ásperamente rugosas, a menudo más perceptibles cerca de la vesícula. Los conidios son globulares a subglobosos (3-6 μm de diámetro), verde pálido y visiblemente echinados (UA, 2019). Estas características están en correspondencia con las encontradas en este estudio (cuadro 4.2-A1; B1). El reverso de la colonia es incoloro o crema, lo anteriormente citado tiene relación con lo encontrado en esta investigación (Cuadro 4.2-A2; B2 y C2).

El autor anteriormente citado manifiesta que en el género *Penicillium* las colonias suelen ser de crecimiento rápido, en tonos verdes. Microscópicamente, las fiálides pueden producirse individualmente, en grupos o a partir de métulas ramificadas, dando una apariencia similar a un cepillo (un *penicilo*).

El *penicilo* puede contener tanto ramas como métulas (penúltimas ramas que llevan una espiral de fiálides). Todas las células entre las métulas y las estípulas de los conidióforos se denominan ramas. Los conidióforos son hialinos, lisos o de pared rugosa. Las características anteriormente expuestas corresponden a lo obtenido en este estudio (cuadro 4.2-D1). El reverso de la colonia es pálido o amarillento (MSP y INS, 2010), la característica mencionada tiene relación con lo encontrado en este estudio (Cuadro 4.2-D2).

En relación con las características observadas macro y microscópicamente se reporta que los aislados fúngicos pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, a continuación, se presentan los aislados con los respectivos géneros asociados (Cuadro 4.4).

Cuadro 4. 4. Aislados fúngicos con los respectivos géneros asociados.

Cepa	Especie asociada
CF-1.1 (1)	<i>Aspergillus</i> spp
CE-1.1 (1)	<i>Aspergillus</i> spp
CE-1.2 (1)	<i>Aspergillus</i> spp
CH-1.2 (2)	<i>Penicillium</i> spp.

4.2. CONTROL *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* spp SOBRE LOS AISLADOS FÚNGICOS

Las bacterias que controlaron significativamente a los aislados CF1.1(1) y CH1.2(2), en orden de *Aspergillus* y *Penicillium* spp, respectivamente, fueron las cepas *B. subtilis* 31BMC la cual tuvo mayor % de inhibición sobre *Aspergillus* spp y la cepa *B. licheniformis* E-44 mostró mayor % de inhibición sobre *Penicillium* spp (Anexo 9-A; Anexo 9-B).

En cuanto a las dosis no tuvieron efecto significativo sobre el control de los aislados fúngicos. La interacción entre las cepas de *B. subtilis* con las dosis de

100 y 200 μ L reportaron diferencias significativas sobre el aislado CF1.1(1) de *Aspergillus* spp, así como también sobre el aislado CH1.2(2) de *Penicillium* spp (Anexo 9).

Con respecto a las medias de la distancia del crecimiento micelial oscilaron entre 9,30 y 37,60 mm esto es inversamente proporcional al % de inhibición, en efecto a menor crecimiento micelial mayor es el % de inhibición (Anexo 10).

Cuadro 4. 5. Promedio del control de las cepas de *Bacillus* spp sobre los aislados fúngicos (valores transformados mediante la ecuación 3.1).

FV	Aislados fúngicos				
	Bacterias	<i>Aspergillus</i> spp [CF1.1(1)]	<i>Aspergillus</i> spp [CE1.1(1)]	<i>Aspergillus</i> spp [CE1.2(1)]	<i>Penicillium</i> spp [CH1.2(2)]
<i>Bacillus subtilis</i> 21BMC		44,18 b	53,00	50,33	51,52 c
<i>Bacillus subtilis</i> 20BP		58,26 b	35,73	51,55	65,53 bc
<i>Bacillus subtilis</i> E-54		44,96 b	51,09	71,42	53,91 c
<i>Bacillus subtilis</i> 50 BP		54,74 b	52,55	62,54	73,77 ab
<i>Bacillus subtilis</i> 31BMC		74,43 a	62,73	64,42	70,40 ab
<i>Bacillus licheniformis</i> E-44		63,09 ab	63,64	72,48	76,96 a
p-valor		0,0265	0,2922	0,1968	0,0074
		Dosis			
100 μ L		58,04	51,54	63,30	64,60
200 μ L		56,83	54,70	60,94	66,09
p-valor		0,5588	0,4244	0,8302	0,8533
		Bacterias*Dosis			
<i>B. subtilis</i> 21BMC*100 μ L		25,91 c	54,18	61,40	46,16 cd
<i>B. subtilis</i> 21BMC*200 μ L		62,44 ab	51,82	39,25	56,88 cd
<i>B. subtilis</i> 20BP*100 μ L		67,39 ab	32,00	42,51	70,60 abcd
<i>B. subtilis</i> 20BP*200 μ L		49,13 bc	39,46	60,59	60,46 cd
<i>B. subtilis</i> E-54*100 μ L		44,96 bc	50,91	73,62	65,43 bcd
<i>B. subtilis</i> E-54*200 μ L		44,96 bc	51,27	69,22	42,38 d
<i>B. subtilis</i> 50BP*100 μ L		61,39 ab	54,55	66,78	71,39 abcd
<i>B. subtilis</i> 50BP*200 μ L		48,09 bc	50,54	58,31	76,16 abc
<i>B. subtilis</i> 31BMC*100 μ L		74,43 a	59,09	66,29	61,66 abcd
<i>B. subtilis</i> 31BMC*200 μ L		74,43 a	66,36	62,54	79,14 ab
<i>B. licheniformis</i> E-44*100 μ L		56,96 abc	58,55	69,22	72,39 abc
<i>B. licheniformis</i> E-44*200 μ L		69,22 ab	68,73	75,73	81,52 a
p-valor		0,0093	0,6928	0,3781	0,0239

Medias dentro de columnas con letras distintas, difieren significativamente de acuerdo con la prueba no paramétrica al 5% de probabilidades de error.

Los resultados encontrados en el estudio son similares a los reportados por Palumbo, Baker y Mahoney (2006) quienes demostraron que cepas de *Bacillus* spp redujeron entre un 22–73% el crecimiento de *Aspergillus flavus* después de

siete días de incubación, debido a la capacidad de las cepas para producir enzimas hidrolíticas que ocasionaron actividades de degradación en la pared de la quitina de los hongos, según Sadfi et al. (2002) las enzimas que ocasionan este fenómeno son las quitinasas, así como también la β -1,3-glucanasa y la proteasas (Li et al., 2016).

Chitara et al. (2003) reportaron el 84% de inhibición de *Penicillium roqueforti* en presencia de 10, 25 y 50% de líquido sobrenadante de *Bacillus* spp, el porcentaje de germinación disminuyó a 7, 1 y 0%, respectivamente.

El compuesto antifúngico puede pertenecer al grupo iturina de los antibióticos, que se sabe que interactúan con los esteroides de la membrana citoplásmica de los hongos (Maget-Dana et al. 1985, 1992; Latoudet et al. 1990 como se citó en Chitara et al. 2003), así como también interactúan compuestos lipopéptidos cíclicos de las familias surfactina y fengicina (Cawoy et al., 2015). Las cepas de *B. licheniformis* exhiben actividad antifúngica y presentan la producción de forlantibiótico y 2,3-butanediol, tal como lo aseveran Sukkasem et al. (2018).

Las cepas no tuvieron diferencias significativas para los aislados CE1.1(1) y CE1.2(1) de *Aspergillus* spp (Cuadro 4.5). Al respecto Astorga et al. (2013) mencionan que este efecto sucede debido a que los hongos patógenos poseen una estructura celular rígida compuesta por polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, glucano y manano o galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas.

El contenido de quitina en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20% y las glicoproteínas representa el 20-30% peso seco de la pared de los hongos (Pontón, 2008). En efecto la composición de la estructura de los hongos no permite el accionar de las cepas biocontroladoras según lo manifestado por Astorga et al. (2013).

En relación con los resultados obtenidos, se estima que el control de las cepas de bacterias sobre los aislados no fue por espacio físico ni por nutrientes debido a que todos los tratamientos fueron aplicados bajo las mismas

condiciones; a diferencia de lo reportado por Einloft et al. (2017) quienes lograron reducir en un rango entre 76 y 95% de inhibición, esto atribuido a la competencia física por el espacio y la nutrición, la competencia con el hongo por un sustrato requerido para la producción de toxina y la inducción por un cambio en el entorno bioquímico que influye en la vía metabólica disponible para el toxígeno (Choudhary, 1992 como se citó en Einloft et al., 2017).

Los mismos autores indicaron que las variaciones en el potencial biocontrolador de una cepa específica están ligadas a las características genéticas y los factores ambientales presentes, así como a las interacciones con otros microorganismos.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Las características morfológicas de los aislados fúngicos de los granos de cacao se asocian a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.
- Las cepas de bacterias más eficaces en el control *in vitro* de los hongos filamentosos fueron *B. subtilis* 31BMC y E-44, las cuales tienen efecto de inhibición del 74,43 y 76,96% en su orden, sobre los aislados CF1.1(1) y CH1.2(2) de *Aspergillus* y *Penicillium* spp respectivamente.
- La cepa de *B. subtilis* 31BMC con dosis de 100 y 200 μ L controlaron al aislado CF1.1(1) de *Aspergillus* spp con 74,43% de inhibición y la cepa *B. licheniformis* con dosis de 200 μ L al aislado CH1.2(2) de *Penicillium* spp con 81,52%.
- Los aislados fúngicos CE1.1(1) y CE1.2(1) de *Aspergillus* spp no fueron controlados por ninguna de las cepas de bacterias estudiadas.

5.2. RECOMENDACIONES

- Determinar, en estudios posteriores los factores extrínsecos e intrínsecos que influyen en la contaminación por hongos patógenos en el proceso poscosecha de cacao.
- Ampliar los intervalos de las dosis de aplicación de las cepas de *Bacillus* spp, ya sea en consorcios microbianos o individualmente.
- Precisar, en futuros trabajos de investigación, los principales mecanismos de inhibición y caracterización de las bacterias que ejercieron mayor control *in vitro* sobre los aislados fúngicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(3), S79-84. Recuperado de: <https://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi33.pdf>.
- Abeysinghe, S. (2009). The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* CA32r on control of *Sclerotium rolfsii* on *Capsicum annum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(9), 835-846. doi: doi.org/10.1080/03235400701492673.
- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. (2012). *Guía de buenas prácticas agrícolas para cacao resolución técnica No.183 inocuidad de los alimentos*. Recuperado el 27 de octubre de 2018 de <http://docplayer.es/74634243-Guia-de-buenas-practicas-agricolas-para-cacao-resolucion-tecnica-no-183-inocuidad-de-los-alimentos.html>.
- Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S., & Moschetti, G. (2009). Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 155-158. doi: [dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2886](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2886).
- Álvarez, E. C., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Nova*, 14(26), 53-62. Recuperado de: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/517>.
- Arias, E. L., Espinosa, P., & Andera, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde* (Tesis de pregrado). Recuperada de [javeriana.edu.co: http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf](http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf).
- Arteaga, C. F., López, V. M., Laurencio, S. M., Rondón, C. A., Milián, F. G., Barrios, G. V., & Bocourt, S. R. (2017). Selección e identificación de aislados de *Bacillus spp.* del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 55-64. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-03942017000100008.
- Asociación Nacional de Exportadores de Cacao-Ecuador. (2018). *Revista Especializada en CACAO*. Sabor arriba. Ecuador.
- Astorga, K., Zúñiga, C., & Rivera W. (2014). Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Tecnología en Marcha*, 27(1), 77-84. doi: 10.18845/tm.v27i1.1698.
- Bermúdez, K., & Mendoza, A. (2015). *Post-cosecha y secado del grano del cacao nacional fino y de aroma para la determinación de perfiles físicos, bromatológicos y organolépticos* (Tesis de pregrado). Recuperada de

repositorio.espam.edu.ec:
repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/562/2/TAI116.pdf.

- Bharose A., & Gajera H. (2018) Estudio de actividad antimicótica y metabolitos de la cepa de bacilo contra la aflatoxina que produce aspergillus. *J Appl Microbiol Biochem.* 2(2). doi:10.21767/2576-1412.100024.
- Bonilla, W. (2013). *Análisis de ocratoxina en chocolate de hoja comercializado en los mercados de la ciudad de Cuenca.* (Tesis de maestría). Recuperada de dspace.uazuay.edu.ec: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/2525>.
- Cajiao, A., P. (2017). Aislamiento de hongos asociados al grano de café provenientes de zonas productoras en norte de santander-colombia. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 14(1), 50-58. Recuperado de: http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/2125.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004.
- Camino, C. (014). *Estudio del contenido de grasa, alcaloides y polifenoles totales en almendras de cacao nacional fino de aroma en zonas del litoral ecuatoriano para comparar su calidad y facilitar su comercialización* (Tesis de pregrado). Recuperada de repositorio.uta.edu.ec: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8460/1/BQ%2061.pdf>.
- Cascante, M., García, V., & Marín, G. (1991). Identificación de hongos filamentosos y levaduras aislados durante la fermentación de almendras de cacao (*Theobroma cacao*) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 15(1-2), 177-180. Recuperado de: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v15n1-2_177.pdf.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial biotechnology*, 8(2), 281-295. doi: 10.1111/1751-7915.12238.
- Corrales, L., Sánchez, L., Arévalo, Y., & Moreno, V. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*, 12(22), 165-177. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n22/v12n22a06.pdf>.

- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. H. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 848-864. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.
- Chitarra, G., Breeuwer, P., Nout, R., Van Aelst, A., Van Aelst, F., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159-166. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12534806>.
- Cristiano, F., Serrano, L., & Galindo, E. (19 a 20 de junio 2011). *Crecimiento vegetativo y esporulación de Bacillus subtilis 83 en medio mineral en cultivos sumergidos en lote y lote alimentado*. Presentada en Conferencia XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Queretaro, México.
- Cuervo, Y., Espadas, M., & Zita, G. (2018). Fitopatología. *Manual de Prácticas de Ingeniería Agrícola*. Recuperado el 10 de noviembre de 2018 de http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comite_editorial/manuales/Fitopatologia.pdf.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. (2010). Hongos en los Alimentos: ¿Son Peligrosos?. *Información sobre Inocuidad de Alimentos*. Recuperado el 27 de octubre de 2018 de https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/03e22c03-8062-4ca1-a8c2-fe94bafc0222/Molds_Are_They_Dangerous_SP.pdf?MOD=AJPERES.
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M. & Robledo, C. (1998). Estadística y Biometría y de Diseño de Experimentos de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC). *InfoStat software estadístico*. Recuperado el 10 de noviembre de 2018 de <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=34>.
- Dong, W., Zhang, D., Zhang, J., Li, H., & Jin, Y. (2010, June). Optimization of the growth culture medium with traditional Chinese herbs and conditions of *Bacillus licheniformis* SH003. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE), 2010 4th International Conference on* (pp. 1-5). IEEE. doi: 10.1109/ICBBE.2010.5516355.
- Dueñas, R., Tengerdy, P., & Gutiérrez, M. (1995). Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(3), 333-337. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00367112>
- Dusane, D. H., Damare, S. R., Nancharaiah, Y. V., Ramaiah, N., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. S. (2013). Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine

strain of *Bacillus licheniformis*. *PLoS One*, 8 (5), e64501. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0064501.

Einloft, T. C., Oliveira, P. B. D., Veras, F. F., Welke, J. E., Mallmann, C. A., Dilkin, P., & Dionello, R. G. (2017). Effect of *Bacillus* spp. on *Aspergillus westerdijkiae* growth, sporulation and ochratoxin A production in green-coffee medium. *Food Science and Technology*, 37(SPE), 24-27.

Fundación Química Argentina. (2018). *Penicillium*. Recuperado el 28 de octubre de 2018 de: <https://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi31.pdf>.

Figueiredo, J. E., Teixeira, M. A., Lima, G. V., Bressan, W., de Pinto, N. J., & Casela, C. R. (2010). Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Congresso nacional de milho e sorgo, 28.; Simpósio Brasileiro sobre a lagarta do cartucho, 4., 2010, Goiânia. Potencialidades, desafios e sustentabilidade: resumos expandidos. Goiânia: ABMS, 2010. Recuperado de: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/865392>.

Gao, X., Zhang, M., Li, X., Han, Y., Wu, F., & Liu, Y. (2018). Effects of a probiotic (*Bacillus licheniformis*) on the growth, immunity, and disease resistance of *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish & shellfish immunology*, 76, 143-152. doi: 10.1016/j.fsi.2018.02.028.

Gimeno, A. (2002). Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. *Ergonomix*. Recuperado el 27 de noviembre de 2018 de <https://www.ergormix.com/micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t26065.htm>.

Gutiérrez, S. (2017). *Efecto simbiótico a base de Sacchromyces cerevisiae y Bacillus subtilis sobre parámetros zootécnicos en pollos COBB 500* (Tesis de pregrado). Recuperada de Repositorio.espam.edu.ec: <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/>.

He, S., Feng, K., Ding, T., Huang, K., Yan, H., Liu, X., & Zhang, Z. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* BL-010. *Microbial pathogenesis*, 118, 199-201. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.037.

Hii, C. L., Law, C. L., Cloke, M., & Suzannah, S. (2009). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems engineering*, 102(2), 153-161. doi: doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.10.007.

Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones-Ecuador. (2018). *Estudio de Cacao en grano en Rusia*. Ecuador.

- Jiménez, D. M., & Baheza, F. V. (2005). *Caracterización del proceso de crecimiento de Bacillus subtilis bajo condiciones anaerobias* (Tesis de doctorado). Recuperado de <http://www.ibt.unam.mx/alfredo/JoelEspinosa.pdf>.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., & Borriss, R. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249. doi: 10.1038/36786.
- Krulwich, T., Agus, R., Schneier, M. & Guffanti, A. A. (1985). Buffering capacity of *Bacilli* that grow at different pH ranges. *Journal of bacteriology*, 162(2), 768-772. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3886633>.
- Layton, C. Maldonado, L., Monroy, L., Corrales, L., & Sánchez, C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16). Recuperado de: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA16_ARTREVIS_1_BACILLUS.pdf.
- Lee, M. K., Kim, J. K., & Lee, S. Y. (2018). Effects of fermentation on SDS-PAGE patterns, total peptide, isoflavone contents and antioxidant activity of freeze-thawed tofu fermented with *Bacillus subtilis*. *Food chemistry*, 249, 60-65. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.045.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2016). Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PloS one*, 11(9), e0162125. doi: 10.1371/journal.pone.0162125.
- Lisboa, M. (2003). 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. (Tesis de pregrado). Recuperada de <http://dspace.otalca.cl>: <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/919/3/MLisboaM.pdf>.
- López, C. S., (2002). *Caracterización físico-química de la membrana de Bacillus subtilis frente al estrés osmótico: relevancia de los fosfolípidos aniónicos en la osmorrespuesta*. (Tesis doctoral). Recuperada de Biblioteca Digital FCEN-UBA: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3515_Lopez.pdf.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl, A., & Novotna, E. (2013). Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity—An overview. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 98(6), 493-502. doi: doi.org/10.1002/bdrb.21091.

- Mar, R. (2018). Los productores reciben mejor precio por el cacao. *El Telégrafo*. Recuperado el 20 October 2018 de: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/productores-precio-cacao-ecuador>.
- Mayorga, E., & Flores, D. (2018). *Monitoreo ambiental micológico en ambientes internos del Área Histórica de la Biblioteca General de la Universidad Central del Ecuador* (Tesis de pregrado). Recuperada de dspace.uce: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15171>.
- Microchem Laboratory*. (2018). *Microchemlab.com*. Recuperado el 21 Octubre de 2018 de: <http://microchemlab.com/microorganisms/bacill>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). *Producción de cacao apunta a romper récord este año*. Ecuador.
- Ministerio de Salud del Perú & Instituto Nacional de Salud. (2010). *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas*. Recuperado el 13 de noviembre de 2018 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl109-10e.pdf>
- Montesinos, E., Francés, J., Badosa, E., & Bonaterra, A. (2015) Post Harvest Control. *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 193-202. doi: 10.3389/fpls.2015.00986.
- Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P., & Clark, D. P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of bacteriology*, 179(21), 6749-6755. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179605/>.
- Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), 165-190. doi: 10.1146/annurev.micro.52.1.165.
- Nawaz, H. H., Rajaofera, M. N., He, Q., Anam, U., Lin, C., & Miao, W. (2018). Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 146, 33-42. doi: doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.007.
- Norma Técnica Peruana 488. (1998). *Calidad de aire interior: identificación de hongos*. Recuperado el 13 de noviembre de 2018 de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp_488.pdf.
- Palumbo, J. D., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2006). Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial ecology*, 52(1), 45-52.

- Pawar, R. R., & Borkar, S. G. (2018). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from different habitats and their assessment for antagonism against soil-borne fungal plant pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 12(24), 556-566. doi: 10.5897/AJMR2015.7511.
- Pérez, R., Terrón, S., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1(3), 53-60. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/277776563_Antagonismo_microbiano_asociado_a_cepas_bacterianas_provenientes_de_jitomate_Lycopersicon_esculentum_Mill_y_maiz_Zea_Mays.
- Pérez, E., & Zorrilla, J. (2017). *Biofungicidas para el control de moniliasis en el cultivo de Theobroma cacao L. Clon 575 en la ESPAM MFL* (Tesis de pregrado). Recuperada de repositorio.espam.edu.ec: <http://repositorio.espam.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/42000/537/TA64.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
- Ramos, F. (2014). *Cultivo de Bacillus subtilis cepa 105 en biorreactor y su actividad antagonista contra Sclerotinia sclerotiorum*. (Tesis de maestría). Recuperada de Repositorio Dspace ipn: <https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/12790>.
- Ramos, N., Castro, A., Juárez, J., Acha de la Cruz, O., Rodríguez, N., Blancas, J., Escudero, J., & Navarro, A. (2016). Evaluación de ocratoxina A en "Theobroma cacao L." cacao blanco" durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(4), 431-439.
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., & Hardisson De la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600004.
- Rodríguez, J. H., Cousin, M. A., & Nelson, P. E. (1992). Evaluation of anaerobic growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in tomato juice. *Journal of food protection*, 55(9), 672-677. doi: doi.org/10.4315/0362-028X-55.9.672.
- Rosa da Silva, G., & Gomes, R. (12 a 16 septiembre 2016). *Biocontrol de Aspergillus flavus por Bacillus spp. in vitro em grãos de milho*. Presentada en Conferencia Salão UFRGS 2016: SIC - XXVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

- Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M. R., Boudabbous, A., & Belanger, R. (2002). Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Annals of microbiology*, 52(3), 323-338. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/237788248_Isolation_and_partial_purification_of_antifungal_metabolites_produced_by_Bacillus_cereus.
- Saltos, B., Solórzano, J., & Zambrano, A. (2018). Evaluación de agentes encapsulantes para la conservación de *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*. (Proyecto de investigación ESPAM MFL).
- Samaniego, G. (2016). *Optimización del proceso de producción de Bacillus subtilis CTPX S2-1 y sus metabolitos, para el control de antracnosis en Lupinus mutabilis SWEET*. (Tesis de pregrado). Recuperado de Dspace.udla.edu.ec: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/6195/1/UDLA-EC-TIAG-2016-18.pdf>.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Varga, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Sánchez, V. (2007). *Caracterización organoléptica del cacao (Theobroma cacao L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial* (Tesis de pregrado). Recuperada de infocafes.com: http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/03/Caracterizacion_organoleptica_cacao_Theobroma-cacao-L._seleccion_arboles_-perfiles_sabor_interes_comercial.pdf.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 205-221. doi: 10.1080/10408690490464104.
- Seifert, K., Morgan, G., Gams, W. & Kendrick, B. (2011). The genera of hyphomycetes. CBS Biodiversity Series 10.
- 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. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- Sukkasem, P., Kurniawan, A., Kao, T. C., & Chuang, H. W. (2018). A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 541-551. doi: doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.005.

- Toaza Mora, A. J. (2012). *Evaluación de los niveles de Ocratoxina A en almendras de cacao, mediante el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), usando columnas de fase-reversa (SPE) y caracterización al hongo productor de ocratoxina A* (Tesis de pregrado). Recuperada de Repositorio.espe.edu.ec: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5868/1/T-ESPE-034345.pdf>.
- Trimulyono, G. (2018). Temperature range and degree of acidity growth of isolate of indigenous bacteria on fermented feed “fermege”. In *Journal of Physics: Conference Series*, 953(1), 012209. Recuperado de: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/953/1/012209>.
- The University of Adelaide. (2019). *Aspergillus*. Mycology Online. Recuperado 4 mayo 2019, de <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptihttps://search.adelaide.edu.au/s/search.html?collection=uoa-search&q=PENICILLIUM>
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., ... & Ehrenreich, A. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 7(4), 204-211. doi: 10.1159/000079829..
- World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56. doi: doi.org/10.1002/food.1994038033.
- Yi, P. J., Pai, C. K., & Liu, J. R. (2011). Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1035-1043. doi: doi.org/10.1007/s11274-010-0548-7.

ANEXOS

ANEXO 1**TOMA DE MUESTRAS DE GRANOS DE CACAO FERMENTADOS****ANEXO 2****CÁMARA HÚMEDA****2-A CÁMARA HÚMEDA EN RECIPIENTES PLÁSTICOS**



2-B CÁMARA HÚMEDA EN FUNDAS HERMÉTICAS

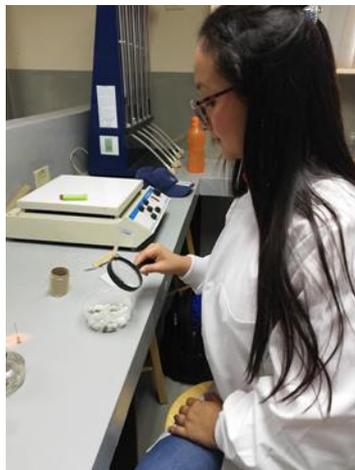




2-C CÁMARA HÚMEDA EN RECIPIENTES Y FUNDAS HERMÉTICAS



2-D CRECIMIENTO DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS EN CÁMARA HÚMEDA



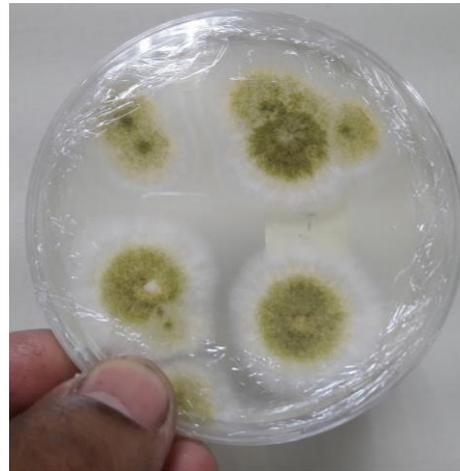
ANEXO 3

AISLAMIENTO DE AISLADOS FÚNGICOS

3-A AISLAMIENTO DE ESTRUCTURA FÚNGICAS DE CÁMARA HÚMEDA A MEDIO DE CULTIVO PDA



3-B CRECIMIENTO DE AISLADOS FÚNGICOS



ANEXO 4
PURIFICACIÓN Y CRECIMIENTO DE AISLADOS FÚNGICOS
4-A PURIFICACIÓN DE HONGOS



4-B SIEMBRA DE AISLADOS FÚNGICOS PURIFICADOS EN TUBOS DE ENSAYO EN MEDIO PDA



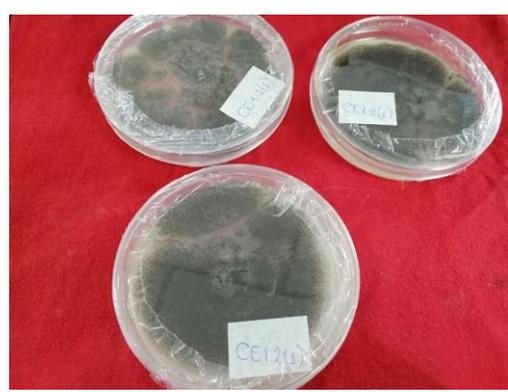
ANEXO 5

CRECIMIENTO DE AISLADOS FÚNGICOS PURIFICADOS



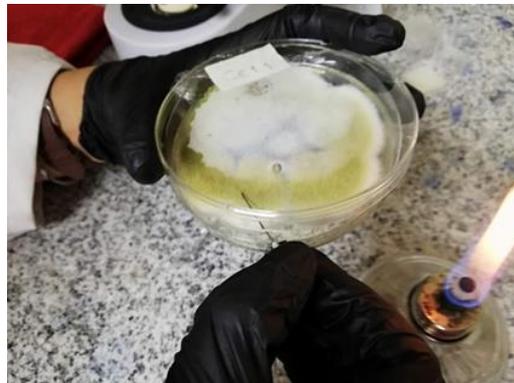
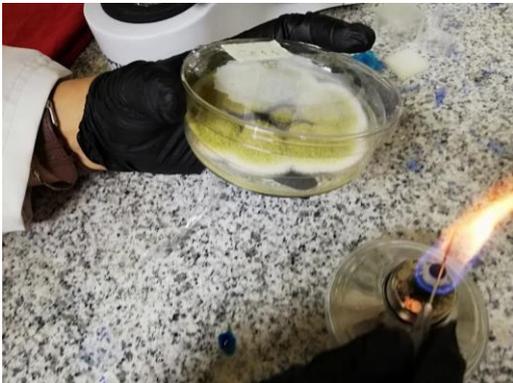
ANEXO 6

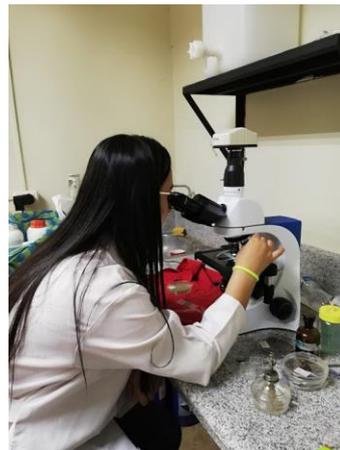
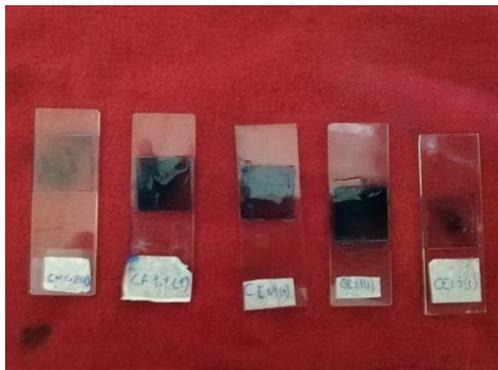
REFRESCAMIENTO DE LOS AISLADOS FÚNGICOS



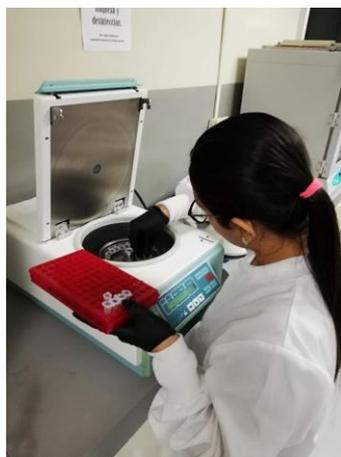
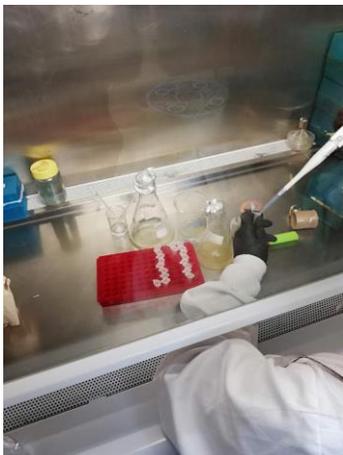
ANEXO 7

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

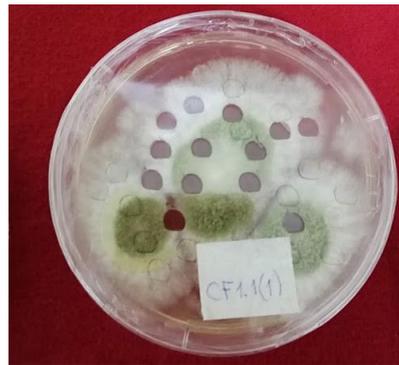




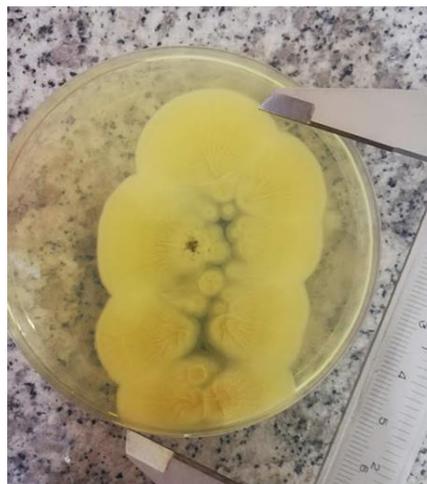
ANEXO 8
REACTIVACIÓN DE CEPAS Y ENSAYOS DE ANTAGONISMO
8-A REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS



8-B ENSAYOS DE ANTAGONISMO *in vitro*



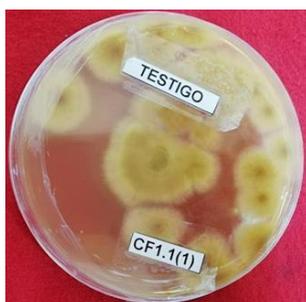
8-C MEDICIÓN DE DISTANCIA MICELIAL



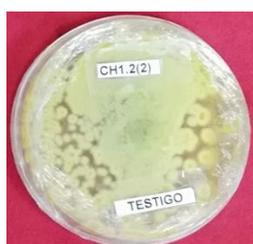
ANEXO 9

CONTRASTE DE CEPAS DE *Bacillus* spp SOBRE AISLADOS FÚNGICOS

9-A CONTRASTE DE *Bacillus subtilis* 31BMC SOBRE *Aspergillus* spp



9-B CONTRASTE DE *Bacillus licheniformis* E-44 SOBRE *Penicillium* spp



ANEXO 10

CRECIMIENTO RADIAL DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

Tratamientos	Distancia micelial (mm)			
<i>B. subtilis</i> 21BMC*100 µL	25,10	25,20	23,70	30,60
<i>B. subtilis</i> 21BMC*200 µL	18,40	26,50	38,33	21,70
<i>B. subtilis</i> 20BP*100 µL	12,50	37,60	35,30	14,80
<i>B. subtilis</i> 20BP*200 µL	19,50	35,30	24,60	19,90
<i>B. subtilis</i> E-54*100 µL	17,30	27,00	16,20	17,40
<i>B. subtilis</i> E-54*200 µL	21,10	21,30	18,90	30,00
<i>B. subtilis</i> 50BP*100 µL	14,80	25,00	20,40	14,40
<i>B. subtilis</i> 50BP*200 µL	19,90	27,20	25,60	12,00
<i>B. subtilis</i> 31BMC*100 µL	9,80	22,50	20,70	19,30
<i>B. subtilis</i> 31BMC*200 µL	9,80	18,50	23,00	10,50
<i>B. licheniformis</i> E-44*100 µL	16,50	22,80	18,90	13,90
<i>B. licheniformis</i> E-44*200 µL	11,80	17,20	14,90	9,30
Control	38,33	55,00	61,40	50,33

ANEXO 11

SUPUESTO DE NORMALIDAD DE LOS DATOS

Prueba de bondad de ajuste (Kolgomorov smirnov)		
% Inhibición	Media	p-valor
CF1.1(1)	56,61	<0,0001
CE1.1(1)	52,12	<0,0001
CE1.2(1)	62,12	<0,0001
CH1.2(2)	65,35	<0,0001