

**UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ**  
**“EXTENSIÓN EN EL CARMEN”**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

SUSTRATOS SOLIDOS EN EL CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis*  
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

**AUTOR:**

Cagua Barre Eny Nicolle

**TUTOR:**

Ing. Nexar Vismar Cobeña loor. Mg.

EL Carmen – Manabí – Ecuador

Agosto, 2026

|                                                                                   |                                                                                                             |                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|  | <b>NOMBRE DEL DOCUMENTO:</b><br><b>CERTIFICADO DE TUTOR(A)</b>                                              | <b>CÓDIGO:</b> PAT-04-F-004         |
|                                                                                   | <b>PROCEDIMIENTO: TITULACIÓN DE ESTUDIANTES DE GRADO</b><br><b>BAJO LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b> | <b>REVISIÓN:</b> 1<br>Página 1 de 1 |

## CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor de la Extensión El Carmen de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido, revisado y aprobado preliminarmente el Trabajo de Integración Curricular bajo la autoría del estudiante **Eny Nicolle Cagua Barre**, legalmente matriculado en la carrera de Ingeniería Agropecuaria, período académico 2026 (1), cumpliendo el total de 384 horas, cuyo tema del proyecto es **“Sustratos solidos en el crecimiento de *Bacillus subtilis* bajos condiciones del laboratorio”**

La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, y la originalidad del mismo, requisitos suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

El Carmen, 3 Agosto del 2026.



Ing. Nexar Vismar Cobeña Loor, Mg.

**Docente Tutor**

**Área:** Agricultura, Silvicultura, Pesca

**UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ  
EXTENSIÓN EN EL CARMEN**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TÍTULO:**

**"Sustratos solidos. en el crecimiento de Bacillus subtilis bajo condiciones  
de laboratorios"**

**AUTOR:** Eny Nicolle Cagua Barre

**TUTOR:** Ing. Nexar Vismar Cobeña Loor, Mg.

**TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGROPECUARIO**

**TRIBUNAL DE TITULACIÓN**

**Tribunal 1, Mg Klever Fernando Mejía** \_\_\_\_\_

**Tribunal 2, Mg González Dávila Paul** \_\_\_\_\_

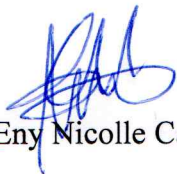
**Tribunal 3, PhD López Mejía Francel** \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Eny Nicolle Cagua Barre, con el documento de identificación N. ° 1313958678, en mi calidad de alumno de la carrera de Ingeniería Agropecuaria en la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí (Extensión El Carmen), certifico que los análisis, hallazgos y resultados obtenidos de los métodos de investigación presentados en este trabajo, titulado “Sustratos solidos en el crecimiento de *Bacillus subtilis*, son producto de mi total autoría y responsabilidad.

De igual manera, afirmo que la base teórica y las contribuciones técnicas incluidas en este documento cuentan con el respaldo académico necesario a través de las referencias bibliográficas mencionadas. Con esta carta, reconozco y declaro que la propiedad intelectual y los derechos patrimoniales sobre esta investigación pertenecen legítimamente a la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Extensión El Carmen.

Atentamente,



Eny Nicolle Cagua Barre

C. I. 1313958678

El Carmen, 30 de Julio del 2026

## DEDICATORIA

*"Cuidar la tierra no es solo una profesión; es el acto de honrar la vida y el origen de todo lo que nos sostiene." -Wendell Berry*

A Dios, inagotable fuente de energía, fe y fortaleza, gracias por brindarme la salud y la tenacidad requeridas para enfrentar cada reto académico y poder realizar el sueño de finalizar mi carrera.

A mis padres, agradezco su amor sin condiciones, sus enseñanzas y su modelo de trabajo íntegro. Gracias por ser mi mayor motivación, por haber creído en mí desde el inicio y por sus sacrificios diarios para ofrecerme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente. Este logro es un reflejo claro de sus enseñanzas y compromiso.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo en las largas noches y su sincero respaldo en cada fase de este camino. Su presencia y su fe en mis capacidades han sido la fuerza que me mantuvo en el sendero.

Este título no es solo mío, lleva la marca de cada uno de sus esfuerzos y gestos de amor. Con un profundo respeto y agradecimiento, este éxito nos pertenece a todos.

***Cagua Barre Eny Nicolle***

## AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a Dios por haberme otorgado la inteligencia, la constancia y la fortaleza necesarias para seguir este recorrido académico y lograr mi objetivo de ser Ingeniero Agropecuario. Su dirección espiritual fue mi mayor apoyo en tiempos de duda y esfuerzo.

Estoy profundamente agradecido con mis padres, por su amor, apoyo constante, sacrificios y la confianza que siempre me brindaron, elementos que fueron cruciales para que no me rindiera y continuara adelante en todo momento.

Del mismo modo, mi gratitud va para mis compañeros universitarios, quienes con su apoyo, consejos y compañerismo hicieron que este trayecto fuera más llevadero y aportaron significativamente a la finalización de este proyecto.

Quiero agradecer sinceramente a cada uno de los docentes que contribuyeron a mi educación profesional en mi alma mater, la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, extensión El Carmen. Las lecciones, su dedicación y su ejemplo dejaron una marca indeleble en mi vida y en mi carrera.

Finalmente, destaco con aprecio el apoyo emocional, afectivo y económico proporcionado por mi familia, cuyo respaldo incondicional hizo posible que este sueño se materializara. Este logro también les pertenece a ustedes.

***Cagua Barre Eny Nicolle***

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| CERTIFICACIÓN .....                                            | 2  |
| TRIBUNAL DE TITULACIÓN.....                                    | 3  |
| DECLARACIÓN DE AUDITORIA .....                                 | 4  |
| DEDICATORIA .....                                              | 5  |
| AGRADECIMIENTO .....                                           | 6  |
| ÍNDICE GENERAL .....                                           | 7  |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                         | 9  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                         | 10 |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....                                          | 11 |
| RESUMEN.....                                                   | 12 |
| ABSTRACT .....                                                 | 13 |
| CAPÍTULO I.....                                                | 14 |
| INTRODUCCIÓN .....                                             | 14 |
| PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA .....                                | 15 |
| PREGUNTA DE LA INVESTIGACIÓN.....                              | 14 |
| JUSTIFICACIÓN .....                                            | 15 |
| OBJETIVOS .....                                                | 16 |
| HIPÓTESIS .....                                                | 16 |
| METODOLOGÍA.....                                               | 17 |
| 1.1 Localización de la unidad experimental .....               | 17 |
| 1.2 Caracterización climática de la zona .....                 | 17 |
| 1.3 Materiales.....                                            | 18 |
| 1.4 Métodos .....                                              | 18 |
| 1.4.1 Tipo de investigación .....                              | 18 |
| 1.4.2 Método Empírico:.....                                    | 18 |
| 1.4.3 Método inductivo-deductivo: .....                        | 19 |
| 1.4.4 Método experimental .....                                | 19 |
| 1.5 Variables de estudio .....                                 | 19 |
| 1.5.1 Variable Independiente.....                              | 19 |
| 1.5.2 Variable Dependiente .....                               | 20 |
| 1.6 Tratamiento .....                                          | 20 |
| 1.7 Procedimiento .....                                        | 20 |
| 1.7.1 Preparación de sustratos.....                            | 20 |
| 1.7.2 Reducción del Tamaño de Partícula (Corte y Secado) ..... | 20 |
| 1.7.3 Moliendo y Tamizado de Insumos .....                     | 21 |
| 1.7.4 Procedimiento experimental.....                          | 21 |
| 1.7.5 Inoculación, Siembra e Incubación.....                   | 21 |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO II.....                                                                                                                      | 23 |
| MARCO TEÓRICO.....                                                                                                                    | 23 |
| 2.1 Bioinsumos .....                                                                                                                  | 23 |
| 2.2 Bacillus subtilis características generales .....                                                                                 | 23 |
| 2.3 Taxonomía y morfología .....                                                                                                      | 24 |
| 2.4 Fabricas bacterianas.....                                                                                                         | 24 |
| 2.5 Bacillus subtilis en la agricultura .....                                                                                         | 25 |
| 2.6 Beneficios medio ambientales.....                                                                                                 | 26 |
| 2.7 Estructura interna y externa del Bacillus subtilis .....                                                                          | 28 |
| TRABAJO RELACIONADOS .....                                                                                                            | 31 |
| CAPÍTULO III .....                                                                                                                    | 39 |
| DESARROLLO DE LA PROPUESTA.....                                                                                                       | 38 |
| 1. Descripción del Sistema o Proceso.....                                                                                             | 38 |
| 2. Diseño y Selección de Tecnologías, Herramientas o Equipos a Implementar .....                                                      | 38 |
| 3. Plan de implementación.....                                                                                                        | 39 |
| 4. Descripción y Verificación del Funcionamiento del Equipamiento, Herramienta o<br>Método Implementado / Resultados y Análisis ..... | 39 |
| RESULTADOS .....                                                                                                                      | 40 |
| CAPÍTULO IV .....                                                                                                                     | 47 |
| CONCLUSIONES .....                                                                                                                    | 47 |
| RECOMENDACIONES .....                                                                                                                 | 47 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                      | 48 |
| ANEXOS.....                                                                                                                           | 51 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> <i>Características climatológicas de la localidad.....</i>                                                           | 18 |
| <b>Tabla 2.</b> <i>Materiales, equipos y reactivos utilizados en el crecimiento del Bacillus subtilis .....</i>                      | 19 |
| <b>Tabla 3.</b> <i>Composición de los tratamientos y dosis utilizadas para el crecimiento de Bacillus subtilis.....</i>              | 20 |
| <b>Tabla 4.</b> <i>Crecimiento de Bacillus subtilis en función del tipo del sustrato utilizado.....</i>                              | 21 |
| <b>Tabla 5.</b> <i>Descripción de las formulaciones de los tratamientos utilizados para el crecimiento de Bacillus subtilis.....</i> | 21 |
| <b>Tabla 6.</b> <i>Listado de materiales y cantidades para la implementación de la infraestructura.....</i>                          | 40 |
| <b>Tabla 7.</b> <i>Resultados del porcentaje de colonización en las cajas Petri según el tratamiento.....</i>                        | 45 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Localización geográfica del área de estudio.....                                                                              | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Algunas proteínas recombinantes producidas en <i>B. subtilis</i> .....                                                        | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Comparativa de colonización en caja Petri entre el testigo y el tratamiento 1 aplicado.....                                   | 41 |
| <b>Figura 4.</b> Porcentaje de colonización microbiana comparativo entre el tratamiento 2 y el tratamiento 3.....                              | 42 |
| <b>Figura 5.</b> Dinámica de crecimiento y colonización microbiana según los tratamientos 4 y tratamiento 5.....                               | 44 |
| <b>Figura 6.</b> Resultado de implementación .....                                                                                             | 52 |
| <b>Figura 7.</b> Insumos y materias primas tamizados para la preparación de los tratamientos.....                                              | 52 |
| <b>Figura 8.</b> Preparación de tratamiento con sus respectivas dosis .....                                                                    | 52 |
| <b>Figura 9.</b> Siembra de inoculación de <i>Bacillus subtilis</i> en la cabina de flujo laminar. ....                                        | 52 |
| <b>Figura 10.</b> Es el grupo control con la mayor tasa de expansión, mostrando una invasión prácticamente completa del medio de cultivo. .... | 53 |
| <b>Figura 11.</b> El medio se conserva transparente, lo que indica un crecimiento puntual controlado sin función de colonias.....              | 53 |
| <b>Figura 12.</b> Crecimiento bacteriano definido, pero con una aérea libre de agar bastante amplia.....                                       | 53 |
| <b>Figura 13.</b> Presenta menor cantidad de unidades formadoras de colonias aisladas. ....                                                    | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Crecimiento de colonias pequeñas y dispersas en medio de cultivo. ....                                                       | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Escaso desarrollo de colonias microbianas puntiformes.....                                                                   | 54 |

## RESUMEN

En el presente ensayo de laboratorio se evaluó el comportamiento y la velocidad de crecimiento microbiológico de *Bacillus subtilis*, La investigación se realizó en la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión El Carmen, utilizando Insumos, para el (tratamiento testigo 0), se preparó un medio a base de Agar adicionando 5g del reactivo, T1 Harina del raquis del plátano 4,6g + Agar 3,6g, T2 Harina de pseudotallo del plátano 4,6g + Agar 3.6g, T3 Harina de pseudotallo 2,6g + Harina de arroccillo 1,8g + Agar 3,6g, T4 Harina de pseudotallo 3,6g + Harina de Soya1,4g + Agar3,6g, T5 Harina de pseudotallo 4g + Harina de arroccillo 2,4g + Harina de soja 0,70g + Agar 3,6g en seis medios de cultivo a base de agar y 200 ml de agua destilada , teniendo como control el agar nutritivo tradicional (Tratamiento 0). La siembra se llevó a cabo mediante la técnica de inoculación puntual por impronta directa, empleando un aro de inoculación estandarizado para depositar ocho puntos de contacto sobre el medio sólido en cada caja Petri. Los resultados mostraron que en el tratamiento testigo (Agar Nutritivo) *Bacillus subtilis* presentó un crecimiento acelerado y vigoroso; mientras que en los tratamientos suplementados con los diferentes subproductos agrícolas (T1 al T5), la bacteria logró adaptarse y crecer, pero a una tasa de desarrollo considerablemente más lenta y restringida en comparación con el medio de control. Se concluye que los subproductos evaluados constituyen una alternativa viable, pero requieren ajustes en su formulación para optimizar el desarrollo microbiano.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, subproductos agrícolas, tasa de crecimiento, inoculación puntual, agar nutritivo.

## ABSTRACT

In this laboratory assay, the behavior and microbiological growth rate of *Bacillus subtilis* were evaluated. The research was conducted at the Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, El Carmen extension. Different agricultural inputs were utilized: for the control treatment (T0), a medium was prepared using Agar base with the addition of 5 g of the reagent; T1 consisted of plantain rachis flour 4.6 g + Agar 3.6 g; T2 consisted of plantain pseudostem flour 4.6 g + Agar 3.6 g; T3 consisted of pseudostem flour 2.6 g + broken rice flour 1.8 g + Agar 3.6 g; T4 consisted of pseudostem flour 3.6 g + soy flour 1.4 g + Agar 3.6 g; and T5 consisted of pseudostem flour 4 g + broken rice flour 2.4 g + soy flour 0.70 g + Agar 3.6 g. These formulations were prepared across six culture media using agar base and 200 mL of distilled water, using traditional nutrient agar as the control (Treatment 0).

Inoculation was carried out using the point inoculation technique by direct imprint, employing a standardized inoculation loop to deposit eight contact points onto the solid medium in each Petri dish. The results showed that in the control treatment (Nutrient Agar), *Bacillus subtilis* exhibited accelerated and vigorous growth. In contrast, in the treatments supplemented with the various agricultural by-products (T1 through T5), the bacteria managed to adapt and grow, but at a considerably slower and more restricted development rate compared to the control medium. It is concluded that the evaluated by-products represent a viable alternative, though adjustments to their formulation are required to optimize microbial growth.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, agricultural by-products, growth rate, point inoculation, nutrient agar.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

La rizo bacteria *Bacillus subtilis* (Sonenshein, 2012) se ha utilizado en la investigación genética y bioquímica durante varias décadas y se considera el paradigma de la bacteria Gram positiva formadora de endosporas (Mozer, 2015). Se han recolectado varios cientos de cepas silvestres de *B. subtilis*, capaces de producir más de dos docenas de antibióticos con estructuras sorprendentemente diversas. Todos los genes que determinan la biosíntesis de antibióticos combinados suman un total de 350 kb; Sin embargo, dado que ninguna cepa los tiene todos, en promedio alrededor del 4 al 5% del genoma de *B. subtilis* se dedica a la producción de antibióticos. Uno de los objetivos de esta revisión es proporcionar un resumen actualizado de las estructuras de todos los antibióticos de *B. subtilis*, la bioquímica y el análisis genético de sus vías biosintéticas y un estudio de las vías reguladoras bien estudiadas. Otro objetivo es resumir los hallazgos recientes que muestran funciones específicas de los antibióticos contra *B. subtilis* más allá de sus efectos antimicrobianos: diferentes antibióticos interfieren con la morfología y fisiología de *B. subtilis* y promueve la supervivencia de este organismo en su entorno natural.

Uno de los principios fundamentales de la biología es que cuando se inoculan bacterias en el medio, los nutrientes permiten que el inóculo crezca multiplicando sus miembros. La población celular alcanza una determinada densidad, agota los nutrientes y deja de crecer. Se supone que todas estas células se comportan de manera idéntica porque provienen de un progenitor clonal y tienen genomas idénticos. Este es el mejor escenario posible en el que los cultivos bacterianos se consideran suspensiones de miles de millones de microorganismos individuales que son idénticos pero independientes entre sí. En el peor de los casos, las células bacterianas son vistas como pequeños focos donde tienen lugar reacciones químicas interesantes, o simplemente como herramientas para la producción y purificación de plásmidos o enzimas (Hilbert, 2006).

Sin embargo, los microbiólogos han reconocido desde hace mucho tiempo excepciones a esta visión de las bacterias. Uno de los microorganismos del suelo mejor estudiados, *Bacillus subtilis*, es conocido por su capacidad para diferenciarse de células vegetativas en esporas metabólicamente inactivas que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas (Adams, 2000). *Bacillus* no es el único con esta capacidad de

diferenciación. Por ejemplo, el organismo acuático *Caulobacter crescentus* tiene una heterogeneidad inherente en su población. Para replicarse, *Caulobacter* se divide asimétricamente para formar dos tipos de células genéticamente idénticas, pero morfológicamente distintas: células móviles que pueden nadar utilizando una médula y células pedunculadas que se adhieren a las superficies (Holtzendorff, 2004).

## **PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA**

En el campo de la biotecnología agrícola y el manejo sostenible de cultivos, *Bacillus subtilis* se ha consolidado como uno de los microorganismos benéficos más estudiado y utilizado, debido a su capacidad para actuar como promotor del crecimiento de las plantas, agente de biocontrol frente a fitopatógenos y mejorador de la estructura del suelo (Pandey, 2017). Pero la transición de la investigación de laboratorio a la producción a gran escala de este bacilo se enfrenta a un obstáculo crítico: la optimización de los medios. Tradicionalmente, la propagación bacteriana se realiza en un medio líquido normal; Sin embargo, la fermentación en sustrato sólido (FSS) se presenta como una alternativa biotecnológica muy efectiva porque imita las condiciones naturales de los microorganismos de la rizosfera y permite el aprovechamiento de subproductos agroindustriales.

La variabilidad inherente en la composición química, la porosidad, la capacidad de retención de humedad y la relación carbono/nitrógeno (C/N) de los sustratos disponibles en el área crea una considerable incertidumbre en la cinética del crecimiento bacteriano. La falta de caracterización previa de estos soportes sólidos hace imposible predecir el comportamiento del microorganismo, lo que a menudo resulta en bajas concentraciones de biomasa viable o pobre formación de esporas durante las pruebas iniciales. Como no existe una base experimental en los laboratorios de la región que confirme la eficacia de estos recursos locales, todavía dependemos de costosas materias primas comerciales o de formulaciones estándar que no aprovechan el potencial de la economía circular del cantón (Duhan, 2018).

## **PREGUNTA DE LA INVESTIGACIÓN**

¿Cómo influye el tipo de sustrato sólido en la tasa de crecimiento *Bacillus subtilis* bajo condiciones controladas de laboratorio?

## JUSTIFICACIÓN

*Bacillus subtilis* es una alternativa para el desarrollo de bioinsumos efectivos para combatir enfermedades agrícolas, ya que es capaz de producir una amplia gama de metabolitos con fuerte actividad biológica, como proteínas antifúngicas (Bouassida, 2017), biopelículas e inductores de crecimiento y respuesta de defensa de las plantas. Desde el punto de vista tecnológico (desarrollo de procesos de formulación y aspersión), estas especies bacterianas tienen una capacidad natural para formar endosporas, que son estructuras con resistencia a condiciones ambientales adversas, especialmente a la desecación, lo que les permite obtener una ventaja comparativa con otros microorganismos con potencial biológico en la formación de productos comerciales.

Estudios previos sobre el proceso de producción en otros aislados bacterianos, como *Bacillus subtilis*, han demostrado que el uso de subproductos agroindustriales como la harina de soja cumple con los requisitos básicos de este microorganismo para producir biomasa, endosporas y asegurar un suministro suficiente de nutrientes y energía para una baja biosíntesis celular (Samaniego, 2016).

Al analizar elementos fundamentales como la porosidad, la humedad y la relación entre carbono y nitrógeno en materiales orgánicos de la zona, el estudio crea un modelo metodológico que puede ser replicado. Esto mejora la rápida multiplicación y la producción de esporas bacterianas, ayudando a superar la escasez de procedimientos locales y la actual dependencia de medios de cultivo sintéticos costosos (Bouassida, 2017).

Esta normalización técnica resulta en beneficios tanto económicos como ecológicos dentro de un marco de economía circular. Al comprobar de forma científica la utilización de subproductos agrícolas poco aprovechados en la zona como fuente de nutrientes, se consigue una reducción significativa en el costo de producción de biomasa útil. Esto convierte un desecho agrícola, que podría tener un efecto negativo en el medio ambiente, en un recurso biotecnológico de gran valor. Así, la investigación no solo proporciona información valiosa al campo de la microbiología aplicada, sino que también presenta una opción viable y económica que fomenta un cambio hacia métodos agrícolas locales menos dependientes de agroquímicos sintéticos (Yanez, 2012).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos generales**

Evaluar el efecto de diferentes sustratos sólidos en el crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones controladas de laboratorio.

### **Objetivos específicos**

Monitorear el avance del crecimiento radial de *Bacillus subtilis* en cada sustrato sólido mediante mediciones a diferentes intervalos de tiempo.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis nula ( $H_0$ )**

La inclusión de los diferentes sustratos sólidos (harina de raquis de plátano, pseudotallo, arrocillo y soja) no produce efectos significativos sobre el crecimiento y la tasa de desarrollo de *Bacillus subtilis* en comparación con el medio de cultivo estándar (agar nutritivo).

### **Hipótesis alternativa ( $H_1$ )**

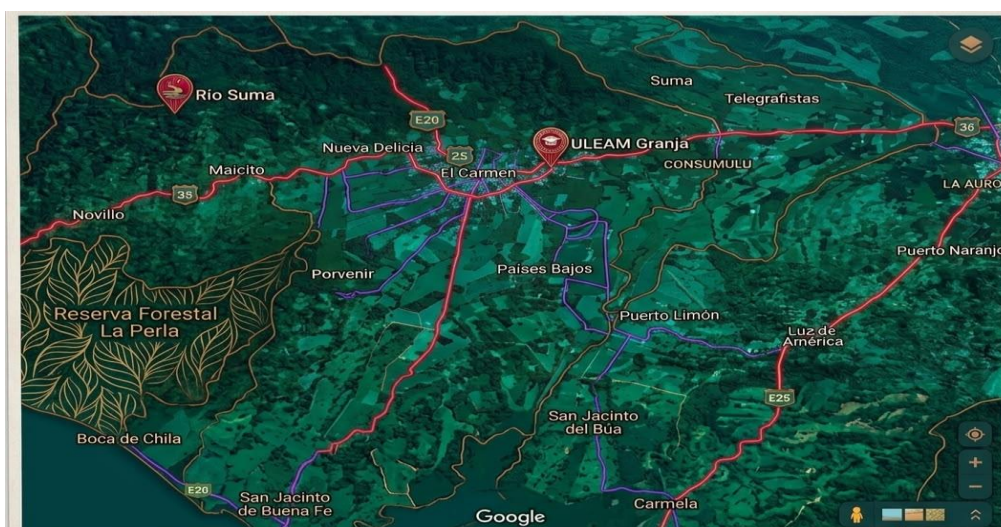
Al menos uno de los sustratos sólidos evaluados produce un efecto significativo en el crecimiento y la tasa de desarrollo de *Bacillus subtilis*, modificando su velocidad de colonización en comparación con el medio de cultivo estándar.

## METODOLOGÍA

### 1.1 Localización de la unidad experimental

La investigación se ejecutó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí “Extensión el Carmen” las unidades experimentadas consistieron en cajas Petri bajo condiciones controladas de laboratorio, donde se evaluó el crecimiento y desarrollo de *Bacillus subtilis* utilizando tratamientos basados en diferentes matrices de sustratos sólidos.

**Figura 1.** Localización geográfica del área de estudio



### 1.2 Caracterización climática de la zona

A continuación, características climáticas del cantón:

**Tabla 1.** Características climatológicas de la localidad

| Características                           | El Carmen      |
|-------------------------------------------|----------------|
| Clima                                     | Trópico Húmedo |
| Temperatura (°C)                          | 24             |
| Humedad Relativa (%)                      | 86             |
| Heliofanía (Horas luz año <sup>-1</sup> ) | 1026,2         |
| Precipitación media anual (mm)            | 2659           |
| Altitud (msnm)                            | 249            |

**Fuente:** Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2022)

### 1.3 Materiales

**Tabla 2.** *Materiales, equipos y reactivos utilizados en el crecimiento del Bacillus subtilis.*

| <b>Materiales e insumos</b>    | <b>Equipos</b>             | <b>Reactivos</b>             |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Asa de inoculación             | Autoclave                  | Agar Nutritivo               |
| Alcohol                        | Cabina de flujo laminar    | Agar - Agar                  |
| Lampara de Alcohol             | Estufa de secar            | Agua destilada               |
| Matraces Erlenmeyer            | Molino manual de grano     | Serenade (Bacillus subtilis) |
| Harina de Soya                 | Balanza precisión (0,01) g |                              |
| Harina pseudotallo del plátano |                            |                              |
| Aro de inoculación             |                            |                              |
| Harina del raquis del plátano  |                            |                              |
| Harina de arrocillo            |                            |                              |
| Cajas Petri                    |                            |                              |
| Servilletas                    |                            |                              |
| Algodón                        |                            |                              |

### 1.4 Métodos

#### *1.4.1 Tipo de investigación*

La investigación se desarrolló en la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí (ULEAM), Extensión El Carmen, y correspondió a un estudio experimental de alcance descriptivo–comparativo, orientado en la manipulación controlada de una variable (las cepas de Bacillus / tratamientos) sobre las cajas Petri para observar su efecto en el porcentaje de colonización.

#### *1.4.2 Método Empírico:*

La siguiente investigación se clasifica como de carácter empírico- experimental, en virtud de que fundamente sus hallazgos en la observación directa y la experimentación activa dentro de un entorno de laboratorio controlado.

#### **1.4.3 Método inductivo-deductivo:**

En la presente investigación se aplicó el método inductivo- deductivo, puesto que va de la observación de casos particulares (cada caja Petri/tratamiento) a conclusiones generales sobre el comportamiento de la cepa.

#### **1.4.4 Método experimental**

La investigación implicó manipulación intencional de variables independientes los distintos tratamientos y dosis aplicadas en condiciones estrictamente controladas de laboratorio, con el objetivo de analizar sus efectos causales sobre las variables dependientes (desarrollo, cobertura y porcentaje de colonización de cepa).

### **1.5 Variables de estudio**

#### **1.5.1 Variable Independiente**

**Tabla 3.** Composición de los tratamientos y dosis utilizadas para el crecimiento de *Bacillus subtilis*

| <b>Tratamiento</b> | <b>Descripción del sustrato</b>                  | <b>Dosis</b>                                                             | <b>Cepa/ Inoculo aplicado</b> |
|--------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Testigo            | Nutri Agar                                       | 5g                                                                       | <i>Bacillus subtilis</i>      |
| Tratamiento 1      | Harina Raquis+ Agar                              | H. raquis: 4,6g<br>Agar: 3,6 g                                           | <i>Bacillus subtilis</i>      |
| Tratamiento 2      | Harina Pseudotallo+ Agar                         | H. pseudotallo: 4,6 g<br>Agar: 3,6 g                                     | <i>Bacillus subtilis</i>      |
| Tratamiento 3      | Harina Pseudotallo +H. Arrocillo + Agar          | H. pseudotallo: 2.6g<br>H. arrozillo: 1,8g<br>Agar: 3,6g                 | <i>Bacillus subtilis</i>      |
| Tratamiento 4      | Harina Pseudotallo+ H. Soja + Agar               | H. pseudotallo: 3.6g<br>H. soja: 1,4g<br>Agar: 3,6g                      | <i>Bacillus subtilis</i>      |
| Tratamiento 5      | Haina Pseudotallo+ H. Soja + H. Arrocillo + Agar | H. pseudotallo: 4g<br>H. soja: 0,70g<br>H. arrozillo: 2,4g<br>Agar: 3,6g | <i>Bacillus subtilis</i>      |

### 1.5.2 Variable Dependiente

**Tabla 4.** Crecimiento de *Bacillus subtilis* en función del tipo del sustrato utilizado

| Variable                            | Definición                                                                                                                                                 | Unidad de medida                                  | Técnica e Instrumento                                                                                             |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tratamiento de sustrato alternativo | Diferentes formulaciones de sustratos solidos a base de harina de raquis, pseudotallo, soja y arrozillo combinados con agar para el crecimiento bacteriano | Gramos (g)<br>Harinas: Según dosis<br>Agar: 3,6 g | Técnica: Pesaje y preparación de formulaciones de medios de cultivos<br>Instrumento: Balanza analítica, autoclave |

### 1.6 Tratamiento

**Tabla 5.** Descripción de las formulaciones de los tratamientos utilizados para el crecimiento de *Bacillus subtilis*

| Tratamiento | Descripción                                        |
|-------------|----------------------------------------------------|
| Testigo     | Agar Nutrí                                         |
| T1          | Harina raquis + Agar                               |
| T2          | Harina pseudotallo + Agar                          |
| T3          | Harina pseudotallo + H. arrozillo + Agar           |
| T4          | Harina pseudotallo + H. soja + Agar                |
| T5          | Harina pseudotallo + H. soja + H. arrozillo + Agar |

### 1.7 Procedimiento

#### 1.7.1 Preparación de sustratos

Para la selección de los sustratos, se procedió a la recolección de material vegetal fresco proveniente de plantas fitosanitariamente sanas de plátano (*Musa spp.*). Específicamente, se tomaron muestras del pseudotallo (tallo aparente) y del raquis (vástago central del racimo) para garantizar un contenido idóneo de fibra y materia orgánica.

#### 1.7.2 Reducción del Tamaño de Partícula (Corte y Secado)

**Seccionamiento:** El material vegetal recolectado fue sometido a un proceso mecánico de corte transversal fino (rodela o láminas delgadas tipo "chifle"), con el propósito de incrementar el área superficial expuesta y acelerar el proceso de deshidratación.

**Deshidratación Térmica:** Las láminas de pseudotallo y raquis se colocaron en una estufa de secado con circulación de aire a una temperatura constante de 50 °C durante un

periodo de una semana (7 días), hasta alcanzar un peso constante que asegurara la eliminación óptima del contenido de humedad sin degradar compuestos termolábiles.

### ***1.7.3 Moliendo y Tamizado de Insumos***

**Procesamiento de Biomasa Seca:** Una vez completada la deshidratación, el material seco se procesó mediante un molino manual de granos para lograr la fragmentación del tejido vegetal hasta obtener un compuesto homogéneo en polvo de tamaño fina de partícula.

**Tratamiento de Insumos Complementarios:** Los insumos complementarios (arrocillo y harina/torta de soya) fueron sometidos a un proceso mecánico de tamizado o cernido con malla fina, con el objetivo de separar y homogeneizar la fracción en polvo, garantizando una granulometría uniforme para el posterior ensamblaje del medio/sustrato.

### ***1.7.4 Procedimiento experimental***

#### **Preparación de los Tratamientos y Esterilización**

**Preparación del insumo:** Se tamizó la materia prima para obtener únicamente el polvo fino y lograr una mezcla uniforme.

**Preparación de las mezclas:** Cada tratamiento se pesó en gramos según las dosis correspondientes y se colocó dentro de su respectivo matraz Erlenmeyer con el agar nutritivo y agua destilada.

**Esterilización:** Los matraces se llevaron a la autoclave durante 30 minutos para eliminar cualquier microorganismo o contaminación. Luego de este tiempo, se dejaron reposar unas horas para que la temperatura bajara gradualmente antes de trasladarlos a la cabina de flujo laminar.

### ***1.7.5 Inoculación, Siembra e Incubación***

**Desinfección y bioseguridad:** Se limpió y desinfectó la cabina de flujo laminar. Se utilizó guantes y mascarilla para mantener las condiciones y evitar la contaminación del cultivo.

**Siembra de *Bacillus subtilis*:** Con ayuda de un asa de inoculación, se sembró la bacteria *Bacillus subtilis* mediante puntos sobre el agar en cada una de las cajas Petri correspondientes a los tratamientos.

**Incubación y evaluación:** Las cajas Petri se guardaron en fundas negras para protegerlas de la luz y mantenerlas en condiciones de incubación adecuadas. Después de los 8, 11 y 14 días se tomaron apuntes del crecimiento de la cepa y se fue evaluado hasta llegar un porcentaje.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Bioinsumos

Los bioinsumos pueden ser clasificados desde diversas perspectivas. En función de su origen, pueden ser de origen vegetal o microbiano; y según su impacto sobre la planta, se dividen en dos categorías principales: biofertilizantes y biopesticidas. Dentro de estas categorías, pueden encontrarse subcategorías, como es el caso de los bioinsecticidas, bioacaricidas, biofungicidas y bactericidas, que pertenecen a los biopesticidas. La manera en que se aplican los bioinsumos puede variar dependiendo del tipo de cultivo y de la fase de desarrollo en la que este se encuentre (Mera, 2019).

Los bioinsumos son productos naturales que provienen de organismos vivos, como hongos, bacterias, material vegetal y otros, por lo que desempeñan una función esencial en el incremento de nutrientes para la agricultura y participan en los ciclos biológicos y químicos, convirtiéndose en herramientas útiles en la agricultura ecológica y tradicional. Estos enfoques se integran con la biofertilización, que favorece la fertilidad, dado que los microorganismos presentes en el suelo pueden aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Se estima que la implementación de bioinsumos en cualquier sistema agrícola ofrecerá significativas ventajas sin causar daños al medio ambiente (Mera, 2019).

#### 2.2 *Bacillus subtilis* características generales

*Bacillus subtilis* es parte de la familia Bacillaceae y se considera una bacteria que, debido a sus propiedades biológicas en la generación de biomoléculas y esporas, tiene una amplia aplicación en la industria agroalimentaria, así como en medicina, cosméticos y en la restauración del medio ambiente. Las características más destacadas de esta especie incluyen su capacidad para persistir en el suelo mediante la interacción con las raíces de las plantas, la producción de diversos compuestos que actúan como aislantes y biocidas, junto con estructuras de resistencia a la sequía, conocidas como esporas. Estas propiedades han sido aprovechadas para crear biopesticidas eficaces en el manejo de plagas agrícolas (Florez, 2023).

Este organismo ha sido utilizado durante un extenso periodo para producir complementos nutricionales destinados tanto a personas como a animales. En tiempos recientes, varias variedades de *Bacillus* han encontrado aplicación en el comercio para la fabricación de

productos cosméticos, fármacos y alimentos. En la industria agrícola, las diferentes especies del género *Bacillus* constituyen cerca del 50 % de los métodos de control biológico disponibles en el mercado global (Antonio, 2012).

### **2.3 Taxonomía y morfología**

Su clasificación taxonómica es la siguiente: Filo: Firmicutes, Clase: Bacilli, Orden: Bacillales, Familia: Bacillaceae, Género: *Bacillus*, Especie: *B. subtilis*. Su ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo o somático y esporulación. El primero ocurre en condiciones bióticas y abióticas favorables, donde la población bacteriana se desarrolla exponencialmente, dividiéndose simétricamente por fisión binaria. En caso de inanición o estrés nutricional, ocurre una segunda fase o formación de endosporas, estructuras de resistencia que pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo, sobrevivir a temperaturas extremas, desecación, pH y radiación solar, que pueden germinar en respuesta a señales químicas ambientales que indican que el ambiente es favorable para el desarrollo vegetativo (Gonzalez, 2023).

*Bacillus subtilis* es un procariota ampliamente distribuido en la naturaleza que ha sido aislado de diversos ambientes. Su forma es bacilar con un diámetro de 850 nm, es grampositivo; generalmente móviles con flagelos peritricos, aeróbicos y anaeróbicos facultativos, además de la catalasa positiva que degrada el almidón. Crece en un amplio rango de pH de 4,9 a 9,3, a temperaturas de 10 a 48 °C y a temperaturas óptimas de 28 a 35 °C, con capacidad de formar endosporas. Es conocida por una amplia gama de compuestos con actividad antimicrobiana y también se considera una fábrica de células con aplicaciones industriales (Schoch, 2020).

### **2.4 Fabricas bacterianas**

Las bacterias de tipo Gram-positivo y Gram-negativo son frecuentemente empleadas en diversos sectores industriales para fabricar proteínas, debido a que las técnicas para extraer productos como proteínas, enzimas y metabolitos en cultivos bacterianos son relativamente económicas (Zadmel, 2017). Las proteínas y metabolitos que varias especies de *Bacillus* pueden generar incluyen, por ejemplo, enzimas, vitaminas e insecticidas (Ver Tabla 1). Esta relación demuestra que con *B. subtilis* no siempre se obtiene una producción elevada de las proteínas deseadas. Por lo tanto, la mejora de los cultivos bacterianos para conseguir un alto rendimiento del producto debe ser un proceso constante que se concentre en los factores que son cruciales para la producción.

**Figura 2.** *Algunas proteínas recombinantes producidas en B. subtilis*

| Producto                 | Rendimiento | Referencia                            |
|--------------------------|-------------|---------------------------------------|
| $\alpha$ -amilasa (AmyQ) | 1– 3 g/L    | (Palva, 1982)                         |
| Proinsulina              | 1 g/L       | (Olmos-Soto & Contreras-Flores, 2003) |
| Lipasa A                 | 600 mg/L    | (Lesuisse et al, 1993)                |
| Estreptavidina           | 35-50 mg/L  | (Wu & Wong, 2002)                     |
| hEGF                     | 7.0 mg/L    | (Lam et al, 1998)                     |
| hIFN- $\alpha$ 2         | 0.5-1 mg/L  | (Palva et al, 1983)                   |
| hIL-3                    | 100 mg/L    | (Westers et al, 2006)                 |
| hIFN- $\gamma$           | 20 mg/L     | (Este estudio)                        |

## 2.5 *Bacillus subtilis* en la agricultura

*Bacillus* spp. favorece el desarrollo de las plantas mediante dos métodos: la conversión de fósforo en las plantas y la resistencia sistémica que generan contra bacterias, hongos patógenos, virus sistémicos y nematodos de raíz. La conversión de fósforo se realiza a través de la liberación de ácidos orgánicos, variaciones de protones y mecanismos de catálisis (actuación de fosfatasas) (Elza, 2023).

La fijación de nitrógeno es el mecanismo mediante el cual el nitrógeno del aire se transforma en amoníaco, una forma de nitrógeno accesible para las plantas. Se ha reportado que *Bacillus* spp. Actúa como fijador de nitrógeno, lo que significa que puede transformar el nitrógeno atmosférico en un formato utilizable por las plantas. Sin embargo, existen pocas fuentes que expliquen cómo funcionan las nitrogenasas de este género. Hay informes que reconocen a este grupo de bacterias como fijadores de nitrógeno, junto con otros microorganismos, demostrando su actividad de nitrogenasa en medios específicos (Elza, 2023).

## 2.6 Beneficios medio ambientales

Uno de los aspectos más destacados de *Bacillus subtilis* es su contribución al agroecosistema, ya que optimiza la calidad del suelo mediante diferentes métodos. Por ejemplo, al generar sustancias antimicrobianas, combate a los patógenos del suelo y promueve un entorno más saludable para las raíces. Siendo una rizobacteria que favorece el desarrollo de las plantas, produce fitohormonas que impulsan el crecimiento de las raíces y brotes. Asimismo, juega un papel en el ciclo de nutrientes al descomponer materias orgánicas y solubilizar fosfatos, lo que facilita que las plantas accedan a estos elementos.

Gracias a la creación de biopelículas, mejora la textura del suelo, lo que contribuye a la conservación del agua y su aireación. Adicionalmente, potencia la resistencia sistémica en las plantas, fortaleciendo sus defensas contra varios patógenos. El *B. subtilis* también tiene un papel en la biorremediación, descomponiendo contaminantes en el suelo y disminuyendo la dependencia de productos químicos. Esta estrategia ecológica para el manejo de plagas y el enriquecimiento del suelo minimiza el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos, promoviendo así prácticas agrícolas más sostenibles (Mendez, 2018).

De acuerdo a investigaciones recientes, este microorganismo podría tener un impacto positivo en la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero si se incorpora directamente a la dieta del ganado. Un análisis llevado a cabo por la Facultad de Ciencias Animales de la Universidad de Florida, examinó cómo la adición de suplementos de *Bacillus subtilis* afectaba la fermentación en el rumen de las vacas. Para esto, los investigadores utilizaron el líquido del rumen de vacas Holstein en la mitad de su período de lactancia, que fueron alimentadas con una mezcla total de ración.

Para evaluar las características de la fermentación del rumen, se recolectaron muestras de líquido tres horas después de que las vacas consumieran su alimento matutino, analizando el pH, el lactato, los ácidos grasos volátiles (AGV), el nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) y la producción total de gas. En este estudio se aplicaron tres tipos de inóculos: un control de celulosa microcristalina, un tratamiento que incluía 10. 000 millones de *B. subtilis* más celulosa microcristalina y otro que contenía 60. 000 millones de *B. subtilis* más celulosa

microcristalina, los cuales fueron evaluados en dietas para vacas en lactancia temprana, medio y vacas secas (Sokra, 2024).

Según los hallazgos logrados, con el tiempo, la incorporación de *Bacillus subtilis* impactó notablemente el pH en el rumen, así como las concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$ , lactato y los AGV totales. Al comparar las dietas enriquecidas con *B. subtilis*, se encontró que las que contenían celulosa microcristalina (MCC) mostraban un pH más alto y niveles inferiores de  $\text{NH}_3\text{-N}$  y lactato.

La inclusión de *Bacillus subtilis* tuvo un efecto en las proporciones de diferentes AGV, lo que señala su compleja influencia en la fermentación en el rumen. Tanto el tipo de inóculo como la alimentación tuvieron un efecto considerable en las proporciones molares de isovalérico y caproato, con valores más altos a medida que se incrementaba la adición de *B. subtilis*. El caproato, conocido también como hexanoato, es un ácido graso de cadena corta que contiene seis carbonos y se genera durante la fermentación de fibras alimenticias por los microorganismos presentes en el tracto digestivo. Los datos sobre la generación de AGV son coherentes con estudios previos, en los cuales se notaron variaciones en las concentraciones de acetato, butirato, valerato e isovalerato tras la adición de *B. subtilis*. Además, este tipo de adición disminuyó considerablemente la producción total de metano en ciertos tipos de dieta, lo que sugiere un posible efecto antimetanogénico, posiblemente relacionado con el aumento en la producción de propionato.

El *Bacillus subtilis* es una bacteria adaptable que proporciona numerosos beneficios en diversas áreas. Fuera del ámbito animal, ayuda a mejorar el suelo, favoreciendo la fertilidad, controlando patógenos y asistiendo en la descomposición de materia orgánica. Este enfoque ecológico disminuye la necesidad de productos químicos y presenta una alternativa sostenible para aumentar la cantidad y la calidad de las cosechas. Cuando se aplica como un microorganismo para la alimentación directa, promueve una digestión eficiente, la absorción de nutrientes y mejora la respuesta inmune al favorecer el bienestar del microbiota intestinal. La optimización enzimática, que abarca amilasa, proteasa y lipasa, mejora la digestión de los nutrientes y la salud intestinal en términos generales. Asimismo, el *B. subtilis* posee propiedades antimicrobianas que bloquean microorganismos dañinos y refuerzan las defensas intestinales contra infecciones. Como indican las últimas investigaciones, también puede disminuir la producción de metano en

los rumiantes, lo que resalta su posible papel en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero en la ganadería (Gamboa, 2024).

## **2.7 Estructura interna y externa del *Bacillus subtilis***

### **Composición celular de *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* es una bacteria de tipo Gram positivo, con forma alargada (como un cilindro), que requiere oxígeno y tiene la habilidad de producir endosporas que resisten condiciones adversas. Esta especie se halla en gran cantidad en el suelo y en entornos que rodean a las plantas, y se emplea con regularidad como modelo en estudios de microbiología y biotecnología gracias a su fácil cultivo, rápido desarrollo y no ser patógena para los humanos.

### **Tamaño y morfología**

Las células vegetativas de *Bacillus subtilis* tienen un tamaño único que varía entre aproximadamente 0.7 y 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo. Estas medidas se expresan en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), donde 1  $\mu\text{m}$  corresponde a 0.001 mm, o lo que es lo mismo, una millonésima parte de un metro. Debido a su forma alargada, se ven como bacilos que a menudo forman pares o cortas cadenas, aunque también pueden aparecer individualmente (Peter, 2023).

### **Estructura externa**

La estructura exterior de *Bacillus subtilis* abarca las capas y componentes que envuelven la célula y que están en contacto inmediato con su entorno.

### **Cápsula o glicocáliz**

Algunas células de *Bacillus subtilis* pueden presentar en su superficie externa una capa polimérica conocida como glicocáliz, que puede adoptar la forma de una cápsula o una capa mucoide. Esta capa está conformada principalmente por polisacáridos, glicoproteínas y otros polímeros orgánicos que se depositan en torno a la pared celular. Si esta capa es organizada, rígida y se adhiere firmemente a la pared con bordes claros, se le llama cápsula; mientras que, si es más desordenada, flexible y poco adherente, se le denomina capa mucoide.

Dicha estructura exterior desempeña roles cruciales en la adaptación de la bacteria a su entorno: facilita la adherencia a distintas superficies y a otras células, ayuda en la creación

de biopelículas, protege contra la deshidratación y algunos antimicrobianos, y en el caso de bacterias patógenas, puede funcionar como un factor de virulencia al interferir con la fagocitosis.

### **Pared celular**

Como una bacteria de Gram positiva, *Bacillus subtilis* tiene una pared celular gruesa y sólida, formada principalmente por peptidoglucano, conocido también como neuropéptido. Esta estructura rígida es fundamental para mantener la forma de bacilo y proteger la célula de la presión osmótica. En esta pared también se hallan ácidos teicoicos y ácidos teurvícoicos, que son polímeros que ayudan en la regulación de la carga superficial de la bacteria, la división celular y la interacción con su entorno y el hospedador.

La pared celular es el elemento clave que causa la reacción de Gram positiva, que se evidencia en la coloración de las células, las cuales adquieren un tinte púrpura al retener el colorante dentro del peptidoglucano (Peter, 2023).

### **Membrana celular**

Directamente debajo de la pared celular se encuentra la membrana celular o citoplasmática, que consiste en una doble capa lipídica que contiene proteínas tanto integrales como periféricas. Esta membrana cumple funciones vitales en el transporte de nutrientes, la eliminación de toxinas, la producción de energía a través de la cadena respiratoria y la creación de gradientes de protones que se utilizan en la síntesis de ATP. Además, se alojan en ella enzimas esenciales que participan en la síntesis de los componentes de la pared celular y en los procesos de división celular (Gutiérrez, 2025).

### **Estructuras de superficie: flagelos y pili**

*Bacillus subtilis* es una bacteria que se puede mover, caracterizada por tener flagelos en su superficie celular que le permiten desplazarse en líquidos y sobre superficies (swarming). Los flagelos son hélices proteicas que giran, facilitando el movimiento de la célula. Además, algunas células pueden tener pili o fimbrias, que son estructuras proteicas más cortas que ayudan en la adhesión a superficies y a otras células, contribuyendo a la formación de biopelículas.

Endospora como estructura especializada de resistencia ante condiciones ambientales adversas, como la escasez de nutrientes, *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de iniciar la

esporulación, formando endosporas sumamente resistentes. La endospora está compuesta por varias capas que actúan como un escudo externo especializado, formado por una costra proteica en el exterior, capas de peptidoglucano alterado (corteza) y membranas internas que envuelven el núcleo de la espora. Esta estructura protege el ADN de la bacteria de situaciones extremas de temperatura, deshidratación y sustancias químicas, permitiendo que la bacteria permanezca en un estado latente hasta que las condiciones sean ideales para la germinación (Gutiérrez, 2025).

### **Estructura interna**

La composición interna de *Bacillus subtilis* incluye los elementos celulares ubicados en la membrana citoplasmática, encargados de las funciones metabólicas, genéticas y de regulación de la célula.

### **Citoplasma**

El citoplasma es un entramado semitransparente que alberga agua, iones, metabolitos y enzimas relacionadas con el metabolismo celular, tales como las responsables de la glucólisis, el ciclo de Krebs y otras rutas bioquímicas. En él se desarrollan procesos fundamentales para el desarrollo, la reproducción y la adaptación a modificaciones del entorno.

### **Ribosomas**

Las células de *Bacillus subtilis* poseen ribosomas 70S, repartidos en su citoplasma, encargados de la producción de proteínas. Estos ribosomas generan tanto proteínas de estructura celular, como enzimas metabólicas y elementos particulares que participan en procesos como la esporulación y la germinación.

### **Genoma y núcleo nuclear**

El ADN de *Bacillus subtilis* se ubica en un nucleoide, sin estar separado por una membrana nuclear, tal como sucede en las bacterias. Generalmente, el genoma es circular e incluye todos los genes esenciales para el crecimiento, el metabolismo, la creación de esporas y las reacciones ante señales del entorno. En esta bacteria, la regulación de la expresión genética es intrincada y se ve afectada por varios sistemas de señalización y factores de transcripción.

### **Estructuras e incorporaciones de almacenamiento**

Bajo ciertas circunstancias de cultivo, *Bacillus subtilis* puede mostrar inclusiones citoplasmáticas, tales como gránulos de polifosfato o reservorios de carbono y energía. Estas estructuras desempeñan roles de almacenaje de nutrientes y ayudan a la bacteria a ajustarse ante variaciones en la disponibilidad de recursos (Gary, 2025).

### **Organización interna de la endospora**

En el proceso de esporulación, la endospora forja una estructura interna especializada que comprende:

- ✓ Una espora central, que alberga el ADN condensado, ribosomas y enzimas vitales para la germinación.
- ✓ Una corteza modificada de peptidoglucano, que ayuda a deshidratar el núcleo y a mantener la resistencia de la espora.
- ✓ Las membranas internas resguardan el núcleo y controlan el ingreso de nutrientes durante el proceso de germinación.

### **TRABAJOS RELACIONADOS**

El propósito de este estudio fue analizar diferentes medios de cultivo alternativos para el crecimiento de bacterias como *Bacillus subtilis*, que serán utilizados en actividades educativas en el laboratorio de análisis de alimentos y microbiología en universidades. Se inició con una revisión de los principales medios de cultivo que se utilizan en el laboratorio, y se reconocieron ingredientes comunes como la panela, el azúcar y la miel económica, que pueden sustituir los insumos comerciales. Se diseñaron dos experimentos considerando las variables de fuentes de carbono y agentes gelificantes para crear medios de cultivo que mantuvieran una estructura funcional parecida a la de los medios comerciales, evitando así interferir en el aprendizaje práctico en el laboratorio. Tras la elaboración, se llevó a cabo una evaluación de la eficacia de los medios de cultivo utilizando una bacteria en condiciones controladas en el laboratorio. Se logró crear un medio de cultivo eficaz para bacterias, utilizando materiales caseros, confirmando así que los medios elaborados son viables y económicos (Rodríguez, 2021).

El bioestimulante Natibac®, que se fundamenta en *Bacillus subtilis* Bs006 y ha sido creado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), ha mostrado un impacto positivo en el crecimiento de diversas producciones de hortalizas y frutas. Para asegurar que este bioproducto funcione correctamente, es crucial confirmar

su asentamiento en el suelo, así como su interacción con varios agroquímicos que podrían influir en la efectividad del componente activo. Propósito. Evaluar el impacto de distintos agroquímicos utilizados en cultivos de frutas y verduras en el desarrollo de *Bacillus subtilis* Bs006, con el fin de ofrecer sugerencias para su integración en las estrategias de manejo sostenible. Materiales y métodos. La investigación se llevó a cabo en 2024 en la Planta Piloto de Bioproductos de AGROSAVIA, ubicada en Mosquera, Colombia. Se examinó el efecto in vitro de 57 agroquímicos comúnmente empleados en el país en el crecimiento de *B. subtilis* Bs006, incluyendo fungicidas, bactericidas, insecticidas, fertilizantes y coadyuvantes, aplicando tres concentraciones distintas. La respuesta de la bacteria a los agroquímicos se determinó al medir los diámetros de los halos de inhibición con una escala de compatibilidad. Se realizó un análisis de varianza para comparar las diferencias entre los tratamientos y se aplicó una prueba de Tukey para las comparaciones múltiples. Resultados. Los fungicidas fluazinam, clorotalonil, triadimenol-tebuconazol y cimoxanilo-propineb, así como el insecticida clorpirifos, redujeron entre un 53 % y un 88 % el crecimiento de *B. subtilis* Bs006 en las dosis que se recomiendan. Por otro lado, varios fungicidas, bactericidas e insecticidas como dimetomorf, carbendazim, flutriafol, kasugamicina, tiabendazol, validamicina A, clorfenapir, metoxifenoza, lambdacialotrina, sulfoxaflor, espiromesifeno, y otros, no inhibieron el desarrollo, al igual que todos los fertilizantes y coadyuvantes analizados. Conclusiones. Los hallazgos sugieren que es técnica y científicamente viable integrar el bioestimulante Natibac® en los programas de manejo sostenible de cultivos junto a los agroquímicos que no perjudican el desarrollo de *B. subtilis* Bs006 (Sandra, 2026).

En la actualidad, existe a nivel global una inclinación hacia el uso de fuentes nutritivas de origen no animal en los medios empleados para fermentaciones dentro de las industrias biofarmacéutica y biotecnológica. Este estudio examina la funcionalidad de un hidrolizado enzimático, derivado de la biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*, como un medio nutritivo en el fomento del desarrollo de *Bacillus subtilis*. Las investigaciones cinéticas no revelaron diferencias significativas entre las trayectorias de crecimiento del microorganismo cultivado en un medio tradicional (base de peptonas bacteriológicas, Amersham) y en el medio elaborado con el hidrolizado microalgal, al mantener concentraciones similares de nutrientes. La tasa específica de crecimiento de *B. subtilis* fue mayor en los cultivos que contenían el hidrolizado proteico algal al 2 % ( $p < 0,05$ ) en

contraste con el medio convencional; en cambio, no se registraron diferencias estadísticamente relevantes en relación al tiempo de duplicación entre los cultivos realizados en ambos tipos de medios. A excepción de la concentración al 1 %, la biomasa celular fue mayor en los medios preparados con el hidrolizado proteico de origen microalgal.

Los desechos agroindustriales incluyen todos los subproductos derivados de las operaciones que implican la transformación de recursos tanto agrícolas como pecuarios. En Costa Rica, el sector primario genera más de 6,3 billones de toneladas de residuos orgánicos. Estos desechos representan un desafío tanto ambiental como económico. Recientemente, han emergido alternativas basadas en biotecnología para aprovechar los residuos agroindustriales, buscando utilizar su valor nutricional para desarrollar microorganismos que puedan producir compuestos de alta demanda comercial. Con esta idea, el estudio actual analizó seis tipos de residuos agroindustriales en Costa Rica para fomentar el crecimiento de *Bacillus subtilis* 168. Asimismo, se llevó a cabo una optimización del medio de cultivo utilizando un diseño factorial completo  $2^3$ , en el que las variables revisadas fueron las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Melaza al 10% m/v, salvado de trigo al 0,5% m/v y  $K_2HPO_4$  al 0,01% como fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, respectivamente, se determinaron como las condiciones ideales para el crecimiento de *Bacillus subtilis* 168 (Porras, 2020).

*Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo que afecta a las plantas y causa grandes pérdidas en frutas tropicales, principalmente debido a su capacidad para generar daños en las hojas y en los frutos tras la cosecha. Las bacterias del tipo *Bacillus* ofrecen una solución para manejar las enfermedades provocadas por este hongo. El propósito de este estudio fue analizar la efectividad antagónica en pruebas de confrontación directa y también mediante el uso de filtrados del cultivo de *B. subtilis* recopilados en el sureste de México. En las pruebas de confrontación directa entre el hongo y las bacterias, las cepas de *Bacillus* demostraron ser capaces de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* en un rango del 62 al 80%, generando halos de inhibición que oscilaron entre 0.20 y 0.88 cm. Con los filtrados de cultivos bacterianos que fueron tratados con calor, se observó que todas las cepas de *Bacillus* lograron reducir el crecimiento de *C. gloeosporioides* entre

un 13 y un 42%, mostrando halos de inhibición de 0. 13 a 0. 26 cm. Además, los filtrados de cultivos de cinco de los aislados afectaron la germinación de conidios, logrando la cepa CBCC2 una inhibición del 70%. Las cepas CBCC2, CBRF24, CBCK47 y CBMN22 demostraron actividad inhibitoria tanto en las pruebas de confrontación directa como en los análisis de los filtrados de cultivos bacterianos, lo que sugiere el potencial de estas cepas para el control de *C. gloeosporioides* (Ruiz, 2014).

El empleo de productos sintéticos que perjudican el entorno ha fomentado la búsqueda de opciones sostenibles. Los lipopéptidos cíclicos (cLp) generados por *Bacillus subtilis* son notables por sus propiedades antimicrobianas y su habilidad para descomponer sustancias hidrofóbicas, posicionándose como competidores de algunos detergentes y su efectividad en la eliminación de compuestos xenobióticos. Propósito: examinar un medio de cultivo que utilice parafina sólida como carbono para la generación de lipopéptidos cíclicos empleando *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168. Métodos: se trabajó con la cepa *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, criada en medio MOLP con parafina o sacarosa como fuente de carbono. Se monitorizó el crecimiento bacteriano durante 13 horas y se analizó la producción de cLp a lo largo de 7 días a través de una técnica de turbidimetría. Resultados: El desarrollo en el medio con sacarosa fue más expedito que en el medio con parafina, sin embargo, la producción de cLp fue superior en el medio con parafina a pesar de su difícil degradabilidad. Conclusiones: *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 puede crecer y generar cLp en un medio con parafina sólida, lo que indica su capacidad para producir metabolitos relevantes, como los cLp, a partir de fuentes contaminantes. La adopción de esta fuente de carbono alternativa podría mejorar la producción de cLp, abriendo nuevas oportunidades para el aprovechamiento de *B. subtilis* debido a su potencial en biotecnología (Saldarriaga, 2025).

Las proteasas que se encuentran fuera de las células forman el grupo más prominente en el mercado internacional de enzimas, gracias a sus múltiples usos en diversas industrias. Su producción a escala industrial resulta costosa, dado que requiere medios de cultivo específicos y condiciones de fermentación controladas. Una opción viable para optimizar la eficiencia, disipar costos y ampliar la disponibilidad de estas enzimas implica seleccionar microorganismos con alta capacidad para generar proteasas extracelulares;

factores como las fuentes de carbono, nitrógeno y iones influyen en este proceso. El objetivo de este estudio es analizar el comportamiento en las fases pre-fermentativa, fermentativa y post-fermentativa al obtener proteasas de *Bacillus subtilis*, usando glucosa como fuente de carbono y urea de cerdo como fuente de nitrógeno, enfocándose en la eficiencia y viabilidad industrial en la producción de las mismas. La metodología del estudio combina enfoques experimentales y técnicas analíticas. Se demostró en la fase pre-fermentativa que la inclusión de 1% de glucosa y 1% de urea de cerdo en el medio nutritivo es vital para maximizar la producción de proteasas extracelulares. Durante la fase de fermentación, se notó que, aunque las bacterias consumieron la mayoría de la glucosa disponible, utilizaron considerablemente la urea para sostener la producción de proteasas. En resumen, los elementos del medio de cultivo, tales como las fuentes de carbono (glucosa), de nitrógeno (urea de cerdo) y los iones, resultaron ser esenciales para evaluar y mejorar notablemente la producción de proteasas (Patricio, 2024).

Se evaluó la viabilidad de fabricar medios de cultivo utilizando residuos como el agua de lavado de papa (ALP) y el hidrolizado del polvo de esmeril de cuero (PEC) para la producción de proteasas alcalinas a partir de una cepa nativa de *Bacillus* sp. que tolera alcalinidad. La multiplicación de la cepa y la producción de proteína verdadera no se vieron influenciadas por los pH de inoculación de 7.0, 8.5 y 9.5, a diferencia de la actividad enzimática, que alcanzó su mejor desempeño a un pH inicial de 9.5. Este pH fue seleccionado para probar dos fuentes de nitrógeno orgánico (PEC y peptona) en ALP con diversas relaciones de carbono a nitrógeno (C/N) que oscilan entre 0 y 4. Al analizar distintas concentraciones de las fuentes de nitrógeno, se observó que la mayor producción de proteína dentro del rango de relaciones C/N estudiado ocurre cuando C/N es igual a 3, utilizando un 0.5% de almidón y peptona. Esto es comparable al máximo conseguido con PEC, utilizando un 1% de almidón y una relación C/N de 1. Esta similitud sugiere que esta enzima podría ser recomendada para futuras investigaciones orientadas a crear medios que ayuden a reducir el impacto ambiental, dentro de la filosofía de cero emisiones (ZERI).

El siguiente ensayo experimental se llevó a cabo en el cantón La Troncal, en la provincia de Cañar, durante el periodo de julio a diciembre de 2019, en un cultivo de pepino. El

propósito principal de esta investigación fue analizar la efectividad del *Bacillus subtilis* como un agente protector frente a enfermedades en los cultivos de pepino (*Cucumis sativus*) en el cantón La Troncal. El experimento incluyó cinco tratamientos, uno de los cuales fue el control, y cada tratamiento fue evaluado mediante cuatro repeticiones, sumando un total de 20 unidades experimentales organizadas en un solo bloque; para su desarrollo, se empleó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA). Los tratamientos fueron los siguientes: T1 *Bacillus subtilis* 0.5 l/ha, T2 *Bacillus subtilis* 1 l/ha, T3 *Bacillus subtilis* 1.5 l/ha, T4 *Bacillus subtilis* 2 l/ha y T5 Control. Las variables consideradas fueron: porcentaje de incidencia de patógenos, altura de la planta, diámetro del fruto, longitud del fruto, cantidad de frutos, peso del fruto, rendimiento en kg/ha y relación costo-beneficio. Para la evaluación estadística se aplicó un análisis de varianza y la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Según los resultados, el tratamiento 4 mostró un rendimiento significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos, alcanzando 33565,1 kg/ha; obteniendo así un retorno de \$1,02 por cada dólar invertido, mientras que los otros tratamientos reportaron ganancias similares de \$0,91. El control fue el que presentó el retorno neto más bajo, con \$0,51. Esto nos lleva a recomendar el uso de antagonistas para el control de enfermedades en la región agrícola de La Troncal (Rojas, 2021).

La producción y la calidad del chile están restringidas por diversas enfermedades provocadas por hongos como *Phytophthora capsici*. El control químico de estas enfermedades conlleva altos costos tanto económicos como ambientales. Por este motivo, una opción para manejar el hongo es aplicar el control biológico utilizando *Bacillus subtilis*. Como resultado de lo anterior, el propósito de esta investigación fue identificar el porcentaje de inhibición in vitro de *B. subtilis* frente al fitopatógeno *P. capsici* en distintos medios de cultivo líquidos, con el fin de evaluar la viabilidad biológica en un reactor artesanal del tipo airlift. El ensayo in vitro se realizó en platos de Petri, utilizando el medio de cultivo PDA, la cepa QST713 de *B. subtilis* y el hongo *P. capsici*. Se probaron medios de cultivos líquidos (caldos nutritivos) en matraces Erlenmeyer con 200 mL de agua, organizados en un diseño completamente al azar que incluyó 8 tratamientos y 6 repeticiones: T1, almidón de arroz; T2, almidón de maíz; T3, almidón de trigo; T4, Peptona más azúcar morena; T5, glucosa más fructosa; T6, glucosa más almidón de maíz,

almidón de arroz y almidón de trigo; T7, peptona más azúcar morena, almidón de maíz, arroz y trigo; T8, peptona más azúcar morena, glucosa, almidón de maíz, arroz y trigo.

Se construyó el reactor air lift y se estudió la curva de crecimiento de *B. subtilis* durante 24 horas. Los resultados indicaron que la bacteria logró un 64 % de efectividad en la inhibición del hongo. El medio de cultivo que contenía almidón de trigo presentó un efecto significativo (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) en relación con el crecimiento de la bacteria, donde después de 5 horas se registraron más de  $1 \times 10^9$  UFCs, lo cual es considerado adecuado para la producción de *B. subtilis* (Mendez, 2017).

## CAPÍTULO III

### DESARROLLO DE LA PROPUESTA

#### 1. Descripción del Sistema o Proceso

El proyecto incluye la planificación y puesta en marcha de un laboratorio experimental físico destinado a la analítica y procesamiento de muestras. El sistema funciona a través de un espacio de bioseguridad que está optimizado y separado, interactuando con áreas externas para apoyo, muestreo y almacenamiento.

**La organización del proceso funcional dentro del laboratorio es la siguiente:**

**Recepción y Muestreo Exterior:** Recepción de insumos o muestras en la sección frontal habilitada con un mostrador de granito y vitrina.

**Preparación y Procesamiento:** Utilización de la mesa principal en forma de "L" (3,85 m x 3,25 m) para manipular insumos y llevar a cabo formulaciones.

**Tratamiento Térmico / Cocción:** Área delimitada en el interior de la mampara destinada para operaciones térmicas que utilizan quemadores y estación de cocción.

**Conservación y Almacenamiento:** Proceso de conservación de muestras y materiales en un sistema de refrigeración de acero inoxidable, además de un almacenamiento adicional en el módulo contiguo (0,77 m x 0,60 m).

#### 2. Diseño y Selección de Tecnologías, Herramientas o Equipos a Implementar Geometría y Acondicionamiento Arquitectónico

**Área Total de Trabajo (La):** Longitud principal de 3,85 m con pared frontal bajo una ventana que mide 1,15 m.

**Módulo Aislado (Mampara):** Estructura de perfiles de aluminio con vidrio templado para asegurar el aislamiento térmico y ambiental en la zona interna.

**Piso:** Material cerámico de alta resistencia, diseñado con acabado de madera para facilitar la limpieza y mantener la asepsia.

**Cubierta Superior:** Estructura de terraza de 4,15 m compuesta por cinco paneles de dura techó, cada uno de 0,90 m de ancho útil.

### Equipos y Mobiliario Seleccionado

**Mesón Principal en "L":** Dimensiones de 0,60 m de ancho, con una sección larga de 3,85 m y un retorno lateral de 3,25 m.

**Sistema de Refrigeración:** Conservador de acero inoxidable para mantener la temperatura de las muestras.

**Estación de Procesamiento Térmico:** Equipamiento de quemadores y planchas de cocción sobre una estructura robusta.

**Acometida Eléctrica y Red:** Panel de distribución eléctrica con medidas de protección y señalización de seguridad indicando "Riesgo Eléctrico".

### 3. Plan de implementación

**Tabla 6.** Listado de materiales y cantidades para la implementación de la infraestructura

| Categoría       | Materia/ Descripción                    | Cantidad Requerida     |
|-----------------|-----------------------------------------|------------------------|
| Mampostería     | Bloques de hormigón (filas base         | 150 unidades (70 + 80) |
| Agregados       | Arena de grano medio                    | 5 m <sup>3</sup>       |
| Aglomerantes    | Cemento                                 | 4 sacos                |
| Estructura      | Varillas de hierro corrugado            | 12 varillas            |
| Bases metálicas | Plancha metálica (155cm x 8mm)          | 1 unidad               |
| Cubierta        | Láminas de dura techó (4,15 m x 0,90 m) | 5 laminas              |

### 4. Descripción y Verificación del Funcionamiento del Equipamiento, Herramienta o Método Implementado / Resultados y Análisis

#### Verificaciones de Funcionamiento y Validación

**Prueba de Aislamiento y Seguridad Biológica:** Confirmación del sellado en las uniones de las mamparas de aluminio y vidrio para prevenir la contaminación cruzada.

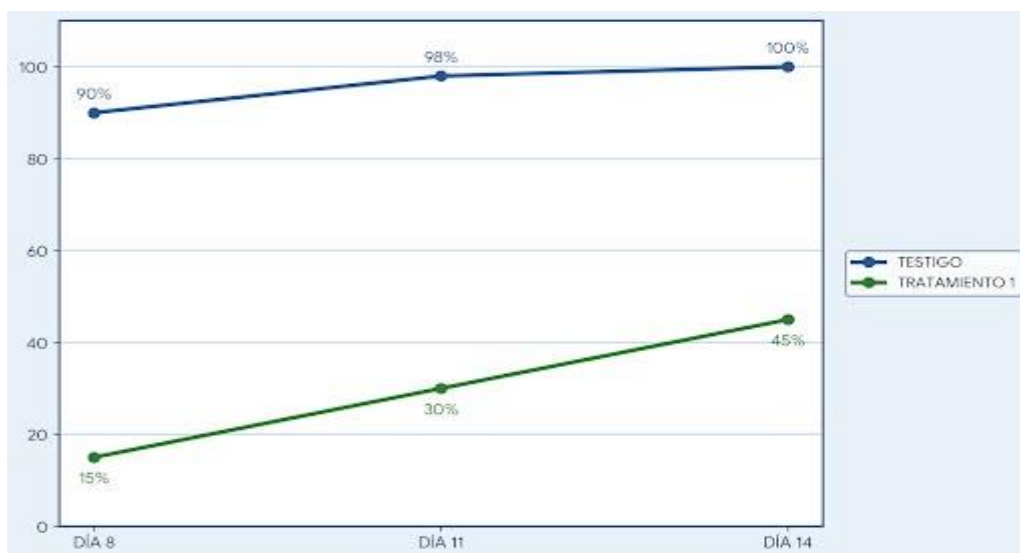
**Prueba Eléctrica y Térmica:** Evaluación de carga en el tablero eléctrico de protección al activar simultáneamente la unidad de refrigeración y los sistemas de cocción.

**Evaluación de Ergonomía y Flujo:** Inspección del área de paso de 1,00 m de ancho, lo que permite un movimiento fluido entre la zona de preparación (mesón en "L") y el área interna de procesamiento.

La adecuación de la infraestructura favoreció la creación de un área experimental segura y operativa. El diseño modular optimizó el espacio disponible (3,85 m de largo) asegurando la separación entre las operaciones húmedas/térmicas y la zona limpia para muestreo exterior.

## RESULTADOS

**Figura 3.** Comparativa de colonización en caja Petri entre el testigo y el tratamiento 1 aplicado.



**Testigo (Línea azul):** Comienza la evaluación el Día 8 con un alto nivel de colonización del 90%, subiendo al 98% en el Día 11 y logrando una colonización completa (100%) en el Día 14.

**Tratamiento 1 (Línea verde):** Los resultados son notablemente más bajos, empezando en el Día 8 con un 15%, aumentando gradualmente hasta alcanzar el 30% en el Día 11 y finalizando la medición el Día 14 con un 45% de colonización.

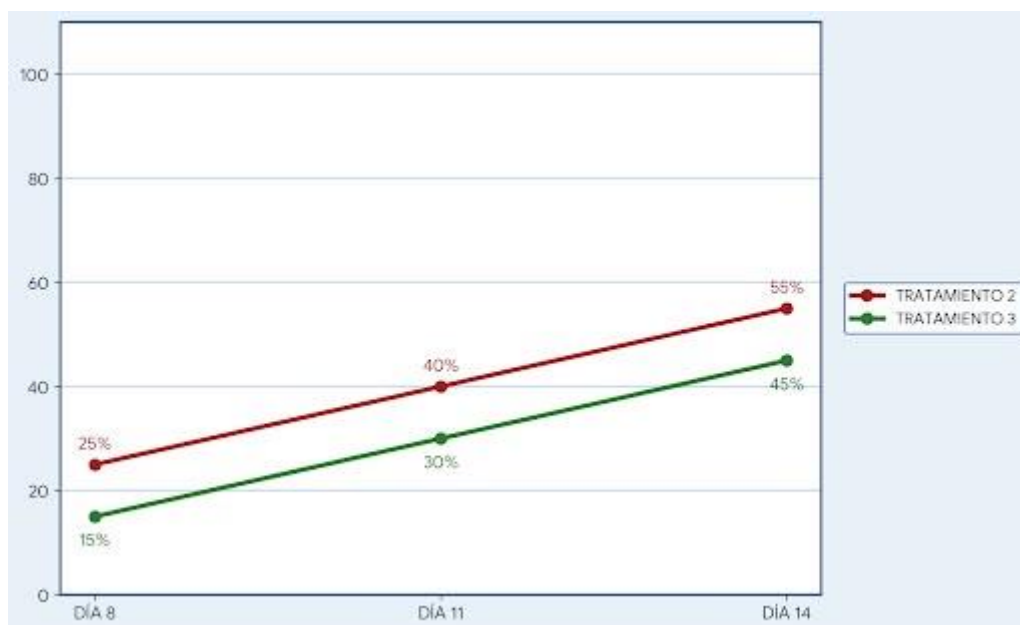
Los resultados indican que el Tratamiento 1 reduce considerablemente la velocidad de crecimiento del microorganismo analizado en comparación con la muestra (Testigo). Mientras que la unidad de control experimenta una rápida colonización que llena completamente el plato Petri para el día 14.

Este efecto inhibitorio respalda lo mencionado por (Sandoval, 2026), quienes afirman que la eficacia de los tratamientos y agentes de biocontrol en condiciones in vitro se basa en su habilidad para limitar el crecimiento micelial o poblacional mediante la reducción del espacio y el agotamiento de recursos, ralentizando de este modo la dinámica de crecimiento bacteriano o fúngico en comparación con un control estándar.

La notable diferencia entre la curva de la muestra del Testigo y del Tratamiento 1 resalta la vulnerabilidad del microorganismo frente al insumo o tratamiento usado. La rápida saturación del Testigo (del 90% al 100%) indica la adecuación del medio de cultivo y las condiciones de incubación en el laboratorio para el crecimiento microbial en ausencia de factores limitantes.

Por otro lado, el crecimiento moderadamente lineal del Tratamiento 1 (de 15% a 45%) sugiere que hay una actividad bacteriostática o fungistática continua. Aunque el microorganismo retiene cierta capacidad de expansión con el tiempo, la diferencia de 55 puntos porcentuales observada al día 14 confirma que el Tratamiento 1 es una opción efectiva para lograr un control sólido sobre la colonización en condiciones in vitro.

**Figura 4.** *Porcentaje de colonización microbiana comparativo entre el tratamiento 2 y el tratamiento 3.*



Tratamiento 2 (Línea roja/café): Comienza en el Día 8 con una colonización del 25%, se eleva gradualmente al 40% en el Día 11 y llega al 55% al fin del ensayo en el Día 14.

Tratamiento 3 (Línea verde): Muestra un crecimiento inferior en todo momento, comenzando en el Día 8 con un 15%, aumentando al 30% en el Día 11 y alcanzando un 45% de colonización en el Día 14.

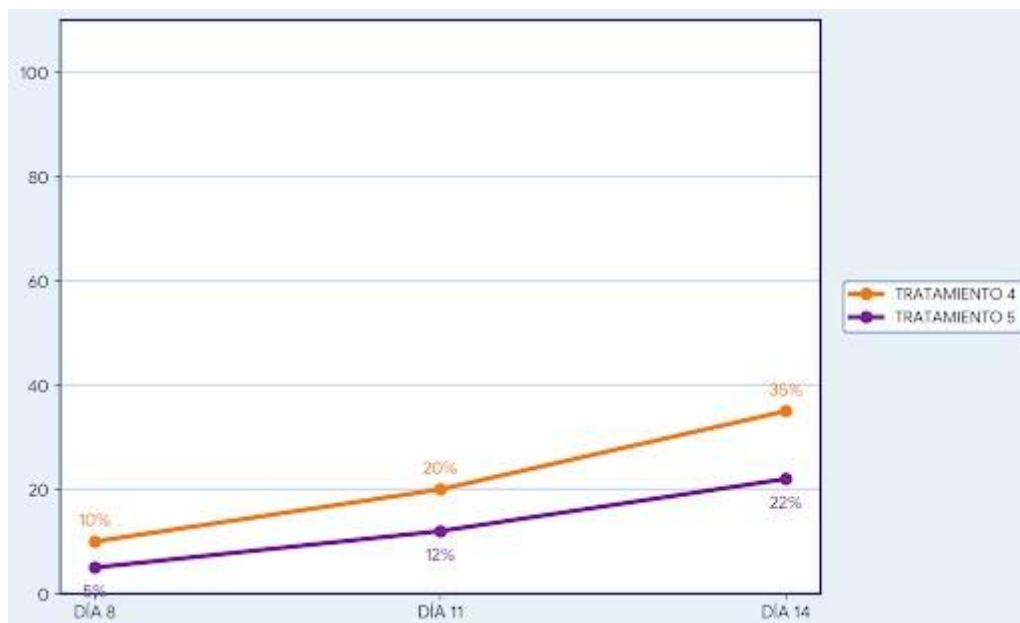
El Tratamiento 3 evidencia una mejor capacidad para contener o limitar la expansión del microorganismo al compararlo con el Tratamiento 2, ya que mantiene una diferencia constante de 10 puntos porcentuales a lo largo de toda la evaluación. La variación en la tasa de crecimiento sugiere que la formulación o la dosificación del Tratamiento 3 produce condiciones que generan mayor eficacia.

Esta investigación coincide con lo señalado por (Stefanello, 2020), quienes indican que la eficacia de los sustratos o tratamientos con propiedades antagónicas se basa en su habilidad para disminuir la tasa de expansión radial del micelio o colonia a través de la competencia por nutrientes y espacio en el medio de cultivo.

Al examinar ambos tratamientos, se puede notar que ambos exhiben una tendencia de aumento lineal positivo desde el Día 8 hasta el Día 14. No obstante, ninguno supera el 60% de colonización al final de la medición, lo que sugiere que ambas fórmulas ejercen un grado de limitación en comparación con un control sin tratamiento.

La ventaja del Tratamiento 3 (45% frente al 55% del Tratamiento 2 al día 14) resalta la necesidad de perfeccionar la selección o la concentración del sustrato. Esta diferencia en la respuesta microbiológica muestra que ajustes menores en los elementos del tratamiento pueden causar efectos importantes en la velocidad de propagación, lo que es crucial para el diseño de medios de cultivo y tácticas de biocontrol en condiciones experimentales en laboratorio.

**Figura 5.** *Dinámica de crecimiento y colonización microbiana según los tratamientos 4 y tratamiento 5.*



Tratamiento 4 (Línea marrón/naranja): Comienza el Día 8 con un 10% de colonización, aumenta al 20% en el Día 11 y concluye el Día 14 alcanzando un 35%.

Tratamiento 5 (Línea púrpura): Presenta los niveles de colonización más bajos en la evaluación, comenzando el Día 8 con solo un 5%, incrementándose gradualmente al 12% en el Día 11 y cerrando el seguimiento con un 22% el Día 14.

El Tratamiento 5 muestra la mayor eficacia en la limitación del crecimiento microbiano entre las opciones analizadas, manteniendo la colonización por debajo del 22% al finalizar la prueba in vitro. La inclinación menos pronunciada en la gráfica del Tratamiento 5 indica una tasa de propagación notablemente más lenta en comparación con el Tratamiento 4 (35%) y los tratamientos anteriores.

Esta conclusión avala los conceptos expuestos (Sandoval, 2026), quienes sostienen que la acción antagonista de las cepas de *Bacillus subtilis* y de los inhibidores biológicos en medios de cultivo está directamente relacionada con la dosis o la formulación usada, logrando reducciones significativas en la colonización gracias a la producción de metabolitos secundarios y la limitación del espacio físico en condiciones de laboratorio.

Al examinar la dinámica general del experimento, las formulaciones presentadas en la Figura 5 (Tratamiento 4 y Tratamiento 5) exhiben las tasas de colonización más reducidas

en comparación con los tratamientos mostrados en figuras previas (que variaban entre el 45% y el 100%).

El comportamiento estable de la gráfica del Tratamiento 5 (que solo progresó del 5% al 22% en seis días) sugiere un fuerte efecto de inhibición o biocontrol sobre el crecimiento del microorganismo. Esto sugiere que la composición del Tratamiento 5 favorece condiciones de limitación nutricional o competencia biológica, emergiendo como la opción más efectiva para frenar el establecimiento y la expansión microbiana en placas Petri bajo condiciones experimentales controladas.

**Tabla 7.** Resultados del porcentaje de colonización en las cajas Petri según el tratamiento.

| Tratamiento   | Porcentaje de colonización-Día 8 | Porcentaje de colonización-Día 11 | Porcentaje de colonización-Día 14 |
|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Testigo       | 90%                              | 98%                               | 100%                              |
| Tratamiento 1 | 15%                              | 30%                               | 45%                               |
| Tratamiento 2 | 25%                              | 40%                               | 55%                               |
| Tratamiento 3 | 15%                              | 30%                               | 45%                               |
| Tratamiento 4 | 10%                              | 20%                               | 35%                               |
| Tratamiento 5 | 5%                               | 12%                               | 22%                               |

En este apartado se describen los resultados obtenidos en la prueba de colonización microbiana en platos de Petri, examinados a los 8, 11 y 14 días de incubación para cinco tratamientos y un grupo de control. El análisis de los datos sin procesar se llevó a cabo a través del cálculo de los promedios porcentuales del área ocupada por colonias.

Al analizar la Figura 1, se puede notar que el grupo de Control (Testigo) mostró el desarrollo más acelerado y agresivo, alcanzando una colonización de casi el 90% al octavo día y logrando el 100% de cobertura al día 14. Este patrón respalda la capacidad y alta tasa de replicación del microorganismo bajo las condiciones de control.

En cambio, todos los tratamientos aplicados demostraron cierto nivel del crecimiento microbiano en comparación con el grupo de Control. Se estableció una jerarquía en la efectividad de los tratamientos evaluados.

Los tratamientos más sobresalientes para limitar la colonización fueron el T5 y el T4. El Tratamiento 5 (T5) mantuvo los niveles más bajos de colonización a lo largo de todo el

estudio, comenzando con solo un 5% al día 8 y concluyendo con un 22% al día 14, indicando la mayor capacidad observada. Por otro lado, el Tratamiento 4 (T4) mostró un comportamiento similar, aunque con una eficiencia levemente inferior, finalizando el experimento con un 35% de área colonizada.

Un nivel moderado de capacidad se observó en el Tratamiento 1 (T2) y el Tratamiento 3 (T3). El T2 concluyó con un 45%, mientras que el T3 registró un crecimiento superior, alcanzando un 55% de colonización al día 14. Aunque el Tratamiento 2 mostró una colonización final intermedia del 45%, mantuvo una pendiente de crecimiento constante desde el día 11 (30%) hasta el día 14.

La conclusión principal que se extrae de estos hallazgos es que hay un impacto biológico directo de las intervenciones realizadas en la tasa de colonización del microorganismo. La disparidad estadística evidente entre el 100 por ciento del grupo control y el 22 por ciento del Tratamiento 5 al día 14 constituye un fuerte argumento que respalda la posible eficacia de los componentes o condiciones del T5 como métodos de control microbiano.

El comportamiento del grupo control proporciona la referencia esencial para confirmar la validez del experimento. Si el grupo control no hubiese alcanzado el 100 por ciento, no se podría garantizar que las bajas tasas observadas en los tratamientos fueron causadas por la inhibición y no por una falta de viabilidad del inóculo.

Al comparar los hallazgos de este estudio con investigaciones anteriores en el ámbito de control biológico y la inhibición de microorganismos *in vitro*, se notan similitudes importantes en la progresión de crecimiento y la efectividad de los tratamientos analizados.

El desempeño del grupo Testigo, que presentó un 90% de colonización el día 8 y llegó al 100% para el día 14, coincide con lo que reportaron (Pérez, 2025). En sus investigaciones sobre el crecimiento microbiano en medios sólidos, los grupos de control que no recibieron tratamiento alcanzaron una saturación total de la superficie entre los 10 y 14 días de incubación. Esto respalda la viabilidad del inóculo utilizado y confirma que el medio de cultivo proporcionó las condiciones nutricionales ideales para el desarrollo sin limitaciones del microorganismo.

La notable eficacia del Tratamiento 5 (22% de colonización final) y del Tratamiento 4 (35%) está de acuerdo con los resultados de (Moreno Riaño, 2017), al estudiar la eficacia

biocontroladora de extractos orgánicos y productos biológicos concentrados. Estos investigadores indicaron que los metabolitos secundarios bioactivos presentes generan un considerable retraso en la germinación de esporas y el crecimiento de hifas, logrando mantener la cobertura superficial por debajo del 25% durante las primeras dos semanas de análisis.

Por otro lado, los Tratamientos 1 y 3 (ambos alcanzaron 45% al día 14) y el Tratamiento 2 (55%) mostraron una capacidad moderada de inhibición. Un comportamiento similar fue registrado por (Carvajal, 2012) al probar dosis moderadas de biopreparados; su estudio reveló una inhibición efectiva en los primeros 8 días, seguida de un incremento gradual en la expansión del micelio en la segunda semana. Este comportamiento puede atribuirse a una posible volatilización o degradación lenta de los componentes activos en la caja de Petri con el tiempo, permitiendo que el microorganismo ajuste su metabolismo y supere en parte el efecto de contención inicial.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

Evaluación de la Eficiencia de Colonización, se comprobó que el grupo Testigo alcanzó la mayor capacidad de colonización y desarrollo celular sobre el medio de cultivo, logrando cubrir hasta el 100% de la superficie disponible al finalizar el periodo de observación.

Los tratamientos evaluados (T\_1 a T\_5) mostraron un desarrollo significativamente menor y más controlado en comparación con el testigo, caracterizado por la presencia de colonias aisladas y distribuidas heterogéneamente. Esto demuestra una variación en la velocidad e intensidad de crecimiento según el insumo/dosificación aplicada.

La metodología aplicada en la cabina de flujo laminar y la esterilización mediante auto clave durante 30 minutos resultaron efectivas, permitiendo el desarrollo de la cepa evaluada sin la interferencia de contaminantes externos durante el periodo de incubación.

### RECOMENDACIONES

Se recomienda mantener y formalizar intervalos continuos de medición (cada 3 días hasta completar el ciclo total) para registrar con mayor precisión la curva de crecimiento bacteriano y determinar el punto exacto de máxima velocidad de colonización.

Para reducir el margen de error experimental y aumentar la validez estadística de los resultados, es aconsejable incrementar el número de repeticiones por tratamiento en futuras investigaciones.

Se sugiere mantener un monitoreo constante de la temperatura y humedad durante la fase de incubación en las fundas oscuras, asegurando que las condiciones ambientales permanezcan homogéneas para todas las cajas Petri.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams. (2000). *OXFORD ACADEMIC*,  
<https://academic.oup.com/femsre/article/33/1/152/2683634>.
- al, S. e. (2020). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2022000100318&script=sci\\_arttext#B79](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2022000100318&script=sci_arttext#B79).
- Antonio, J. (2012). *IPICYT Repositorio*,  
<https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1010/850>.
- Bouassida. (2017). *FACULTA DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS*,  
<https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10881/1/UDLA-EC-TIB-2019-19.pdf>.
- Duhan. (2018). *Bioresources and Bioprocess*,  
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mr.55.3.395-424.1991>.
- Elza. (2023). *FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL*,  
<https://dspace.esPOCH.edu.ec:8080/server/api/core/bitstreams/a874f78a-8bab-45af-bb86-67a0419a8a4d/content>.
- Florez. (2023). *FAO AGRIS*,  
<https://agris.fao.org/search/en/providers/125312/records/67655e4e6a5a95f3405abb5e>.
- Gamboa. (2024). *Tecnologico Nacional de Mexico*,  
<https://rinacional.tecnm.mx/bitstream/TecNM/9546/2/TESIS%20REPOSITORIO%20JULIO%20GAMBOA.pdf>.
- Gary. (2025). *Libretexts*,  
[https://batch.libretexts.org/print/url=https://espanol.libretexts.org/Bookshelves/Biologia/Microbiologia/Libro:\\_Microbiolog%C3%ADa\\_\(Kaiser\)/Unit\\_1:\\_Introducci%C3%B3n\\_a\\_la\\_Microbiolog%C3%ADa\\_y\\_Anatom%C3%ADa\\_Celular\\_Procariota/2:\\_La\\_C%C3%A9lula\\_Procariota\\_-](https://batch.libretexts.org/print/url=https://espanol.libretexts.org/Bookshelves/Biologia/Microbiologia/Libro:_Microbiolog%C3%ADa_(Kaiser)/Unit_1:_Introducci%C3%B3n_a_la_Microbiolog%C3%ADa_y_Anatom%C3%ADa_Celular_Procariota/2:_La_C%C3%A9lula_Procariota_-).
- Gonzalez, Y. (2023). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2022000100318&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2022000100318&script=sci_arttext).
- Gutiérrez, E. B. (2025). *Scielo*, <https://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v28/1405-888X-tip-28-00007.pdf>.
- Hilbert. (2006). *FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS*,  
<https://academic.oup.com/femsre/article/33/1/152/2683634>.
- Holtzendorff. (2004). *OXFORD ACADEMIC*,  
<https://academic.oup.com/femsre/article/33/1/152/2683634>.
- Mendez. (2017). *CULTIVO DE Bacillus subtilis CEPA QST 713. Universidad de Guadalajara*,  
<https://agronomosudg.com/2017/02/15/cultivo-de-bacillus-subtilis-cepa-qst-713/>.
- Mendez. (2018). *Nexo*, file:///C:/Users/nicol/Downloads/Dialnet-AislamientoEIdentificacionDeBacillusSubtilisYEvalua-6483874.pdf.

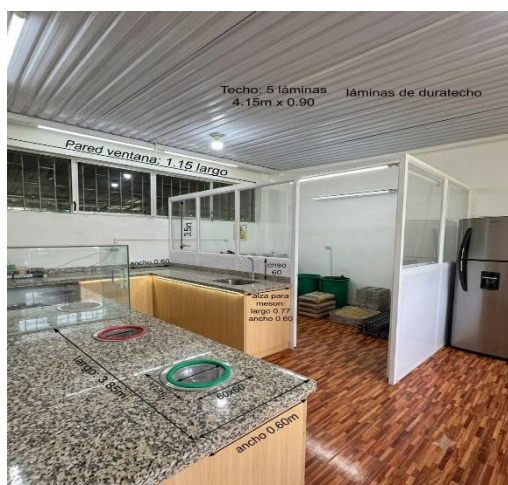
- Mera. (2019). *FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL*, <https://dspace.esPOCH.edu.ec:8080/server/api/core/bitstreams/a874f78a-8bab-45af-bb86-67a0419a8a4d/content>.
- Moser. (2015). *WILEY*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x#b1>.
- Pandey. (2017). *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84., <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00302/full>.
- Patricio, M. (2024). Producción de proteasas extracelulares del género (*Bacillus subtilis*) para su aplicación en la industria alimentaria mediante procesos biotecnológicos. *Dialnet*, <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9964099>.
- Peter. (2023). *National library of medicine*, <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9910062/>.
- Porras, L. (2020). Evaluación de residuos agroindustriales producidos en Costa Rica para la formulación de un medio de cultivo de bajo costo utilizando *Bacillus subtilis* 168. *Dialnet*, <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7632830>.
- Rodriguez. (2021). Elaboración de medios de cultivo alternativos y viables para el crecimiento microbiano del *Bacillus Subtilis*. *Lauinvestiga*, <https://revistasoj.s.UTN.edu.ec/index.php/lauinvestiga/es/article/view/472>.
- Rojas, G. (2021). EFECTO DEL *Bacillus subtilis*. *UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR*, <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ZAMBRANO%20VALDIVIEZO%20LEONARDO%20JAVIER.pdf>.
- Ruiz, E. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)\*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342014000700015&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342014000700015&script=sci_arttext).
- Saldarriaga, C. (2025). Producción de Lipopéptidos cíclicos por *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* str. 168 en un medio convencional modificado con parafina sólida. *Universidad de Antioquia*, <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/entities/publication/27686f38-4d4a-4e32-9a58-37d79a88d1a7>.
- Samaniego. (2016). *FACULTA DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS*, <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10881/1/UDLA-EC-TIB-2019-19.pdf>.
- Sandra. (2026). Efecto de adyuvantes, fungicidas, bactericidas e insecticidas sobre el crecimiento de *Bacillus subtilis* Bs006. *Agronomía Mesoamericana*, [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212026000100039&lang=en](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212026000100039&lang=en).
- Schoch. (2020). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2022000100318&script=sci\\_arttext#B79](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2022000100318&script=sci_arttext#B79).
- Sokra. (2024). *Journal of Agriculture and Technology* (2024) 2(2), 1–11, <file:///C:/Users/nicol/Downloads/Issue2Page1-11.pdf>.

Sonenshein. (2012). *WILEY*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x#b1>.

Yanez. (2012). *UNIVERSIDAD TECNICA DE BABAHOYO*,  
<https://dspace.utb.edu.ec/server/api/core/bitstreams/f43fc18c-1e09-48ea-8f4e-70fd1b26944c/content>.

Zadmel. (2017). *IPICYT*,  
<https://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/handle/11627/3082/TDIPICYTR6P72012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

## ANEXOS



**Figura 6.** Resultado de implementación



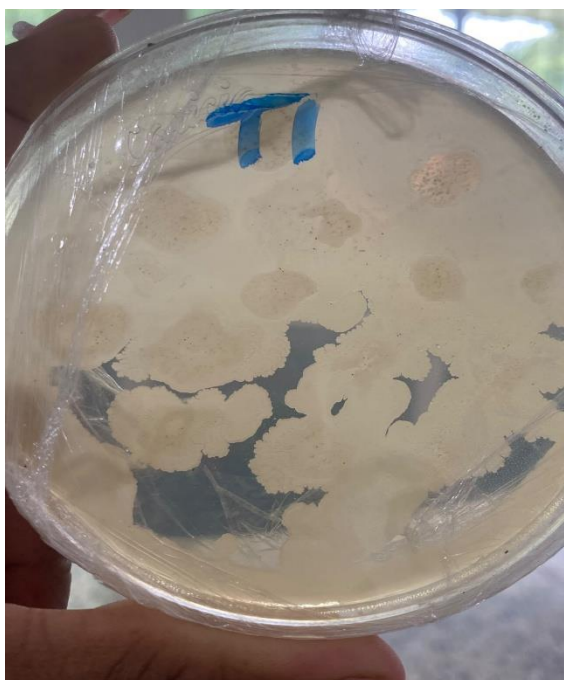
**Figura 7.** Insumos y materias primas tamizados para la preparación de los tratamientos



**Figura 8.** Preparación de tratamiento con sus respectivas dosis.



**Figura 9.** Siembra de inoculación de *bacillus subtilis* en la cabina de flujo laminar.



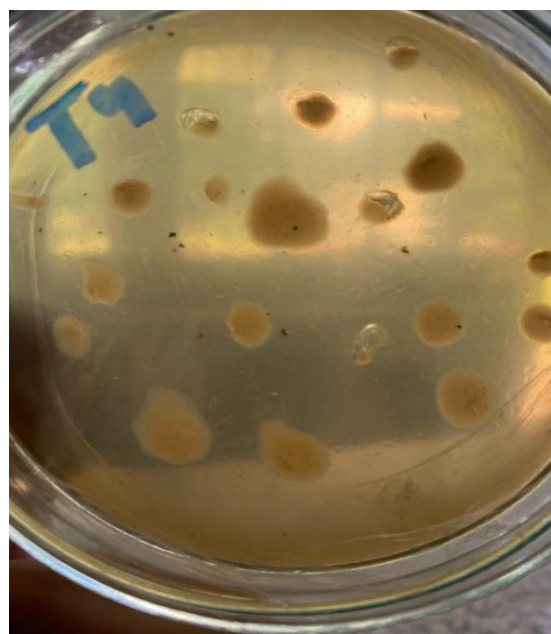
**Figura 10.** Es el grupo control con la mayor tasa de expansión, mostrando una invasión prácticamente completa del medio de cultivo.



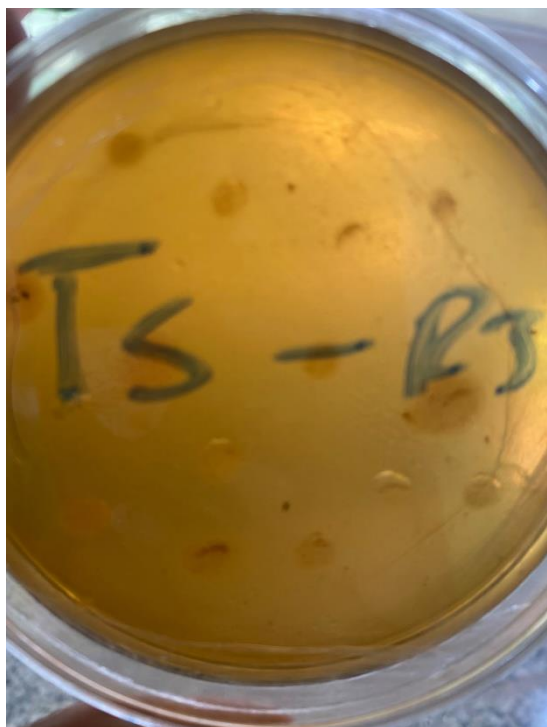
**Figura 11.** El medio se conserva transparente, lo que indica un crecimiento puntual controlado sin función de colonias.



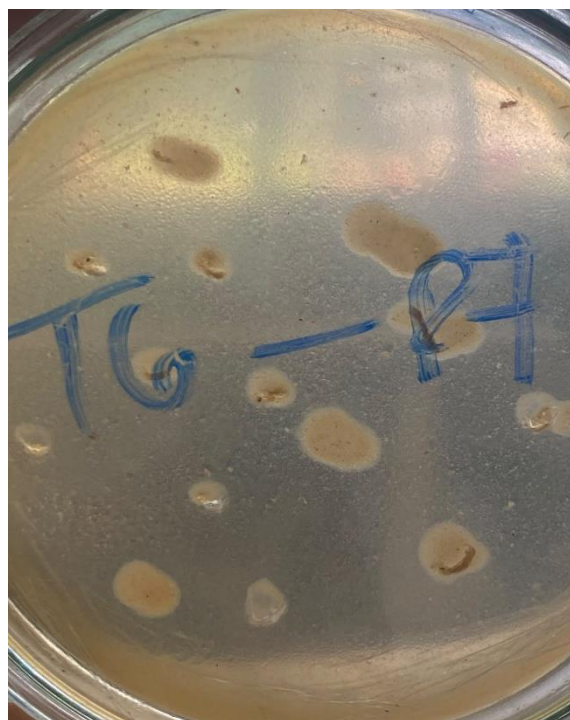
**Figura 12.** Crecimiento bacteriano definido, pero con una aérea libre de agar bastante amplia.



**Figura 13.** Presenta menor cantidad de unidades formadoras de colonias aisladas.



**Figura 14.** Crecimiento de colonias pequeñas y dispersas en medio de cultivo.



**Figura 15.** Escaso desarrollo de colonias microbianas puntiformes.



## Tesis Finalizada Cagua Barre Eny Nicolle - Compilatio copia

ID : 86bb8d29690d3a078d9212b4339b12f9c8e9ccc0



8%

Textos sospechosos

Nombre del fichero : Tesis Finalizada Cagua Barre Eny Nicolle - Compilatio copia.txt  
Tamaño del archivo original : 353,07.kB  
Número de palabras : 8716

Depositante : Nexar Cobeña Loor  
Fecha de depósito : 2 de agosto de 2026  
Tipo de carga : interface  
fecha de fin de análisis : 2 de agosto de 2026

### Resumen (sección 1/2)

Localización de los textos sospechosos en el documento :



Incluido en el porcentaje de textos sospechosos :



#### Similitudes

6%

Pasajes con similitudes a fuentes encontradas en diferentes colecciones.



#### Detección de IA

3%

Textos estilísticamente próximos a un texto generado por una IA.

Este índice es un indicador y no una prueba. Comprueba con el autor si domina los conocimientos mencionados en el documento.



#### Idiomas no reconocidos

5%

Pasajes en los que parte del vocabulario utilizado no forma parte del diccionario de la lengua.  
Puede tratarse de un intento del autor de modificar el texto para evitar ser detectado.



No incluido en el porcentaje de textos sospechosos :



#### Textos entre comillas

0%

Pasajes entre comillas, a menudo indicativos de una cita.