



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BAL Y  
3-PIRIDINCARBOXAMIDA SOBRE *BOTRYTIS CINEREA* DE  
FRESAS**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**QUÍMICA/O**

**AUTORES:**

LIGIA LILIANA ESCUDERO VILEMA

PABLO HERNÁN PÉREZ LONDO

Riobamba – Ecuador

2023



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BAL Y**  
**3-PIRIDINCARBOXAMIDA SOBRE *BOTRYTIS CINEREA* DE**  
**FRESAS**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**QUÍMICA/O**

**AUTORES:** LIGIA LILIANA ESCUDERO VILEMA

PABLO HERNÁN PÉREZ LONDO

**DIRECTORA:** Dra. JANNETH MARIA GALLEGOS NUÑEZ, PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

**©2023, Ligia Liliana Escudero Vilema & Pablo Hernán Pérez Londo**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotros, LIGIA LILIANA ESCUDERO VILEMA y PABLO HERNÁN PÉREZ LONDO, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra auditoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 21 de marzo de 2023



**Ligia Liliana Escudero Vilema**

**C.I:060511742-3**



**Pablo Hernán Pérez Londo**

**C.I.: 06044880-7**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA QUÍMICA**

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BAL Y 3-PIRIDINCARBOXAMIDA SOBRE *BOTRYTIS CINEREA* DE FRESAS**, realizado por los señores **LIGIA LILIANA ESCUDERO VILEMA** y **PABLO HERNÁN PÉREZ LONDO**, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el tribunal autoriza su presentación.

|  | <b>FIRMA</b>   | <b>FECHA</b> |
|--|--|--------------|
| Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD.<br><b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>                                    |   | 2023-03-21   |
| Dra. Janneth María Gallegos Núñez, PhD.<br><b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>    |  | 2023-03-21   |
| Dra. Magdy Mileni Echeverría Guadalupe, PhD.<br><b>ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b> |  | 2023-03-21   |

## DEDICATORIA

Este presente trabajo le dedico primeramente a Dios por ser la fortaleza y guía en mi vida. A mis padres Cecilia y Polivio quienes, con sus consejos, su apoyo incondicional, su amor, paciencia, por darme fuerzas todos los días para salir adelante y poder cumplir mis sueños. A mi hijo Gael Alejandro por convertirse en mi motivo de lucha, amor y ternura. Se lo dedico al hombre que llegó a mi vida que desde el momento que lo conocí Patricio fue un apoyo. A mi hermana Verónica por ser un ejemplo a seguir, por apoyarme y estar a mi lado incondicionalmente. A mis hermanos Diego, Jorge, Eduardo, Alex por su gran apoyo y consejos. A mi abuelita Petrona por ser una madre incondicional, por siempre darme fuerzas para salir adelante, por estar conmigo en todo momento gracias.

Finalmente, a mi compañero de tesis Pablo por ser un gran amigo y a mis amigas/os de la carrera.

Ligia

A Dios, por dame la oportunidad de estar en el lugar adecuado, y darme las fuerzas en los momentos que más necesitaba, a mis padres Pedro Pablo y Aida Amabilia, son mi pilar fundamental en mi vida, los que me enseñaron a valorar y a respetar durante todo mi trayecto estudiantil y de vida, a mi hermana Natalia por cuidarme y por estar en la buenas y en las malas, a mi mamacita Margarita por darnos su amor incomparable, por guiarnos y llevarnos por un mejor camino y enseñarnos que en esta vida todo se puede. A mi compañera de tesis Ligia, gracias por su amistad y comprensión en el corto tiempo que nos conocemos. A mis amigos/as de viaje Joselyn, Carlos, Viviana, Mayra, Carla, Yadira, Nathaly, gracias por su amistad incondicional en este largo camino de perseverancia y lucha y no puedo dejar de recordar cuantas tardes y horas de trabajo nos juntamos a lo largo de nuestra formación.

Pablo

## **AGRADECIMIENTO**

Nuestro sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por brindarnos la formación necesaria, una profesión y la oportunidad de servir a la sociedad y al país. A la Doctora María Janneth Gallegos Núñez tutora del trabajo, por su permanente asesoramiento, competencia, paciencia y apoyo durante el transcurso de la realización del Trabajo de Integración Curricular y por la buena amistad establecida.

A la Doctora Magdy Echeverría por brindarnos su apoyo y asesoría.

A la Ingeniera Maritza Yáñez técnica del laboratorio de microbiología, por su asesoramiento y recomendaciones necesarias en el Proyecto de Investigación.

Un sincero agradecimiento por su colaboración y apoyo al grupo de investigación SAGID, dirigido por el Dr. Carlos Pilamunga (Director), quienes son parte del programa de investigación.

Ligia & Pablo

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|                              |      |
|------------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS.....        | xi   |
| ÍNDICE DE ILUSTRACIONES..... | xii  |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....        | xiii |
| RESUMEN.....                 | xiv  |
| ABSTRACT.....                | xv   |
| INTRODUCCIÓN.....            | 1    |

### CAPÍTULO I

|   |   |
|---|---|
| 1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....          | 3 |
| 1.1. Planteamiento del problema.....      | 3 |
| 1.2. Formulación del problema.....        | 4 |
| 1.4. Hipótesis.....                       | 6 |
| 1.4.1. <i>Hipótesis general</i> .....     | 6 |
| 1.4.2. <i>Hipótesis específicas</i> ..... | 6 |

### CAPÍTULO II

|   |    |
|---|----|
| 2. MARCO TEÓRICO.....   | 7  |
| 2.1. Antecedentes.....  | 7  |
| 2.2. Referencias teóricas.....  | 9  |
| 2.2.1. <i>Género Botrytis</i> .....   | 9  |
| 2.2.1.1. <i>Clasificación taxonómica</i> .....  | 10 |
| 2.2.1.2. <i>Morfología de Botrytis cinerea</i> .....  | 11 |
| 2.2.2. <i>Identificación de Botrytis cinerea</i> .....  | 12 |
| 2.2.3. <i>Estrategias de control de Botrytis cinerea</i> .....                                  | 13 |
| 2.2.3.1. <i>Control químico</i> .....   | 13 |
| 2.2.3.2. <i>Control biológico</i> .....   | 13 |
| 2.2.4. <i>Factores ecológicos que influyen en el crecimiento microbiano de las fresas</i> ..... | 14 |
| 2.2.4.1. <i>Contenido de agua</i> .....   | 14 |
| 2.2.4.2. <i>pH y acidez</i> .....   | 15 |
| 2.2.5. <i>Bacterias ácido-lácticas (BAL)</i> .....  | 15 |
| 2.2.5.1. <i>Características microbiológicas de BAL</i> .....                                    | 16 |
| 2.2.5.2. <i>Pruebas de Identificación de bacterias ácido-lácticas a nivel de género</i> .....   | 17 |



|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.2.6.   | <i>Boscalid (3-piridincarboxamida)</i> .....  | 19 |
| 2.2.7.   | <i>Frutos rojos</i> .....   | 20 |
| 2.2.8.   | <i>La fresa</i> .....   | 20 |
| 2.2.8.1. | <i>Nutrientes de la fresa</i> .....   | 20 |
| 2.2.8.2. | <i>Estructura biológica de la fresa</i> .....   | 22 |
| 2.2.8.3. | <i>Factores que afectan el contenido de micronutrientes y polifenoles de la fresa</i> ..... | 24 |
| 2.2.9.   | <i>Zonas de producción de fresas en el Ecuador</i> .....                                    | 25 |
| 2.3.     | <b>Bases conceptuales</b> .....   | 26 |
| 2.3.1.   | <i>Bacterias ácido-lácticas</i> .....   | 26 |
| 2.3.1.1. | <i>Clasificación de las bacterias ácido lácticas</i> .....                                  | 27 |
| 2.3.2.   | <i>Bacterias ácido lácticas y su actividad antifúngica</i> .....                            | 28 |
| 2.3.3.   | <i>Metabolitos secundarios de las BAL con actividad antifúngica</i> .....                   | 29 |
| 2.4.     | <b>Bases legales</b> .....  | 30 |

### CAPÍTULO III

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.     | <b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....                                       | 32 |
| 3.1.   | <b>Enfoque de investigación</b> .....                                 | 32 |
| 3.1.1. | <i>Por el método de investigación</i> .....                           | 32 |
| 3.1.2. | <i>Según el objetivo</i> .....  | 32 |
| 3.1.3. | <i>Según el nivel de profundización en el objeto de estudio</i> ..... | 32 |
| 3.1.4. | <i>Según la manipulación de variables</i> .....                       | 32 |
| 3.1.5. | <i>Según el tipo de inferencia</i> .....                              | 32 |
| 3.1.6. | <i>Según el periodo temporal</i> .....                                | 33 |
| 3.1.7. | <i>Por la condición del estudio</i> .....                             | 33 |
| 3.2.   | <b>Diseño de la Investigación</b> .....                               | 33 |
| 3.2.1. | <i>Análisis Estadístico</i> .....                                     | 33 |
| 3.3.   | <b>Localización de estudio</b> .....                                  | 33 |
| 3.4.   | <b>Técnicas de recolección de datos</b> .....                         | 33 |
| 3.5.   | <b>Población de estudio</b> .....                                     | 34 |
| 3.5.1. | <i>Unidad de Análisis</i> .....                                       | 35 |
| 3.5.2. | <i>Tamaño de la muestra</i> .....                                     | 35 |
| 3.5.3. | <i>Método de muestreo</i> .....                                       | 35 |
| 3.6.   | <b>Muestreo de fresa</b> .....  | 35 |
| 3.6.1. | <i>Materiales y equipos</i> .....                                     | 35 |
| 3.6.2. | <i>Criterio para la selección del punto de muestreo</i> .....         | 35 |
| 3.6.3. | <i>Ubicación de la zona de estudio</i> .....                          | 36 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 3.6.4.    | <i>Aspectos geográficos de la zona de estudio</i> .....   | 36 |
| 3.6.5.    | <i>Preparación del muestreo</i> .....   | 36 |
| 3.6.6.    | <i>Procedimiento de toma de muestras</i> .....  | 37 |
| 3.6.7.    | <i>Análisis de campo</i> .....  | 37 |
| 3.7.      | <b>Inspección de muestras en el laboratorio</b> .....   | 37 |
| 3.8.      | <b>Revitalización del banco de aislados de las bacterias ácido-lácticas</b> .....   | 37 |
| 3.8.1.    | <i>Cultivo de las bacterias ácido-lácticas en medio MRS</i> .....   | 37 |
| 3.9.      | <b>Caracterización de las bacterias ácido-lácticas</b> .....  | 38 |
| 3.10.     | <b>Aislamiento del hongo <i>Botrytis cinerea</i> a partir de fresas infectadas</b> .....  | 38 |
| 3.10.1.   | <i>Purificación del hongo <i>Botrytis cinerea</i> en los medios PDA y MALTA</i> .....   | 38 |
| 3.10.2.   | <i>Identificación fenotípica de <i>Botrytis cinerea</i></i> .....   | 39 |
| 3.10.3.   | <i>Identificación microscópica de <i>Botrytis cinerea</i></i> .....   | 39 |
| 3.10.4.   | <i>Identificación genotípica de <i>Botrytis cinerea</i></i> .....   | 39 |
| 3.10.5.   | <i>Cinética de crecimiento del hongo</i> .....  | 39 |
| 3.10.6.   | <i>Conteo de esporas del hongo <i>Botrytis cinerea</i> en la Cámara de Neubauer</i> .....   | 40 |
| 3.11.     | <b>Ensayo de antagonismo in vitro de bacterias ácido-lácticas (BAL) frente a <i>Botrytis cinerea</i></b> .....                          | 40 |
| 3.12.     | <b>Ensayo de antagonismo in vitro de BAL mediante fermentación batch frente a <i>Botrytis cinerea</i></b> .....                         | 41 |
| 3.13.     | <b>Ensayo de antagonismo in vitro de sobrenadantes de cultivo líquido de BAL frente a <i>Botrytis cinerea</i> en cultivo dual</b> ..... | 41 |
| 3.14.     | <b>Ensayo de antagonismo in vitro de sobrenadantes de BAL frente a <i>Botrytis cinerea</i> en cultivo batch con agitación</b> .....     | 41 |
| 3.15.     | <b>Ensayo de antagonismo in vitro de boscalid (3-piridincarboxamida) frente a <i>Botrytis cinerea</i></b> .....                         | 42 |
| 3.16.     | <b>Ensayo in vivo de la bioactividad antifúngica de bacterias ácido-lácticas</b> .....  | 42 |
| 3.17.     | <b>Medición de algunos factores ecológicos intrínsecos de la fresa que influencia crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i></b> .....      | 43 |
| 3.17.1.   | <i>Humedad</i> .....  | 43 |
| 3.17.2.   | <i>pH</i> .....   | 43 |
| 3.17.3.   | <i>Estructuras biológicas</i> .....   | 43 |
| 3.17.4.   | <i>Minerales totales</i> .....  | 43 |
| 3.17.4.1. | <i>Calcio (Ca)</i> .....  | 43 |
| 3.17.4.2. | <i>Fósforo (P)</i> .....  | 44 |
| 3.17.4.3. | <i>Magnesio (Mg)</i> .....  | 44 |
| 3.17.4.4. | <i>Potasio (K)</i> .....  | 44 |
| 3.17.4.5. | <i>Sodio (Na)</i> .....   | 44 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 3.17.4.6. <i>Cobre (Cu)</i> .....     | 44 |
| 3.17.4.7. <i>Hierro (Fe)</i> .....    | 44 |
| 3.17.4.8. <i>Manganeso (Mn)</i> ..... | 44 |
| 3.17.4.9. <i>Zinc (Zn)</i> .. .....   | 45 |
| 3.17.5. <i>Azúcares totales</i> ..... | 45 |
| 3.17.6. <i>Vitamina C</i> .....       | 45 |

## CAPÍTULO IV

|   |    |
|---|----|
| <b>4. MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....   | 46 |
| 4.1. <b>Actividad antagonica de BAL frente a Botrytis cinerea</b> .....   | 46 |
| 4.1.1. <i>Revitalización de aislados de BAL provenientes de germinados de quinua</i> .....                          | 46 |
| 4.2. <b>Aislamiento de Botrytis cinerea a partir de fresas deterioradas</b> .....                                   | 48 |
| 4.2.1. <i>Identificación fenotípica</i> .....   | 49 |
| 4.3. <b>Resultados del ensayo in vitro del antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas sobre Botrytis cinerea</b> ..... | 52 |
| 4.3.1. <i>Resultados de sobrenadantes de bacterias ácido lácticas frente a Botrytis cinerea</i> .                   | 59 |
| 4.4. <b>Resultados del ensayo in vivo del antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas sobre Botrytis cinerea</b> .....  | 61 |
| 4.5. <b>Resultados de los factores ecológicos intrínsecos</b> .....   | 63 |
| 4.5.1. <i>Humedad y Ph</i> .....  | 63 |
| 4.5.2. <i>Estructura biológica</i> .....  | 63 |
| 4.5.3. <i>Minerales y Azúcares totales</i> .....  | 65 |
| 4.5.4. <i>Vitamina C</i> .....  | 66 |
| 4.6. <b>Comprobación de hipótesis</b> .....   | 66 |

## CAPÍTULO V

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| <b>5. MARCO PROPOSITIVO</b> ..... | 69 |
| 5.1. <b>Propuesta</b> .....       | 69 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <b>CONCLUSIONES</b> ..... | 70 |
|---------------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| <b>RECOMENDACIONES</b> ..... | 71 |
|------------------------------|----|

## GLOSARIO

## BIBLIOGRAFÍA

## ANEXOS

## ÍNDICE DE TABLAS

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Tabla 1-2:</b>  | Clasificación Taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i> .....   | 10 |
| <b>Tabla 2-2:</b>  | Composición de nutrientes de las fresas.....  | 21 |
| <b>Tabla 3-2:</b>  | Compuestos antifúngicos producidos por BAL frente a hongos contaminantes  | 29 |
| <b>Tabla 1-3:</b>  | Técnicas de recolección de datos del trabajo de investigación .....   | 34 |
| <b>Tabla 2-3:</b>  | Materiales y equipos para el muestreo .....   | 35 |
| <b>Tabla 1-4:</b>  | Morfología macroscópica de BAL obtenido de germinados de Quinua con respecto a cultivos estándares.....           | 46 |
| <b>Tabla 2-4:</b>  | Características morfológicas microscópicas y pruebas de identificación de la revitalización de BAL de quinua..... | 47 |
| <b>Tabla 3-4:</b>  | Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de <i>Botrytis cinerea</i> aislado de la fresa .....   | 49 |
| <b>Tabla 4-4:</b>  | Cinética de crecimiento del hongo <i>Botrytis cinerea</i> aislado de las fresas .....                             | 50 |
| <b>Tabla 5-4:</b>  | Porcentaje de inhibición de BAL de Quinua sobre <i>Botrytis cinerea</i> en medio agar Malta.....                  | 52 |
| <b>Tabla 6-4:</b>  | Porcentaje de inhibición de BAL Quinua sobre <i>Botrytis cinerea</i> medio PDA..                                  | 54 |
| <b>Tabla 7-4:</b>  | Porcentaje de inhibición de BAL de Quinua sobre <i>Botrytis cinerea</i> en medio PDA en fermentación batch .....  | 55 |
| <b>Tabla 8-4:</b>  | Porcentaje de inhibición de 3-piridincarboxamida sobre <i>Botrytis cinerea</i> .....                              | 58 |
| <b>Tabla 9-4:</b>  | Actividad antagónica de los sobrenadantes de BAL frente a <i>Botrytis cinerea</i> ..                              | 59 |
| <b>Tabla 10-4:</b> | Actividad antagónica de los sobrenadantes de BAL (con fermentación batch) sobre <i>Botrytis cinerea</i> .....     | 60 |
| <b>Tabla 11-4:</b> | Resultados del ensayo in vivo del antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas sobre <i>Botrytis cinerea</i> .....     | 61 |
| <b>Tabla 12-4:</b> | Humedad y pH de fresa intacta y fresa con <i>Botrytis cinerea</i> .....   | 63 |
| <b>Tabla 13-4:</b> | Prueba de homogeneidad de varianza .....  | 67 |
| <b>Tabla 14-4:</b> | Prueba Anova .....  | 67 |
| <b>Tabla 15-4:</b> | Análisis Tukey.....   | 67 |

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

|                          |  |    |
|--------------------------|--|----|
| <b>Ilustración 1-2:</b>  | Morfología de <i>Botrytis</i> mostrando sus conidios, a) racimos de esporas, b) un conidio germinando.....   | 11 |
| <b>Ilustración 2-2:</b>  | Etapas avanzadas de <i>Botrytis cinerea</i> en el fruto.....   | 12 |
| <b>Ilustración 3-2:</b>  | Marchitez de fresa dada por el hongo <i>Botrytis cinerea</i> .....   | 26 |
| <b>Ilustración 1-3:</b>  | Metodología del trabajo de investigación .....   | 34 |
| <b>Ilustración 2-3:</b>  | Punto de muestreo km 3 ½ vía a Guano.....  | 36 |
| <b>Ilustración 1-4:</b>  | A) Morfología macroscópica de <i>Botrytis cinerea</i> en PDA B) Morfología microscópica <i>Botrytis cinerea</i> en azul algodón de lactofenol .....        | 50 |
| <b>Ilustración 2-4:</b>  | A) Morfología macroscópica de <i>Botrytis cinerea</i> en agar Malta B) Morfología microscópica <i>Botrytis cinerea</i> en azul algodón de lactofenol ..... | 50 |
| <b>Ilustración 3-4:</b>  | Cinética de crecimiento en PDA y agar Malta de <i>Botrytis cinerea</i> .....   | 51 |
| <b>Ilustración 4-4:</b>  | Actividad antagónica de BAL de quinua sobre <i>Botrytis cinerea</i> en placas de agar malta. ....  | 57 |
| <b>Ilustración 5-4:</b>  | Actividad antagónica de BAL de quinua sobre <i>Botrytis cinerea</i> en placas de PDA.....  | 57 |
| <b>Ilustración 6-4:</b>  | Medias de los Porcentajes de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> dado por BAL en medio Malta, PDA y 3-piridincarboxamida .....                           | 58 |
| <b>Ilustración 7-4:</b>  | A) Morfología macroscópica de fresas intactas B) Morfología macroscópica de fresas con <i>Botrytis cinerea</i> .....                                       | 63 |
| <b>Ilustración 8-4:</b>  | A) Morfología microscópica de fresas intactas B) Morfología microscópica de fresas con <i>Botrytis cinerea</i> .....                                       | 64 |
| <b>Ilustración 9-4:</b>  | Porcentaje Macroelementos Fresas Intactas y Fresas con <i>Botrytis cinerea</i> ..  | 65 |
| <b>Ilustración 10-4:</b> | Contenido de Microelementos en ppm de Fresas Intactas y Fresas con <i>Botrytis cinerea</i> .....   | 65 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** MUESTREO DE LA FRESA ALBIÓN
- ANEXO B:** REVITALIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS DE QUINUA
- ANEXO C:** PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS
- ANEXO D:** PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS
- ANEXO E:** PURIFICACIÓN DEL HONGO BOTRYTIS CINEREA
- ANEXO F:** CONTEO DE ESPORAS DEL HONGO AISLADO EN CÁMARA DE NEUBAUER
- ANEXO G:** ENSAYO DE ANTAGONISMO DE LAS BAL SOBRE BOTRYTIS CINEREA
- ANEXO I:** PRODUCTO COMERCIAL, BOSCALID: 3-PIRIDINCARBOXAMIDA Y PREPARACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES
- ANEXO J:** ANTAGONISMO DE CONTROL POSITIVO, BOSCALID: 3-PIRIDINCARBOXAMIDA Y BLANCO DE BOTRYTIS CINEREA
- ANEXO K:** CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BOTRYTIS CINEREA EN PDA MEDIANTE MEDICIÓN DIARIA DE MICELIO
- ANEXO L:** CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BOTRYTIS CINEREA EN AGAR MALTA MEDIANTE MEDICIÓN DE MICELIO
- ANEXO N:** EXTRACCIÓN DE SOBRENADANTES DE BAL SOBRE BOTRYTIS CINEREA
- ANEXO O:** ANTAGONISMO DE SOBRENADANTES DE BAL SOBRE BOTRYTIS CINEREA
- ANEXO Q:** ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA
- ANEXO R:** ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA
- ANEXO S:** INFORME DEL ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA
- ANEXO T:** ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA
- ANEXO U:** ANÁLISIS MOLECULAR DE BAL Y HONGO

## RESUMEN

*Botrytis cinerea* infecta y deteriora a los cultivos de fresa en la postcosecha. Su control mediante químicos promueve el riesgo de resistencia, a la vez los consumidores demandan productos sin pesticidas. Este estudio se enfocó en la bioactividad antagónica de las bacterias ácido lácticas y 3-piridincarboxamida sobre *B. cinerea*, de fresas. Empleando la técnica de cultivo dual, se enfrentó las BAL de fermentados de quinua crecidas sobre MRS agar versus esporas de *Botrytis* en agar Malta. Se testaron BAL cultivadas a 37 °C, por 24 y 48 horas y sobrenadantes de estos cultivos, así como 3-piridincarboxamida. Se hizo un ensayo in vivo. Adicionalmente, se estudiaron los factores ecológicos que afectan a *B. cinerea*. Según los resultados, *Botrytis* fue inhibido en 45.50% por BAL cultivadas a 37° C durante 24 horas en agar Malta, en contraste las BAL en PDA inhibieron un 32.86%. Las BAL de 48 horas en agar Malta inhibieron 29.22% y en PDA 25.86%, El químico a 3000 ppm inhibió un 24.86%. Los sobrenadantes de los cultivos no inhibieron al patógeno en ningún caso. El ensayo in vivo mostró eficiencia del 63%. *Botrytis* en fresa produjo una reducción de vitamina C del 19%, la reducción de azúcares totales y minerales, el contenido de agua cambió de 87.62% fresa sana a 89.027% y el pH de 3.51 a 3.91%. Se concluye que las BAL ensayadas inhiben mejor in vitro a *Botrytis cinerea* en agar Malta a las 24 horas. El ensayo in vivo corroboró esta bioactividad.

**Palabras clave:** <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)>, <ANTAGONISMO>, <ANTIFÚNGICOS>, <*Botrytis cinerea* >, <FRESA (*Fragaria Ananassa*)>.

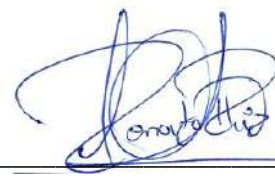
0632-DBRA-UPT-2023



## ABSTRACT

*Botrytis cinerea* infects and deteriorates strawberry crops in the post-harvest. Its control by chemicals promotes the risk of resistance, while consumers demand products without pesticides. This study focused on the antagonistic bioactivity of lactic acid and 3-pyridinecarboxamide bacteria on *B. cinerea*, from strawberries. The dual culture technique pitted BAL of fermented quinoa grown on MRS agar versus *Botrytis* spores on malt agar. LAB was cultured at 37 ° C, for 24 and 48 hours and supernatants of these cultures and 3-pyridinecarboxamide were tested. An in vivo trial was performed. Additionally, the ecological factors affecting *B. cinerea* were studied. According to the results, *Botrytis* was inhibited in 45.50% by LAB cultured at 37 ° C for 24 hours on Malta agar, in contrast, the LAB in PDA inhibited 32.86%. The 48-hour LAB in Malta agar inhibited 29.22% and in PDA 25.86% and the chemical at 3000 ppm inhibited 24.86%. The supernatants of the cultures did not inhibit the pathogen in any case. The in vivo assay showed an efficiency of 63%. *Botrytis* in strawberries produced a reduction of vitamin C of 19%, and a reduction of total sugars and minerals, the water content changed from 87.62% healthy strawberries to 89.027% and the pH from 3.51 to 3.91%. It is concluded that the LAB tested inhibits better in vitro *Botrytis cinerea* in Malta agar at 24 hours. The in vivo assay corroborated this bioactivity.

Key words: <LACTIC ACID BACTERIA (LAB) >, <ANTAGONISM>, <ANTIFUNGALS>, <*Botrytis cinerea*>, <STRAWBERRY (*Fragaria ananassa*) >.



---

Lic. Edison Renato Ruiz López

CI: 0603957044



## INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 14 % de la obtención mundial de alimentos se pierde a lo largo de toda la cadena de suministro, esto se debe a malas prácticas de cosecha, condiciones de almacenamiento y deterioro por hongos filamentosos (Dopazo, et al, 2021, pp.1-10). Se estima que las pérdidas oscilan entre el 25 y 55 % debido a la enfermedad fúngica durante la cosecha y después de esta las pérdidas llegan hasta el 89 % (Vanti et al., 2021, pp.1-10).

En los últimos años, los cultivos de fresa en el país se han visto afectados por problemas fitosanitarios que reducen su rendimiento (Cybulska et al., 2022). Uno de los agentes de deterioro es el hongo *Botrytis cinerea* o moho gris, que daña gravemente la cosecha por necrotización de pedúnculos, momificación, putrefacción y descomposición de frutos maduros e inmaduros. *Botrytis cinerea* puede actuar como parásito y epífita (Carisse et al., 2014, pp.1-11). Para superar este inconveniente, la industria alimentaria, puede optar por un enfoque preventivo combinando varios tratamientos que dependen en gran medida de los controles químicos in situ (Vanti et al., 2021, pp.1-10).

Actualmente, las infecciones por *Botrytis cinerea* con alta tasa de detección en la fresa se controlan mediante productos químicos como el Boscalid (3-piridincarboxamida), pero agente presenta desventajas como la toxicidad, desarrollo de resistencia y efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud (Qian et al, 2018., pp. 172). Por tal razón, las investigaciones se centran en buscar alternativas para controlar los hongos fitopatógenos, en este sentido, la bioconservación resulta atractiva y no representa un riesgo para los seres humanos y la naturaleza.

En la práctica, los últimos diez años, ha ganado popularidad el uso de microorganismos y sus metabolitos para evitar el deterioro de los alimentos (Merchán, et al, 2014, pp. 44-45). Tal es el caso de la selección de las cepas de *Lactobacillus* para fines de bioconservación, siendo las bacterias ácido-lácticas (BAL) las más utilizadas como agentes de biocontrol (Hatti-Kaul et al., 2018, pp- 1-20).

Las BAL están consideradas como conservantes verdes por su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos (Bangar, et al, 2022). Además, tienen la capacidad de producir antifúngicos, antimicóticos bioactivos y las bacteriocinas. Los metabolitos antifúngicos de las cepas de BAL se han explotado recientemente para inhibir el crecimiento fúngico en una variedad de fermentados y no fermentados, incluido el yogur, queso, productos a base de cereales, soja, frutas y verduras frescas. El papel de las cepas no se limita a inhibir el crecimiento de un amplio espectro de hongos, algunas cepas interactúan con las micotoxinas fúngicas, lo que provoca su inactivación o su eliminación a través de la pared celular, los metabolitos producidos por BAL, son considerados como potencial de bioconservación en alimentos (Sadiq et al., 2019, pp. 2-3).

Por tal razón, el objetivo de la investigación es evaluar la bioactividad antagónica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida para la inhibición de *Botrytis cinerea* de fresas (*Fragaria ananassa*) variedad Albión.

## CAPÍTULO I

### 1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Planteamiento del problema

Los microorganismos fitopatógenos y las condiciones de almacenamiento son la principal causa del 25-50% de las pérdidas mundiales de producción de alimentos en el período posterior a la cosecha. El impacto económico global se estima en más de \$10 mil millones anuales; En el caso de la fresa *Botrytis cinerea* se considera el patógeno poscosecha más importante (Moura et al., 2021, pp. 1-47), siendo sus efectos reducción del rendimiento, calidad, vida útil, de hecho, provoca alteraciones en la composición química del fruto.

La gravedad de la infección de *Botrytis cinerea* en la fresa se incrementa en condiciones húmedas y cerca del 80% de las flores y frutos pueden perecer si los fungicidas no se aplican en el momento adecuado. Una vez que las condiciones meteorológicas son propicias, es decir, largos periodos de alta humedad con temperaturas de 25 °C o mayor, el patógeno empieza a causar la pudrición de flores, frutos y hojas. Si continúan las condiciones desfavorables, *Botrytis cinerea* continúa esporulando y esto se convierte en la fuente de inóculo secundario (Iqbal et al., 2021, pp. 535-545). A la final resultan afectas las raíces, hojas y frutos de la fresa, por lo que, este cultivo requiere grandes cantidades de pesticidas, fungicidas y plaguicidas para una producción estable, siendo el boscalid: 3-piridincarboxamida el producto químico principal para el control de esta fruta (Esteve-Turrillas et al, 2018., pp. 2-9).

En la actualidad, el método más común para prevenir las enfermedades poscosecha en cultivos de fresa es el uso de pesticidas químicos, aunque su uso conlleva una serie de problemas, incluida la acumulación de residuos tóxicos en las frutas, la aparición de patógenos con mayor resistencia y efectos adversos en el medio ambiente y los consumidores, por lo cual, el uso de fungicidas está cada vez más restringido (Esteve-Turrillas et al., 2018, pp. 2-9).

En efecto, el químico boscalid: 3-piridincarboxamida es un potencial contaminante del suelo y agua y resulta altamente tóxico para organismos acuáticos, es por ello, que, en algunos países, como Alemania, Francia e Italia, está prohibido utilizar estos productos durante la poscosecha resultando sumamente importante un abordaje ecológico para tratar las enfermedades de las frutas después de su cosecha (Wang et al., 2021, pp 1-2).

## 1.2. Formulación del problema

¿Existe alta incidencia de *Botrytis cinerea* en el cultivo de fresas (*Fragaria ananassa*) variedad Albión que provoca su alteración química?

## 1.3. Problemas Específicos de Investigación

- ¿La bioactividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida in vitro actúan frente a *Botrytis cinerea* empleando sobrenadantes de cultivos líquidos?
- ¿Existen diferencias en la tasa de inhibición de la biomasa de *Botrytis cinerea* según la técnica de determinación del antagonismo?
- ¿Cuál es la diferencia al examinar los factores ecológicos intrínsecos (Humedad, pH, estructuras biológicas, Vitamina C, minerales, azúcares totales) de la fresa (intacta y contaminada) que influyen en el crecimiento de *Botrytis cinerea*?

## 1.4. Objetivos

### 1.4.1. Objetivo general

Evaluar la bioactividad antagonista de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida para la inhibición de *Botrytis cinerea* de fresas (*Fragaria ananassa*) variedad Albión.

### 1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar in vitro la bioactividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad 3-piridincarboxamida frente a *Botrytis cinerea* empleando sobrenadantes de cultivos líquidos.
- Valorar la tasa de inhibición de la biomasa de *Botrytis cinerea* según la técnica de determinación del antagonismo.
- Examinar los factores ecológicos intrínsecos (Humedad, pH, estructuras biológicas, Vitamina C, minerales, azúcares totales) de la fresa (intacta y contaminada) que influyen en el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

## 1.5. Justificación

La fresa (*Fragaria ananassa*) variedad albión es uno de los cultivos con mayor demanda a nivel del Ecuador por sus efectos positivos en la salud, ya que, son una fuente antocianinas, las cuales son pigmentos que ayudan a reducir el colesterol y el riesgo de sufrir hipertensión. Son muy ricas en agua, vitaminas, antioxidantes, potasio y calcio. Por lo tanto, tienen importantes propiedades hidratantes. Son ricas en vitaminas, especialmente la vitamina C (Chen et al., 2018, pp 33-46). Además, el 52.21% de la producción nacional se destina al mercado externo, por lo que la fresa es un producto exitoso en el comercio internacional. Sin embargo, es uno de los cultivos más dependientes de fungicidas y es altamente susceptible de agua y nutrientes, por lo que *Botrytis cinerea* ataca estos cultivos durante la fase de postcosecha (Iqbal et al., 2021, p. 536).

Existen varios métodos para tratamiento de la *Botrytis cinerea*, pero una estrategia segura y prometedora es la utilización de las bacterias ácido-lácticas como agentes de control biológico; a través de su actividad antagónica, microbiana, que han demostrado su eficacia contra las principales enfermedades postcosecha de la fruta, incluido el moho gris. Considerando las aplicaciones microbiológicas, las BAL han surgido como alternativas promisorias para ayudar al control de *Botrytis cinerea*, siendo favorables para la agricultura (Iqbal et al., 2021, p.540).

La acción antimicrobiana se debe a la producción de ácidos orgánicos, enzimas líticas y un crecimiento competitivo que es perjudicial para los microorganismos alterantes de alimentos. Las enzimas líticas producidas por estas bacterias pueden degradar la pared celular de los microorganismos y se ha demostrado como un mecanismo de biocontrol en la fruta, que reduce el porcentaje de fumigación con agentes químicos al cultivo, además, es auxiliar en la biopreservación de alimentos sensibles al deterioro (Wang et al., 2021, pp 2 -3).

Considerando que el control biológico resulta seguro para las personas, el medio ambiente y los cultivos, es estable y duradero a diferencia de otros métodos; el propósito de este estudio fue investigar la capacidad antagónica de las bacterias ácido-lácticas para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, con el fin de fomentar y desarrollar nuevas investigaciones enfocadas en dichos microorganismos.

El estudio se enfocó en el uso de BAL como método práctico, efectivo y ambientalmente responsable para controlar la podredumbre gris en las fresas en la fase de postcosecha. Se evaluará 30 aislados de BAL procedentes de germinados de quinua para conocer la bioactividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* aislado de fresas (*Fragaria ananassa*) variedad albión, considerando que las bacterias y sus metabolitos pueden emplearse como bioconservantes.

## **1.4. Hipótesis**

### ***1.4.1. Hipótesis general***

La bioactividad antagonista de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida actúa como inhibidor de *Botrytis cinerea* de fresas, mediante ensayo in vitro.

### ***1.4.2. Hipótesis específicas***

- La bioactividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida in vitro actúan frente a *Botrytis cinerea* empleando sobrenadantes de cultivos líquidos.
- Si existe diferencias al valorar la tasa de inhibición de la biomasa de *Botrytis cinerea* según la técnica de determinación del antagonismo
- Existe diferencia al examinar los factores ecológicos intrínsecos (Humedad, pH, estructuras biológicas, Vitamina C, minerales, azúcares totales) de la fresa (intacta y contaminada) que influyen en el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

Los cultivos de ácido láctico se conocen desde el siglo XVIII, cuando los agricultores de África, Asia y Europa notaron cómo actuaba la leche cruda durante los veranos sofocantes. En este estado, la cuajada tiene un sabor diferente y a veces agradable, por lo que los agricultores seleccionaron lo mejor para su cosecha (Cobo et al., 2019, pp. 855-870).

La producción de las bacterias del ácido-lácticas es común en diferentes ecosistemas y en las industrias de fuentes as producen alimentos fermentados, bebidas alcohólicas y levaduras con el propósito de utilizarlas en vegetales (León et al., 2006, pp.1-3).

Las BAL se pueden hallar en un conjunto de microorganismos denominados bacterias del ácido láctico, que se emplean en la industria láctea para elaborar productos como la leche fermentada, el queso, la mantequilla y otros, que se desarrollan a través de un proceso de fermentación. Lamentablemente, las fresas en crecimiento, al igual que otros árboles frutales, están sujetas al ataque de hongos que afectan sus raíces, hojas y frutos, por lo que, este cultivo requiere grandes cantidades de pesticidas, fungicidas y plaguicidas para una producción estable, siendo el boscalid: 3-piridincarboxamida el producto químico principal para el control de esta fruta (León et al., 2006, pp.1-10).

Los cultivos puros se usan para producir el cultivo original, para después procesar el cultivo tradicional, que se usa directamente en los procesos de fermentación. Estas bacterias se nutren de sustancias que pueden hidrolizar las proteínas de la leche y producir ácido láctico como su principal producto de fermentación (León et al., 2006, pp.1-10).

Las funciones de BAL en tecnología de alimentos incluyen la producción de sabor, olor, textura, la erradicación de microorganismos peligrosos, la coagulación de la leche, la reducción del contenido de lactosa. Algunos de ellos afectan a plantas resistentes a *Botrytis cinerea* cuando se están formando. Las que se fermentan de citrato BAL se fermenta con citrato para producir pequeñas cantidades de acetaldehído y diacetilo, que le dan un sabor y aroma agradables, al mismo tiempo que produce dióxido de carbono (Savadogo et al., 2006, pp. 678-683).

La evolución de estos microorganismos productores de ácido láctico y la ausencia de patógenos o saboteadores tienen un impacto beneficioso en la conservación de los alimentos, permitiendo a los fabricantes utilizar menos conservantes químicos y suavizar los tratamientos aplicados a los alimentos procesados sin comprometer su calidad o seguridad (Savadogo et al., 2006, pp. 678-683).

Desde hace más de una década las bacterias productoras de ácido láctico se han utilizado como conservantes de alimentos, aumentando la producción de compuestos antibacterianos como etanol, fenoles, benzodiazepinas y proteínas similares a bacterias (Arqués et al., 2015, pp. 1-2).

Este último se ha empleado como aglutinante biológico en alimentos desde la década de los ochenta, también las BaL puede convertirse en la flora dominante en algunos productos fermentados debido a sus efectos benéficos de conservación causados por su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos o patógenos en las materias primas (Heredia et al., 2021, pp. 340-346).

La proliferación de estos microorganismos que generan ácido láctico, la ausencia de parásitos o sustitutos contribuye a la facilidad de almacenamiento de los alimentos, disminuye la necesidad de utilizar conservantes químicos y simplifica el procesamiento de alimentos sin alterar su calidad o su integridad (Londoño et al., 2015, pp 186-187).

En los últimos 30 años, el interés por las bacterias ha crecido tanto en la ciencia como en los negocios. Numerosas investigaciones se han llevado a cabo sobre detección, producción, purificación, forma activa, propiedades bioquímicas, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidores y la aplicación exitosa de su uso en la bioconservación de alimentos (León et al., 2006, pp.7-9).

Los autores Canpolat, et al (2018, pp. 1163-1167), en su investigación, estudiaron in vitro e in vivo los efectos de diferentes cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) sobre el desarrollo de varios hongos del suelo. Las BAL se seleccionaron para determinar la actividad antifúngica usando sobrenadante libre de células contra *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Macrophomina* sp., *Botrytis* sp., *Phytophthora* sp., *Cylindrocarpon* sp. y *Pestalotiopsis* sp. El sobrenadante libre de células de los aislados de BAL mostró una actividad antifúngica prometedora. Se probaron cepas de BAL eficaces in vitro en experimentos en macetas para buscar sus efectos sobre el desarrollo de enfermedades y el crecimiento de las plantas, los efectos antifúngicos de todas las cepas de BAL probadas en experimentos in vitro exhibieron resultados prometedores, los experimentos in vivo revelaron efectos similares en diferentes géneros de hongos.



Riolo, et al (2023, pp. 1-2) identificaron 16 *Lactobacillus* aislados de aceitunas, *Lactiplantibacillus plantarum* (siete aislamientos), *Pediococcus pentosaceus* (seis aislamientos), *Enterococcus faecium* (dos aislamientos) y *Streptococcus salivarius* (un aislamiento) y testaron in vitro la actividad antifúngica de las BAL y sus fermentados libres de células contra varios hongos fitopatógenos y oomicetos incluidos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Plenodomus* y *Phytophthora*. Emplearon la superposición de cultivos y la difusión en agar, se determinó también la concentración inhibitoria mínima y la concentración fungicida mínima. Se concluyó que las BAL mostraron actividad antifúngica contra los hongos filamentosos. Los aislamientos de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* mostraron actividad inhibitoria notable contra *Fusarium oxysporum*, especies de *Colletotrichum* y *Penicillium nordicum*.

En el estudio realizado por Matute (2019, pp. 121-234), denominado Control biológico del moho gris *Botrytis cinerea* en cultivos de fresa *Fragaria vesca* L. mediante hongos filamentosos antagonistas, para el control biológico se realizó dos tratamientos con cepas de *Trichoderma harzanium* los resultados obtenidos de porcentajes de inhibición el ensayo J1 fue 72.33% y para el ensayo Y1 fue 72.67%, demostrando la efectividad de los métodos en la disminución de los daños causados por *Botrytis cinerea*, por lo tanto, recomiendan el uso del género *Trichoderma* para controlar esta enfermedad.

Por otro lado, Chen, et al (2018, pp. 33-46) estudiaron el moho gris utilizando levaduras que son potentes agentes de control biológico, en este estudio se aislaron 24 cepas de levadura que tienen la capacidad de antagonizar al hongo, además, se evaluó la actividad antifúngica de los compuestos volátiles y difusibles que se generaron a partir de los metabolitos de estas levaduras. Se examinaron los supuestos mecanismos involucrados en la capacidad de biocontrol de las cepas de levadura en relación con *B. cinerea* a través de ensayos in vitro e in vivo. Los compuestos volátiles de origen orgánico que genera *Galactomyces candidum* JYC 1146 podrían ser de utilidad para la biología de los patógenos de las plantas, por lo que se convertirían en una posible alternativa a los fungicidas químicos de impacto ecológico.

## **2.2. Referencias teóricas**

### **2.2.1. Género *Botrytis***

El género *Botrytis* es un grupo de hongos que causan enfermedades en las plantas, conocidos como fitopatógenos, morfológicamente tiene conidios agrupados en cabezas, son agentes de deterioro y descomposición, causando la enfermedad del moho gris en frutos rojos como las fresas, cerezas, moras, etc., que provoca pérdidas económicas. Son hongos filamentosos

parecidos a la seda, que crecen ampliamente en el laboratorio, pero al crecer en otros ambientes se compactan, en este caso especies que se alimentan de un solo género vegetal, por ejemplo *B. tulipae*, *B. Squamosa* y *B. fabae* son patógenos que infectan tulipanes, cebollas y frijoles, respectivamente (Meng et al., 2022, pp. 2-4).

Además, la especie de *Botrytis*, denominada *B. cinerea*, es capaz de infectar a más de 235 especies de plantas diferentes, generando una enfermedad conocida como “podredumbre gris” o “*Botrytis*”. Los huéspedes de *B. cinerea* incluyen muchas plantas de interior y de jardín, como tomates, lechugas, pimientos, alcachofas y calabazas. Una amplia gama de plantas, incluidas frutas, flores, tallos, brotes, hojas, bulbos, raíces y semillas, se ven afectadas por la podredumbre gris en estos cultivos cuando los niveles de humedad relativa son altos (Meng et al., 2022, pp. 2-4).

El hongo mata rápidamente los tejidos de las plantas y se adhiere a las plantas durante este ataque, que también afecta a los cultivos que crecen en el suelo o en invernaderos. Además, se propaga a los cultivos durante la cosecha, el transporte y el almacenamiento, siendo una infección latente en la agricultura (Filliger et al., 2016).

El micelio de *Botrytis* se compone de una colección de crecimientos filamentosos llamados hifas que se reproducen asexualmente. Es típico que no haya división nuclear, pero la división celular se detiene y no hay división citoplasmática, por lo que las hifas se forman con una amplia gama de números de núcleos (Filliger et al., 2016).

#### 2.2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Botrytis* se aprecia en la Tabla 1-2:

**Tabla 1-2:** Clasificación Taxonómica de *Botrytis cinerea*

| Clasificación taxonómica |                 |
|--------------------------|-----------------|
| Reino                    | Hongos          |
| Filo                     | Ascomycota      |
| Clase                    | Ascomiceto      |
| Orden                    | Helotiales      |
| Familia                  | Sclerotiniaceae |
| Género                   | Botryotinia     |

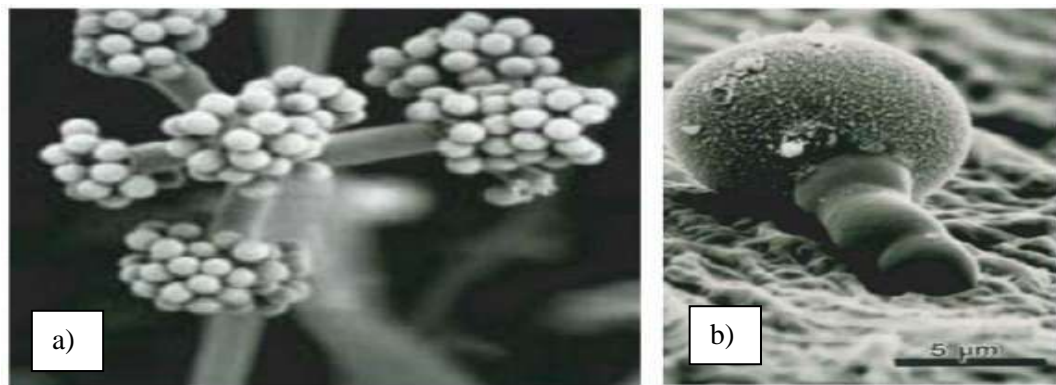
Fuente: (Romanazzi & Feliziani, 2014, pp. 133)

### 2.2.1.2. Morfología de *Botrytis cinerea*

#### **Morfología microscópica**

La identidad principal de *B. cinerea* se deriva de su espora atípica y su estructura multicelular (Ilustración 1-2). Esta es una estructura especializada que incorpora un grupo terminal de células de esporas hidrofóbicas producidas sinérgicamente, derivadas de un micelio de multi esporas bien desarrollado, que se asemeja a un racimo de uvas (Ilustración 1-2 literal a) (Romanazzi & Feliziani, 2014, pp. 132-140).

Estas hifas se originan en una capa en forma de cojín, que se forma justo debajo de la superficie del huésped. Los macroconidios son blastoconidios grandes y especializados que miden 8-14 x 6-9  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios son ovalados, secos e hidrófobos, y se producen individualmente en las ramas laterales para facilitar la dispersión. Cuando maduran, los conidios se desprenden fácilmente de las ampollas por salpicaduras de lluvia y turbulencias de aire, que también sirven para distribuirlos (Romanazzi & Feliziani, 2014, pp. 132-140).



**Ilustración 1-2:** Morfología de *Botrytis* mostrando sus conidios, a) racimos de esporas, b) un conidio germinando.

**Fuente:** (Williamson et al., 2007, p. 564).

#### **Morfología macroscópica**

Las lesiones causadas por *B. cinerea* aparecen inicialmente como manchas de color marrón claro o amarillo en los extremos del cáliz y en pocos días cubren la fruta con un moho gris (Ilustración 2-2). Este patógeno causa daños severos debido a la infección que produce en las hojas de fresa. Esta pudrición fúngica es iniciada por conidios producidos en hojas muertas de fresa. Los conidios se dispersan por el aire, el agua o la cosecha y, en última instancia, infectan diferentes partes florales, incluidos los estambres y los pétalos. Después de infectar la flor, el hongo eventualmente invade la fruta madura y causa pudrición (Vagelas et al., 2014, pp. 1-4).



**Ilustración 2-2:** Etapas avanzadas de *Botrytis cinerea* en el fruto

**Fuente:** (Koike & Bolda, 2016, pp. 2).

El desprendimiento posterior a la cosecha puede ocurrir por varias razones:

- La infección inactiva puede activarse en el desarrollo de la fruta.
- Se cosechan las frutas rojas infectadas que parecen saludables.
- Deterioro o infección de la fruta durante la cosecha.
- Contaminación con esporas y moho gris después de la cosecha.
  - La fruta sana, conservada por contacto con fruta enferma e infectada por contacto directo se denomina "anidación" (Koike & Bolda, 2016, pp. 2-5).

### ***2.2.2. Identificación de Botrytis cinerea***

*Botrytis cinerea* se identifica por sus características morfológicas. La esporulación se desarrolla en conidióforos hialinos erectos, parcialmente ramificados, de paredes delgadas, que poseen pocas paredes transversales. Estos pueden desarrollarse en masa, en tejido enfermo o medios de cultivo, o pueden surgir de esclerocios (Barbieri et al., 2020, pp. 14-25).

*Botrytis cinerea* no encierra estructura de hongos (esporocarpio). Múltiples esporas hialinas, unicelulares, ligeramente piriformes o globosas, lisas, surgen en esterigmas cortos sobre la superficie de los extremos de las ramas hinchadas (ampollas) del conidióforo. Los conidios y conidióforos aparecen en masa grisácea cuando son jóvenes, y se tornan de un marrón claro a medio al madurar (Barbieri et al., 2020, pp. 14-25).

Dependiendo de la especie y el sustrato nutritivo, los esclerocios pueden variar desde pequeños (~ 1 mm en *Botrytis tulipae*) hasta relativamente grandes (~ 20 mm) y pueden ser redondeados, ovales, elípticos o contorneados, como en *B. convoluta*. Las capas externas (corteza) son negras y están compuestas por células melanoideas, pseudoparenquimatosas y de paredes gruesas. Las células interiores (medulares) son blancas, ligeramente entrelazadas y filamentosas (Barbieri et al., 2020, pp. 14-25).

### **2.2.3. Estrategias de control de *Botrytis cinerea***

Para combatir las enfermedades provocadas por *Botrytis cinerea* se han utilizado estrategias como el control químico, los inductores de resistencia y el control biológico, debido a las importantes pérdidas económicas que provoca (Casimiro, 2022).

#### **2.2.3.1. Control químico**

Para la prevención de las enfermedades postcosecha provocadas por *Botrytis cinerea* el método principal utilizado es el uso de fungicidas sintéticos. Los fungicidas se pueden clasificar en cinco grupos: aquellos que interfieren con la respiración, el ensamblaje de microtúbulos, la regulación de la presión osmótica, la biosíntesis de esteroides y aquellos cuyos efectos pueden ser revertidos por la metionina (Hua et al., 2018, pp. 111–119).

Sin embargo, hay dos problemas principales con la aplicación de fungicidas, *Botrytis* cambia a lo largo de las generaciones porque sus conidios tienen múltiples núcleos y es común encontrar cepas resistentes a varias clases de fungicidas, por ejemplo, cuando se aplicaron por primera vez fungicidas de Bencimidazol, se observó que *Botrytis* producía cepas resistentes (Hua et al., 2018, pp. 111–119).

También se informó la resistencia a la Dicarboximida. Sin embargo, debido a que *Botrytis cinerea* requiere tasas de dosis más altas que otros patógenos fúngicos, el uso de fungicidas sintéticos es más costoso (Hua et al., 2018, pp. 111–119).

#### **2.2.3.2. Control biológico**

La utilización de agentes biológicos para controlar las enfermedades postcosecha es una tecnología potencial en lugar de los productos químicos. Las investigaciones en los últimos años han demostrado que una variedad de levaduras antagonistas puede inhibir eficazmente la descomposición postcosecha causada por *B. cinerea* en diferentes frutas (Martín, 2019, pp. 1-10).

Las levaduras antagonistas son más utilizadas por qué son más seguras que las bacterias, ya que, no se han detectado metabolitos secundarios tóxicos en sus actividades contra los patógenos. Su mecanismo de acción incluye la competencia por el espacio confinado y los nutrientes, la inducción de resistencia del huésped y la producción de enzimas líticas de la pared celular (Martín, 2019, pp. 1-10).

Sin embargo, el efecto de las levaduras antagonistas no es notable como fungicida y generalmente requieren la combinación de químicos sintéticos o sustancias exógenas para obtener un resultado satisfactorio. Según varios estudios, agregar otros ingredientes como cloruro de calcio, ácido salicílico, bicarbonato de sodio, silicio, boro y glicina-betaína puede mejorar significativamente los efectos del control biológico de enfermedades postcosecha en una variedad de frutas (Martín, 2019, pp. 1-10).

#### ***2.2.4. Factores ecológicos que influyen en el crecimiento microbiano de las fresas***

##### *2.2.4.1. Contenido de agua*

Para el crecimiento de los microorganismos en los alimentos, es importante que el agua que necesitan esté disponible, siendo uno de los métodos de conservación de alimentos la regulación del contenido de humedad. Para describir la cantidad de agua que los microorganismos necesitan de un alimento o de su entorno, los microbiólogos especializados en alimentos utilizan con frecuencia el término "actividad del agua" (Raj et al., 2022, pp 5-12).

La relación de actividad de agua se define como la relación entre la presión de vapor de agua en la matriz alimentaria y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura:

$$a_w = \frac{p}{p_o}$$

Donde:

$p$  = presión de vapor de la solución y

$p_o$  = presión de vapor del solvente (generalmente agua) (Santos et al., 2022).

Los microorganismos reaccionan de diferente manera a la  $a_w$  dependiendo de varios factores. La producción de metabolitos por parte de los microorganismos y el aumento de su población, son particularmente susceptibles a los cambios de actividad de agua. Para crecer, los microorganismos necesitan una cantidad óptima y mínima de  $a_w$  y estos niveles dependen de su entorno. Es crucial

recordar que muchos patógenos se controlan con actividad de agua superiores a 0,86 (Raj et al., 2022, pp 5-12).

#### 2.2.4.2. *pH y acidez*

El pH es un número que representa la cantidad de iones de hidrógeno (o ácidos) presentes en un medio. Los ambientes ácidos son aquellos con valores de pH menor que 7, los medios neutros son aquellos con un pH de 7 y los ambientes alcalinos son aquellos con valores de pH superiores a 7. La mayoría de los patógenos prosperan en medios con pH neutro. Los hongos pueden crecer en medios con pH entre 3 y 4, por lo que, alimentos ácidos como tomates o naranjas, son susceptibles a contaminación por hongos (Mendoza, 2018). El pH de las fresas oscila entre 3 y 3.5 (Jesus et al., 2021, pp. 755).

La fermentación y la adición de ácidos más débiles son dos técnicas que se han utilizado para aumentar la acidez de los alimentos desde el principio de los tiempos. La eficacia de un ácido orgánico como conservante aumenta cuando se reduce el pH de un alimento. Sobre la calidad de conservación de los microorganismos y la seguridad alimentaria, el tipo de ácido orgánico utilizado marca una diferencia significativa (Gordon et al., 2019, pp. 697-704).

Se conoce que ciertos grupos de microorganismos tienen un pH óptimo, mínimo y máximo para que se desarrollen en los alimentos. Al igual que con otros factores, el pH generalmente interacciona con otros elementos del alimento para inhibir el crecimiento. El pH puede ser afectado por factores como la  $a_w$ , la sal, la temperatura, el potencial redox y los conservantes, los cuales inhiben el crecimiento de patógenos y otros microorganismos. El nivel de pH de los alimentos también tiene un efecto significativo en la letalidad del tratamiento a altas temperaturas en los alimentos. Para inactivar las bacterias, es necesario una menor cantidad de calor a medida que disminuye el pH (Gordon et al., 2019, pp. 697-704).

La capacidad amortiguadora de un alimento es otra cualidad esencial a tener en cuenta cuando se utiliza la acidez como mecanismo de control. La resistencia de un alimento a los cambios de pH se denomina capacidad amortiguadora. Cuando los microorganismos que crecen dentro de los alimentos producen compuestos ácidos o alcalinos, los alimentos con poca capacidad amortiguadora reaccionarán rápidamente, cambiando el pH (Yoon et al., 2022).

#### 2.2.5. *Bacterias ácido-lácticas (BAL)*

Las BAL son bacterias no formadoras de esporas, grampositivas, extendidas, facultativamente aeróbicas. Su principal característica metabólica es la fermentación de glucosa hasta ácido láctico,

son homofermentativas, y son consideradas como microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe), pero en general son estimadas como seguras (Lui et al., 2019, pp. 1-19).

Se utilizan tradicionalmente como agentes leudantes en la producción de masas fermentados. Las BAL producen ácido láctico, cuya presencia reduce el crecimiento de patógenos, es decir, sus metabolitos secundarios son los agentes de la actividad fúngica (Lui et al., 2019, pp. 1-19).

Las BAL también son capaces de producir diversos compuestos aromáticos, cuya formación se inicia por lipólisis y proteólisis, y estos también contribuyen a las agradables características organolépticas de diferentes productos fermentados como yogur, queso y mantequilla. Por lo tanto, los BAL son microorganismos de gran importancia en el sector industrial y representan una industria multimillonaria en todo el planeta (Lui et al., 2019, pp. 1-19).

#### *2.2.5.1. Características microbiológicas de BAL*

Las bacterias que producen ácido láctico se emplean en la fermentación de alimentos o en la creación de cultivos desde hace por lo menos 4.000 años. Su uso con productos lácteos fermentados como yogur, queso, mantequilla, helado, kéfir y koumiss se ha generalizado en todo el mundo (Quintero, 2018, pp 38-46).

Las BAL es un grupo amplio de microorganismos útiles que comparten muchas características y que producen ácido láctico como subproducto principal de su fermentación. Además de ser abundantes en el medio ambiente, también están presentes en nuestro organismo. Aunque son más conocidos por su trabajo en la producción de queso, fermentación de pescados, carnes y embutidos, así como para encurtir verduras empleadas en recetas culinarias, en la producción de vinos y en el curado de frutas y verduras (Freire et al., 2021, pp. 3-5).

No obstante, no se comprende la base científica que podría explicar sus acciones, muchas personas han utilizado las bacterias ácido lácticas durante miles de años para producir alimentos modificados que pueden almacenarse por más tiempo y tienen una textura y un sabor distintivos que difieren de los alimentos originales de un producto. Estos ingeniosos socios microbianos ahora se emplean con éxito para producir una variedad de productos lácteos fermentados, ya sean líquidos, como kéfir, espesados o semisólidos, como queso o yogur (Chang et al., 2009, pp. 1-12).

Los elementos derivados de las bacterias del ácido lácticas son responsables del sabor ligeramente ácido de la leche fermentada y desarrollan un sabor u olor distintivo, por ejemplo, el acetaldehído le da al yogur su aroma característico, mientras que el diacetilo le da a la leche fermentada su



sabor a mantequilla. Las BAL también funcionan en consorcios microbianos con levaduras generando productos con aroma distintivo, por ejemplo, el alcohol y el dióxido de carbono de la levadura dan al kéfir, el kumiss y el yogur su sabor y textura característicos (Chang et al., 2009, pp. 1-12).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) se definen como una clase funcional que representa un grupo heterogéneo de bacterias de fermentación grampositivas, no patógenas y no toxigénicas caracterizadas por la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para fermentación de alimentos. También comparten otras características como aerotolerantes, no esporulantes, no reductora de nitratos y no producen pigmentos (Hatti-Kaul et al., 2018, pp. 2-18).

Las BAL pertenecen al *phylum Firmicutes* que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *enterococcus*, *Oenococcus*, *tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* son los principales miembros de las BAL, siendo *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros (Hatti-Kaul et al., 2018, pp. 2-18).

Los genomas de las BAL son de tamaño reducido, oscilan entre 1.23 Mb (*Lactobacillus sanfranciscensis*) y 4.91 Mb (*Lactobacillus parakefiri*). A partir de principios del siglo XXI, los datos genéticos de más de 200 cepas de *L. acidophilus*. El estudio de la genómica comparativa ha demostrado que las BAL poseen una gran variedad, lo que se debe a que cambian la composición genética de manera constante a causa de las numerosas interacciones con sus diferentes ambientes, lo que implica la pérdida y el reemplazo de genes (Bintsis, 2018, pp. 12-18).

Algunas BAL retienen genes transportadores para permitir que los microbios adquieran nutrientes de su entorno, que les permiten tolerar el estrés ambiental (como temperatura, pH, salinidad, etc.) e inhibir patógenos. En cuanto a su perfil de seguridad, el análisis genómico de diferentes BAL reveló la ausencia de genes que codifican toxinas y están asociados con la virulencia (Hatti-Kaul et al., 2018, pp. 2-18).

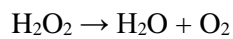
#### 2.2.5.2. Pruebas de Identificación de bacterias ácido-lácticas a nivel de género

Las pruebas clásicas de identificación de BAL a nivel de género se basan en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de estos microorganismos.

#### **Prueba de catalasa**

Para sobrevivir, los organismos deben depender de mecanismos de defensa que permitan reparar o escapar del daño oxidativo del peróxido de hidrógeno. Algunas bacterias producen la enzima catalasa que facilita la desintoxicación celular. La catalasa neutraliza el bactericida efecto bactericida del peróxido de hidrógeno y su concentración en bacterias se ha correlacionado con la patogenicidad. Las bacterias catalasa positivas poseen la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno hasta formar agua y oxígeno libre (Reiner, 2010, pp. 1-6).

Las pruebas basadas en enzimas juegan un papel crucial en la identificación de bacterias. En 1893, una publicación de Gottstein llamó la atención sobre la catalasa bacteriana, convirtiéndola en una de las primeras enzimas bacterianas descritas. Después de 30, años McLeod y Gordon desarrollaron y publicaron lo que se cree es el primer esquema de clasificación bacteriana basado en la rección de la producción de catalasa (Reiner, 2010, pp. 1-6).



### **Prueba de oxidasa**

La prueba de oxidasa detecta la presencia del sistema de citocromo oxidasa que cataliza el transporte de electrones bacteriano entre el donante y el colorante redox tetrametil-p-fenilendiamina. El tono se reduce a un morado intenso. Esta prueba se utiliza para ayudar a identificar *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Brucella* y *Pasteurella*, todas las cuales generarán citocromo oxidasa. Las BAL son citocromo oxidasa negativa (Shields & Cathcart, 2010, pp 1-8).

### **Principio de la prueba de oxidasa**

Los organismos que poseen citocromos liberan una enzima oxidasa en el interior de la célula. Esta enzima cataliza la oxidación del citocromo C, estos organismos que poseen dicho componente en su estructura como parte de la cadena de transporte de electrones son positivos en cuanto a su oxidasa y tiñen el reactivo con un color azul o púrpura. Los organismos que no poseen el citocromo C como parte de su complejo respiratorio no consumen el reactivo, lo cual deja el mismo sin color dentro del rango de la prueba (Shields & Cathcart, 2010, pp 1-8).

Las bacterias oxidasa positivas tienen citocromo oxidasa o indoxil oxidasa (un tipo de hemoglobina que contiene hierro). Ambos catalizan el transporte de electrones desde un compuesto donador (NADH) a un aceptor de electrones (generalmente oxígeno). El Reactivo de prueba es Dihidrocloruro de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina que es el aceptor artificial de electrones para oxidasas. El reactivo oxidante forma un compuesto coloreado de azul de indofenol, en caso positivo a este ensayo las BAL son oxidasas negativas (Shields & Cathcart, 2010, pp 1-8).

Los sistemas de citocromos generalmente solo están presentes en organismos aeróbicos que pueden utilizar oxígeno como el último aceptor de hidrógeno. El agua o peróxido de hidrógeno (descompuesto por catalasa) es el producto metabólico final (Shields & Cathcart, 2010, pp 1-8).

### **Tinción de Gram**

Es la tinción diferencial que más se utiliza y es prácticamente la primera prueba realizada en muestras de cualquier origen antes del estudio. Ofrece detalles fundamentales como el tipo y composición de las paredes en las que se encuentran las bacterias, además del tamaño, forma y agrupación de las células. Según la respuesta al Gram las bacterias o el dominio bacteria se divide en grampositivas y gramnegativas (Taye et al., 2021, pp. 1-6).

#### **2.2.6. Boscalid (3-piridincarboxamida)**

Boscalid [2-cloro-N-[2-(4-clorofenil) fenil] o 3-piridincarboxamida es un agroquímico, fungicida sistémico de nicotinamida desarrollado por BASF SE (Ludwigshafen, Alemania), para la protección de cultivos agrícolas y es miembro más importante del grupo de fungicidas SDHI inhibidores del succinato deshidrogenasa (Liu, et al, 2021, pp. 1-2). De esta manera, evita que los hongos patógenos presentes en la superficie de las hojas originen esporas, extiendan sus tubos germinales, crezcan micelialmente y formen micelio fértil (Esteve-Turrillas et al., 2018, pp. 2-9).

Además, Pyrimethanil y boscalid se han convertido en fungicidas muy contaminantes, con la tasa de detección más alta en fresa de invernadero, según se demuestran en pruebas de rutina. Los resultados de estudios previos han encontrado que algunos fungicidas de uso común en este cultivo pueden presentar altos riesgos dietéticos (Wang et al., 2021, pp, 127-133).

Según los informes anuales de la Unión Europea sobre residuos de pesticidas en los alimentos, boscalid fue repetidamente uno de los residuos agroquímicos más comunes y, por lo general, se encontraba entre las combinaciones más frecuentes de dos pesticidas medidos en una muestra. La presencia de este fungicida fue particularmente alta en frutas y verduras (Shabana et al., 2022, pp. 221-224).

Como resultado del estudio de seguimiento de pesticidas de la Unión Europea en el año 2013, se encontró que el 63% de las muestras de fresas contenían múltiples residuos de agroquímicos, se detectaron hasta 15 pesticidas diferentes en muestras individuales de esta fruta, siendo el compuesto más frecuente Boscalid superando los límites máximos de residuos. Resultados similares se encontraron en el Programa de datos de pesticidas de la USDA (Departamento de

Agricultura de los Estados Unidos), apareciendo Boscalid en el 17 % de las muestras analizadas (Fernández et al., 2017, pp. 327-330).

Los fungicidas SDHI se clasifican como de alto riesgo de desarrollo de resistencia. Boscalid fue la primera molécula perteneciente a los SDHIs que se introdujo para el control de *B. cinerea*. El objetivo de los fungicidas SDHI es inhibir el complejo II en la cadena respiratoria mitocondrial, que conduce finalmente al bloqueo de la producción de energía celular de *B. cinerea*. Wang, et al (2021) mencionaron que el 45,16% de los aislamientos de *B. cinerea* fueron resistentes a boscalid. De igual forma, Cosseboom, et al (2019) afirmaron que el 24% de los aislados fueron resistentes a este fungicida (Shabana et al., 2022, pp. 221-224).

### **2.2.7. Frutos rojos**

Las bayas son una fuente excelente de sustancias bioactivas y nutrientes, que incluyen vitaminas, minerales, fibra dietética y antioxidantes (Cosme, et al, 2022, pp. 1-3). Generalmente, las bayas son ricas en azúcares, pero pobres en calorías. Están formados por una pequeña cantidad de grasa, pero gran cantidad de fibra dietética, y ácidos orgánicos como el ácido cítrico, el ácido málico, el ácido tartárico, el oxálico y el fumárico (Hidalgo & Almajano, 2017, pp. 7).

Los frutos rojos se caracterizan por la alta cantidad de moléculas antioxidantes. Estos compuestos químicos son un grupo de metabolitos secundarios que evitan que la fruta se oxide debido a factores ambientales, como la luz, el aire, el oxígeno y los ataques microbianos. Los antioxidantes fenólicos interfieren con el proceso de oxidación como terminadores de radicales libres y quelantes de metales (Cosme et al., 2022, pp 2-5).

### **2.2.8. La fresa**

Las fresas (*Fragaria ananassa*) variedad Albión son apreciadas en todo el mundo por su textura jugosa, color rojo, sabor dulce y buena fuente de ácido ascórbico, minerales y compuestos antioxidantes. La susceptibilidad a las enfermedades fúngicas y la corta vida postcosecha son las características indeseables de esta fruta (Gacnik et al., 2021, pp. 2-16).

#### **2.2.8.1. Nutrientes de la fresa**

Según su información nutricional Tabla 2-2 (Giamperi et al., 2012, pp. 9), la fresa es un alimento con un contenido alto en vitaminas, en especial vitamina C, magnesio, potasio, fibra, antioxidantes de tipo polifenoles; son frutos bajos en calorías libres de sodio, grasa y colesterol. De otro lado,

debido a su capacidad para ralentizar la digestión en su contenido en fructosa, la fresa puede ayudar a controlar los niveles de azúcar en la sangre. Además, debido a que la fibra suprime el apetito, las fresas también reducen el consumo calórico (Akimov et al., 2019, p. 65).

Las fresas son fuente natural de vitamina C y folato cuyo contenido se estima en 20-25 mg/100 g de peso fresco. La ingesta de folato a través del consumo de fresas es de interés, pues 250 g de fresas contienen aproximadamente 60 miligramos de folato en promedio contenido que puede cubrir el 30% de las necesidades diarias recomendadas de folato en Europa y EE. UU (Akimov et al., 2019, p. 65).

De la misma manera, 144 g de fruta pueden aportar un alto contenido de manganeso que representa un 20% de la cantidad recomendada. Se cree que la misma cantidad de fresas es una buena fuente de yodo, magnesio, cobre, hierro y fósforo y puede suministrar alrededor del 5% de la ingesta diaria recomendada de potasio (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

**Tabla 2-2:** Composición de nutrientes de las fresas

| <b>Tipo</b>      | <b>Nutriente</b>       | <b>Por 100 g</b> |
|------------------|------------------------|------------------|
| <b>Próximo</b>   | Agua (g)               | 90.95            |
|                  | Energía (kcal)         | 32               |
|                  | Proteína (g)           | 0.67             |
|                  | Ceniza (g)             | 0.40             |
|                  | Lípidos totales (g)    | 0.30             |
|                  | Carbohidratos 8g)      | 7.68             |
|                  | Fibra dietética (g)    | 2.0              |
|                  | Azúcares (g)           | 4.89             |
|                  | Sacarosa (g)           | 0.47             |
|                  | Glucosa (g)            | 1.99             |
|                  | Fructosa(g)            | 2.44             |
| <b>Minerales</b> | Calcio (mg)            | 16               |
|                  | Hierro (mg)            | 0.41             |
|                  | Magnesio (mg)          | 13               |
|                  | Fósforo (mg)           | 24               |
|                  | Potasio (mg)           | 153              |
|                  | Sodio(mg)              | 1                |
|                  | zinc(mg)               | 0.14             |
|                  | Cobre(mg)              | 0.048            |
|                  | Manganeso (mg)         | 0.386            |
|                  | Selenio (mg)           | 0.4              |
| <b>Vitaminas</b> | Vitamina C (mg)        | 58.8             |
|                  | Tiamina (mg)           | 0.024            |
|                  | Rivoflavina (mg)       | 0.022            |
|                  | Niacina (mg)           | 0.386            |
|                  | Ácido pantoténico (mg) | 0.125            |
|                  | Vitamina B6 (mg)       | 0.047            |
|                  | Folato (µg)            | 24               |
|                  | Colina (mg)            | 5.7              |

|  |                              |      |
|--|------------------------------|------|
|  | Betaína (mg)                 | 0.2  |
|  | Vitamina B12 (µg)            | 0    |
|  | Vitamina A, RAE (µg)         | 1    |
|  | Luteína + zeaxantina (µg)    | 26   |
|  | Vitamina E, α-tocoferol (mg) | 0.29 |
|  | β-tocoferol (mg)             | 0.01 |
|  | γ-tocoferol (mg)             | 0.08 |
|  | δ-tocoferol (mg)             | 0.01 |
|  | vitamina K, filoquinona (µg) | 2.2  |

**Fuente:** (Giamperi et al., 2012, p. 10).

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

### 2.2.8.2. Estructura biológica de la fresa

#### **Fitoquímicos en la fresa**

Las fresas también contienen fitoquímicos como los terpenos, fenoles, tocoferoles y tocotrienoles que tiene actividad antioxidante. La mayoría de los fitoquímicos de la fresa están representados por compuestos fenólicos, los que cumplen funciones no esenciales en las plantas. Pero a la vez son de alta potencialidad biológica para la salud humana (Battino, 2021, pp.2-4).

La mayoría de los compuestos fenólicos son flavonoides, con un porcentaje menor principalmente de antocianinas y flavonoles. Los compuestos más pequeños son los taninos condensados (proantocianidinas), seguidos de los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos) y los taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos) (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

#### **Antocianinas**

Las antocianinas en las fresas son las más estudiadas y cuantificadas de todos los compuestos polifenólicos. Varios estudios han medido el total de antocianinas, encontrando valores de hasta 800 mg/kg de peso fresco. Más de 25 pigmentos de antocianina diferentes han sido descritos en fresas de otras variedades (Janurianti et al., 2021, p. 23).

La pelargonidina-3-glucósido es la sustancia que más cantidad de antocianinas contienen las fresas, aun cuando estén bajo la influencia de genes o condiciones ambientales, además, la presencia de cianidina-3-glucósido es constante en pequeñas cantidades. También se han encontrado otros azúcares, como los conjugados de la rutinosa, la arabinosa y la ramnosa (Janurianti et al., 2021, p. 23).

#### **Elagitaninos (ET)**

Los elagitaninos son varias combinaciones de ácido gálico y ácido hexahidroxi-difenílico con glucosa y tienen varias estructuras monoméricas, oligoméricas, y polímeros compuestos. Junto con los galotaninos, se denominan taninos hidrolizables y, tras la hidrólisis, liberan ácido elágico,

aunque se pueden producir otros metabolitos y son distintivos de los ET individuales (Palmieri et al., 2017).

Aunque los ET a menudo se han identificado como los principios activos en las plantas medicinales, el contenido y la composición de ET en los alimentos se han caracterizado solo recientemente. En un estudio de Koponen et al., alimentos comúnmente consumidos en Finlandia fueron analizados y examinados para el contenido de ET. Los compuestos de ET se detectaron solo en bayas de la familia de las rosáceas. A pesar de estas consideraciones, pocos estudios han identificado y cuantificado los compuestos elagitaninos. El ET representativo en fresas y frambuesas es sanguin H-6 (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

### **Otros compuestos fenólicos**

Las fresas también contienen pequeñas cantidades de otros compuestos fenólicos. El contenido y la composición del flavonol han sido objeto de muchos estudios, y estos compuestos se identifican como derivados de la quercetina y el kaempferol, siendo los derivados de la quercetina los más abundantes. Los flavonoles acilados como la quercetina y el kaempferol-3malonilglucósido y el kaempferol-cumaroilglucósido también se han encontrado en algunos cultivares de fresa (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

Los flavanoles son la única clase de flavonoides que no se encuentran naturalmente como glucósidos. Se encuentran en las fresas en formas monoméricas (catequinas) y poliméricas llamadas taninos condensados o procianidinas. Aunque no están ampliamente representadas, las procianidinas se encuentran comúnmente en la pulpa y los achenios de las fresas. Debido a la variedad de actividades fisiológicas, se ha informado que poseen, directa e indirectamente, propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antialérgicas y antihipertensivas e inhiben las actividades de algunas enzimas y receptores fisiológicos (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

Debido a estas características, ha aumentado considerablemente el interés por el contenido de procianidina en la fruta y por su destino metabólico después de la ingestión. Las fresas también contienen una variedad de ácidos fenólicos que se producen como derivados del ácido hidroxicinámico y ácido hidroxibenzoico (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

### **Capacidad antioxidante**

La capacidad de la fruta para combatir los radicales libres está directamente relacionada con la presencia de potentes eliminadores de radicales de oxígeno como la vitamina C y los compuestos fenólicos. Varios investigadores han publicado listas de valores de capacidad antioxidante total

(TAC) para numerosos alimentos, utilizando sus propias fuentes y métodos alimentarios (Chaves et al., 2017, pp. 293-298).

Estos resultados muestran que las bayas se ubican constantemente entre las principales fuentes de fenoles totales y TAC, que contienen 4 veces más que otras frutas, 10 veces más que las verduras y 40 veces más que los granos. En el género de las frutas, las fresas son más eficientes a la hora de combatir los radicales libres de 2 a 11 veces más que otras frutas: como los melocotones, las peras, las uvas, los tomates, las naranjas y los kiwis (Ganhao et al., 2019, pp. 4-5).

La contribución individual de los diferentes compuestos fitoquímicos en la fruta es un factor importante para determinar su TAC. En un estudio de Tulipani et al., esta contribución individual se investigó en diferentes cultivares de fresa, donde se encontró que la vitamina C es uno de los componentes más importantes responsable de más del 30 % del TAC de los extractos de fresa, seguida por las antocianinas que aportan del 25 % al 40 %; y el resto estaba compuesto principalmente por derivados de EA y flavonoles (Nowicka et al., 2020, pp. 9).

#### *2.2.8.3. Factores que afectan el contenido de micronutrientes y polifenoles de la fresa*

Los antecedentes de la cosecha, como el genotipo, el medio ambiente y la técnica de cultivo, tienen una influencia en la concentración de micronutrientes y compuestos fenólicos en las bayas, así como en los atributos de calidad y características sensoriales (Prasad et al., 2022, pp 1-3).

La calidad nutricional, el contenido de micronutrientes y fitoquímicos se ven afectados por el almacenamiento a corto plazo. La temperatura es fundamental para la conservación de los compuestos fenólicos y los antioxidantes en las frutas. La calidad nutricional en la fruta procesada se reduce en comparación con la fruta fresca, esto puede atribuirse al tiempo de procesamiento y tipo de tratamiento postcosecha, es decir, el procesamiento provocaría la pérdida de ácido ascórbico, polifenoles, capacidad antioxidante y la disminución de cierta cantidad de bioactivos (Prasad et al., 2022, pp 3-6).

El contenido fenólico y el TAC en frutas y verduras varían según numerosos factores, algunos de los cuales pueden controlarse para optimizar su calidad. La cantidad de polifenoles presentes en las fresas cambia durante su crecimiento y en función de la etapa en la que se encuentren, en general, la pulpa de las frutas verdes tiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante que la de las frutas maduras (Nowicka et al., 2020, pp. 9-21).

El perfil de antocianinas también cambia durante la madurez, pero con una tendencia opuesta. De hecho, en todos los cultivares la antocianina se acumuló en la etapa roja, coincidiendo con frutos



de color rojo, mientras que se encontraron pequeñas cantidades en frutos rosados y ninguna en frutos verdes (Nowicka et al., 2020, pp. 9-21).

La capacidad antioxidante varía durante el período de maduración con la misma tendencia de los compuestos fenólicos, según muchos estudios, el TAC de las frutas disminuye gradualmente durante la madurez y esta disminución está estrictamente asociada con una fuerte disminución de los taninos, mientras que los antioxidantes polares no fenólicos, como la vitamina C, solo aumentan ligeramente al madurar, sin afectar la tendencia decreciente (Giamperi et al., 2012, pp. 9-19).

Asimismo, la temperatura y el almacenamiento pueden afectar los perfiles de micronutrientes y compuestos fitoquímicos, además, la temperatura parece ser uno de los factores más importantes que afectan la estabilidad de los antioxidantes y fitoquímicos en las fresas durante el almacenamiento postcosecha. En particular, el contenido de flavonoides parece ser significativamente mayor en las frutas después del almacenamiento, y este resultado podría atribuirse al metabolismo fenólico de las frutas después de la cosecha (Kessel et al., 2018, pp. 134-142).

El almacenamiento afecta positivamente la capacidad antioxidante de las fresas porque las complejas reacciones que tienen lugar dentro de ellas durante el período posterior a la cosecha pueden facilitar la formación de compuestos con mayor capacidad antioxidante, incluso cuando los atributos de la fruta, como el sabor y el olor, ya se han deteriorado significativamente. En general, el TAC aumenta durante el almacenamiento, y un mayor tiempo de exposición y temperatura de almacenamiento aumentan la capacidad antioxidante (Kessel et al., 2018, pp. 134-142).

### ***2.2.9. Zonas de producción de fresas en el Ecuador***

En Ecuador, la producción de fresas se ha vuelto importante para la alimentación, lo que ha contribuido al aumento de su producción (Salazar et al, 2018: pp. 1854-1861). En el 2014 y 2018, Ecuador produjo 7.708 t de fruta en un área de 500 ha (FAOSTAT, 2017), y solo la provincia de Chimborazo tiene 136.38 ha de fresas sembradas, distribuidos en Riobamba (82.28 ha), Chambo (22.75 ha), Guano (18.86 ha), Pallatanga (11.48 ha) y Penipe (1.01 ha) (Intriago et al., 2021, pp. 520-527).

Varias enfermedades afectan la producción de fresa en Ecuador. Una de las acrecientes es la pudrición superior, afecta a las hojas, a la fruta y a las partes superiores de la planta, y puede conducir a la pérdida de hasta el 50% producción si no se controla. Los primeros síntomas de la enfermedad son márgenes de las hojas de color marrón rojizo, atrofia y marchitez Ilustración 3-

2. El tejido que se encuentra en el interior de la corona está muerto y presenta un aspecto marrón o rojizo (Intriago et al., 2021, pp. 520-527).



**Ilustración 3-2:** Marchitez de fresa dada por el hongo *Botrytis cinerea*

Fuente: (Dara, 2020).

## 2.3. Bases conceptuales

### 2.3.1. Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias del ácido láctico son grampositivas, no formadoras de esporas, no móviles, similares a los cocos y deficientes en catalasa. Son cocos y bacilos, de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de longitud y grosor, anaerobios facultativos y catalasa negativos (Parra, 2010). El uso convencional más importante de las bacterias del ácido láctico es la fermentación de alimentos con leche, carne y verduras para producir productos como yogur y queso, entre otros. Un uso alternativo de estas bacterias es el control de hongos mediante la relación de antagonismo (Viridi et al., 2021, pp.1-34).

La variedad BAL es, tal vez, la más grande y común de los grupos, ya que es capaz de crecer en una gran variedad de medios biológicos. Las especies más comunes que se emplean para retrasar el deterioro y conservar los alimentos de forma natural son las de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, que se han aislado de granos, plantas, lácteos, carnes, fermentación vegetal y el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Nasrollahzadeh et al., 2022, p. 395).

Al fermentar los carbohidratos en el medio de cultivo, estos microorganismos producen diversas sustancias con propiedades antibacterianas, en particular los ácidos acético y láctico, que reducen el valor del pH teniendo un efecto protector (Nasrollahzadeh et al., 2022, p. 395).

Asimismo, otros metabolitos de algunas BAL, como el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y los péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) producidos por bacterias fermentadoras de ácido cítrico, también pueden contribuir al manejo de la preservación de alimentos. Se cree que la potente acción oxidante del peróxido de hidrógeno, que rompe la estructura molecular fundamental de las proteínas celulares y peroxida los lípidos en las membranas celulares, es responsable de sus propiedades bactericidas (Ahlberg et al., 2015, pp. 1-53).

El acetato de diisoniolo interrumpe la función de enzimas bacterianas al inhibir o cambiar la posición del sitio catalítico. Los efectos antagónicos e inhibitorios de estas sustancias son significativos porque el hábitat de las bacterias del ácido láctico, en especial los alimentos vivos, tiene una alta tasa de humedad y son ricos en nutrientes, lo que hace que sea propenso al crecimiento bacteriano no deseado (Ramo et al., 2022).

#### 2.3.1.1. Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Las BAL se pueden clasificar de varias maneras, dependiendo de su forma, temperatura de crecimiento, según su metabolismo se conocen dos grupos de BAL en función de la ruta empleada para la fermentación de azúcares (Ayivi et al., 2020, p. 203).

Las BAL homofermentativas emplean la ruta de Embden-Meyerhof para catabolizar la glucosa y produce ácido láctico casi como producto final exclusivo, bajo condiciones estándar entre estas bacterias se encuentra *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus bagococcus* y algunas especies de *Lactobacillus* tales como: *Lactobacillus acidophilus*, *helveticus*, *delbrueckii subsp delbrueckii*, *debrueckii subsp lactis*, *delbrueckii subsp bulgaricus*, *lactis*, *thermophilus* (DE LA Cruz et al., 2022, pp. 44-46).

Las BAL heterofermentativas emplean la ruta del 6-fosfoglutonato/fosfoacetolasa para utilizar carbohidratos y esto genera una gran cantidad de otros productos finales adicionales al ácido láctico entre ellos etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. Los generos implicados son *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus* y *Weissella*. Entre los *Lactobacillus* se han identificado a *plantarum*, *ramnosus*, *coryneformis*, *curvatus*, *casei*, *paracasei*, *brevis*, *buchneri*, *fermentum*, *kéfir*, *reuteri* (Ayivi et al., 2020, p. 203).

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento:

Las BAL mesófilas crecen a temperatura ideal de incubación: 20- 25 °C, volumen de cultivo líquido 1 -2%, tiempo de incubación: 18-20 horas, acidez final 0,8% de ácido láctico. Especies involucradas: *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris*, *Lactococcus*

*lactis*, *biovariedad diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subs cremoris* (Agriopoulou et al., 2020, pp. 3-7).

Las BAL termófilas tiene como temperatura ideal de incubación: 40-45 °C, se han identificado desde un cultivo batch bajo las siguientes condiciones, volumen de cultivo líquido 2-3 %, tiempo de incubación: 2-4 horas, acidez final 0,9% de ácido láctico. Especies aisladas: *Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (Agriopoulou et al., 2020, pp. 3-7).

### **2.3.2. Bacterias ácido lácticas y su actividad antifúngica**

La actividad antifúngica es una característica interesante de las BAL debido a su potencial uso en la bioconservación de alimentos, como opción al uso extendido de conservantes químicos. Estudios recientes sobre actividad antifúngica han demostrado su capacidad para producir compuestos antifúngicos variados como, por ejemplo: ácidos orgánicos, ácido fenil láctico, compuestos proteicos, péptidos, dipéptidos cíclicos, ácidos grasos y otros; los cuales han demostrado propiedades hidrofílicas, hidrofóbicas y anfifílicas (Abouloifa et al., 2022, p. 33).

Precisamente, el efecto sinérgico entre compuestos antifúngicos de diferentes propiedades es responsable del efectivo control del deterioro y de hongos patogénicos en productos agroalimentarios. Donde, a los compuestos anfifílicos se les atribuye permitir el contacto entre el hongo (compartimento hidrofílico) y los antifúngicos que son compuestos hidrofóbicos (Abouloifa et al., 2022, p. 33).

De otro lado, Chen Cen y colaboradores, aislaron *Lactobacillus plantarum* CM-3 para evaluar su actividad antagónica contra *B. cinerea*, el estudio demostró un alto potencial para control del fitopatógeno in vitro e in vivo; los resultados in vitro demostraron que esta BAL redujo el crecimiento micelial de *B. cinerea* en PDA entre 55.27 % y 79.80 % adicionalmente la germinación de esporas fue inhibida por suspensiones de células vivas. En los ensayos in vivo, la incidencia de pudrición y diámetro de la lesión por moho gris de las fresas tratadas con *L. Plantrum* CM-3 se redujeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en comparación con la fruta control. A concentraciones de  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  UFC/mL la incidencia de *Botrytis* se redujo en un 48. 23 % y 75 % (Chen et al., 2020, pp. 1-2).

Paralelamente, *Lactobacillus Plantarum* CM-3 colonizó rápidamente las heridas con ausencia o sin ausencia de *B. cinerea* a 20 °C durante el almacenamiento. Las concentraciones del

antagonista controlaron con efectividad al patógeno in vitro e in vivo. Sin embargo, los filtrados bacterianos libres de células no protegieron contra *B. cinerea*, la bacteria es un aislado endófito lo que significa que domina los órganos de la planta y es fundamental para su defensa (Chen et al., 2020, pp. 1-2).

*L. plantarum* a más de actividad antibacteriana muestra actividad antifúngica. Algunas cepas de BAL también han sido descritas como capaces de inhibir el crecimiento de otros hongos fitopatógenos (*Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.). Rosas reporta una cepa de *Lactobacillus plantarum* con actividad antifúngica (Bravo et al., 2022, p. 1)

### 2.3.3. Metabolitos secundarios de las BAL con actividad antifúngica

Se han encontrado un gran número de compuestos que se han podido aislar a partir de BAL, debido a que presentan una fuerte actividad antifúngica, a continuación, se presenta en la Tabla 3-2:

**Tabla 3-2:** Compuestos antifúngicos producidos por BAL frente a hongos contaminantes

| Compuesto antifúngico   | MIC (mM)     | Especie fúngica   |
|-------------------------|--------------|---|
| 2,3-Butanodiona         | No reportado | <i>Monilinia fructicola</i><br><i>M. laxa</i><br><i>Penicilium Italicum</i><br><i>p. digitatum</i><br><i>P. expansum</i><br><i>Botrytis cinerea</i> ( Li, et al, 2022, pp. 1) |
| Diacetilo               | 0.005        | <i>Penicillium</i> spp.   |
| <i>Penicillium</i> spp. | 200-300      | <i>Penicillium digitatum</i> ,<br><i>Penicillium italicum</i> , y<br><i>Geotrichum candidum</i>   |
| Etanol                  | 434          | <i>Chrysonilia sitophila</i> y<br><i>Hyphopichia burtonii</i>   |
| Ciclo(L-Phe-L-Pro)      | 82           | <i>Penicillium roqueforti</i> y<br><i>Aspergillus fumigatus</i>   |
| Reuterina               | 1,0-3,3 A    | <i>Aspergillus</i> spp. y<br><i>Penicillium</i> spp.  |
| Ácido Láctico           | 274-405      | <i>Aspergillus flavus</i>   |
| Ácido Acético           | 38-41        | <i>Penicillium</i> spp.<br><i>Aspergillus</i> spp. y  |

|                          |       |  |
|--------------------------|-------|--|
|                          |       | <i>Trichoderma atroviride</i>  |
| Ácido Feniláctico        | 45-60 | <i>Penicillium roqueforti</i> y<br><i>Aspergillus fumigatus</i>  |
| Ácido propiónico         | 8,1   | <i>Aspergillus niger</i> ,<br><i>Fusarium graminearum</i> ,<br><i>Penicillium expansum</i> y<br><i>Monilia sitophila</i> |
| Ácido benzoico           | 0,8-8 | <i>Penicillium roqueforti</i> y<br><i>Aspergillus fumigatus</i>  |
| Ácido 4- hidroxibenzoico | >7,2  | <i>Penicillium roqueforti</i> y<br><i>Aspergillus fumigatus</i>  |
| Ácido ferúlico           | >0,5  | <i>Penicillium roqueforti</i> y<br><i>Aspergillus fumigatus</i>  |
| Ácido vanilínico         | >0,6  | <i>Penicillium roqueforti</i> y<br><i>Aspergillus fumigatus</i>  |

Fuente: (Minguez, 2020).

#### 2.4. Bases legales

Para el uso de plaguicidas en relación con el control de plagas de la fresa, todo uso debe estar justificado. Estas recomendaciones deben provenir de un técnico, una persona capacitada o el propio fabricante, siempre que pueda demostrar su competencia técnica. Para el cultivo de la fresa solo se pueden utilizar plaguicidas actualmente registrados en el país de acuerdo con las recomendaciones de etiquetas y folletos: dosis, tiempos de retiro, etc.; a fin de cumplir con los límites máximos de residuos establecidos (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017).

En materia de medio ambiente y protección, es necesario diagnosticar, valorar o evaluar el posible impacto ambiental de las actividades. Optimizar el uso del agua y reducir el desperdicio (por ejemplo, revisar periódicamente el estado de las tuberías y goteros, mantener los sistemas de riego para evitar fugas u obstrucciones, etc.). Se recomienda la implementación de biocamas o biobancos para minimizar el riesgo de contaminación por pesticidas (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019).

El Art. 13 de la Constitución de la República del Ecuador establece: “Las personas y las comunidades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos, preferiblemente producidos localmente y de acuerdo con su identidad y cultura”, afirmando que el estado apoyará la soberanía alimentaria (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019).

La Ley Orgánica del Sistema de Soberanía Alimentaria, en su Art. 24, establece que: Es importante alentar la nutrición adecuada y salvaguardar la salud de las personas, la seguridad alimentaria y la higiene. Junto con la prevención, erradicación o reducción de enfermedades que podrían agravarse o aparecer por comer alimentos contaminados (Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

Los agentes de control biológico, también conocidos como ACB, son descritos por el Ministerio de Agricultura y Ganadería como enemigos naturales, rivales, antagonistas u otros organismos controladores de plagas. En cuanto a la aplicación de este manual de procedimientos técnicos, son productos preparados para aplicación en campo y/o distribución con fines fitosanitarios; su composición contiene agentes microbianos, parasitoides, depredadores y nematodos entomopatógenos (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019).

Un agente de control biológico, debido al uso del término orgánico, no significa que su uso sea permisible en la producción ecológica orgánica. Si un agente de biocontrol se va a indicar como “aprobado para uso en producción bio-orgánica-ecológica”, se deben seguir los procedimientos establecidos para la evaluación de insumos orgánicos-ecológicos regularizados por la Coordinación de Inocuidad de Alimentos (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Enfoque de investigación

##### 3.1.1. *Por el método de investigación*

El proyecto de investigación se formuló como un estudio cuantitativo, porque se evaluó el efecto inhibitorio de las bacterias del ácido lácticas contra *Botrytis cinerea* in vitro, empleando cultivo y sobrenadante de cultivo.

##### 3.1.2. *Según el objetivo*

La investigación fue aplicada debido a que se emplearon todos los conocimientos adquiridos en la carrera al evaluar las bacterias ácido-lácticas in vitro para verificar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

##### 3.1.3. *Según el nivel de profundización en el objeto de estudio*

Este estudio es explicativo porque se analizó la actividad antagonista de los lactobacilos contra la inhibición de *Botrytis cinerea* a través de efecto metabolitos secundarios de BAL.

##### 3.1.4. *Según la manipulación de variables*

El estudio es de tipo experimental, debido a la modificación variables bajo condiciones controladas para demostrar que las bacterias lácticas son inhibidores del hongo *Botrytis cinerea*.

##### 3.1.5. *Según el tipo de inferencia*

Es una investigación de tipo deductivo, puesto que se permitió llegar a una conclusión específica para alcanzar el objetivo propuesto.



### **3.1.6. Según el periodo temporal**

Esta es una investigación de corte transversal, ya que se llevó a cabo durante un período de tiempo específico para cumplir con los objetivos determinados en la evaluación de bacterias ácido-lácticas para controlar el crecimiento de *Botrytis cinerea* en fresas.

### **3.1.7. Por la condición del estudio**

El estudio se llevó a cabo mediante ensayos de laboratorio, donde se examinaron las variables de estudio, tales como la densidad bacteriana, y el número de esporas del hongo, para comprobar la bioactividad antagonista de BAL frente a *Botrytis cinerea*.

## **3.2. Diseño de la Investigación**

La investigación se realizó en el estudio fue de tipo experimental, según la manera en que se controlaron y monitorearon las variables, bajo estricto rigor de las variantes externas, se tuvo en cuenta la bioactividad de las bacterias lácticas que afectan a *Botrytis cinerea* en el cultivo de fresas.

### **3.2.1. Análisis Estadístico**

Para la investigación se trabajó con un diseño experimental con tres tratamientos, dos periodos de tiempo por tratamiento, tres repeticiones, los promedios obtenidos a partir del porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo, se realizaron pruebas Anova, las evaluaciones que tuvieron homogeneidad de varianza se aplicó la prueba de rangos múltiples Tukey.

## **3.3. Localización de estudio**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de investigación y microbiología pertenecientes a Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en la Panamericana Sur km 1 1/2.

## **3.4. Técnicas de recolección de datos**

La siguiente Tabla 4-3 proporciona detalles sobre las técnicas utilizadas:

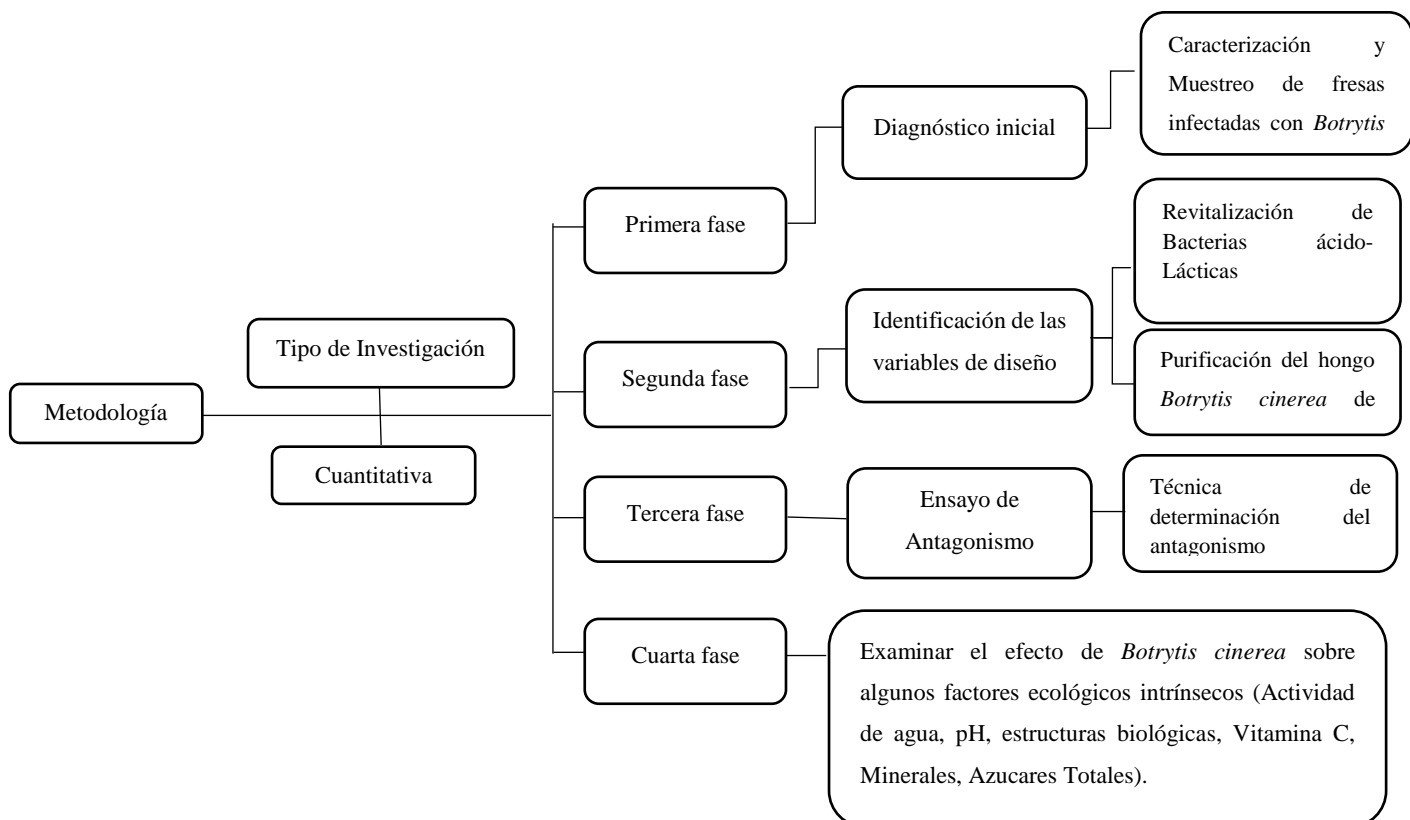
**Tabla 1-3:** Técnicas de recolección de datos del trabajo de investigación

| Técnicas de recolección de datos             | Instrumento   |
|--|---|
| Recolección de información                   | Bases de datos de producción científica, libros, artículos y revistas científicas, etc. |
| Tratamientos de datos y fuentes estadísticas | Excel 2013 (versión 15.0), programa estadístico IBM SPSS Statistics, versión 25.        |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

### 3.3. Parte Experimental

La Figura 4-3 muestra la ruta metodológica para determinar la actividad antagonica de las bacterias ácido-lácticas frente a *Botrytis cinerea* con el fin de validar la hipótesis propuesta.



**Ilustración 1-3:** Metodología del trabajo de investigación

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

### 3.5. Población de estudio

La población sujeta al estudio fueron los cultivos de fresa (*Fragaria ananassa*) variedad Albión seleccionados en la parroquia EL Rosario, Cantón Guano.

### 3.5.1. *Unidad de Análisis*

Las fresas recolectadas en cultivos por parcelas de un terreno ubicado en la parroquia Rosario del Cantón Guano fueron objeto de análisis de la investigación por estar infectadas con *Botrytis cinerea*.

### 3.5.2. *Tamaño de la muestra*

El tamaño de la muestra estuvo representado por un estimado de 500 g de muestra de frutos de fresa, recolectados de una parcela, de la parroquia El Rosario, de los que se extrajeron 30 unidades de muestra.

### 3.5.3. *Método de muestreo*

La muestra de análisis fue compuesta integrada por fresas recolectadas en distintos puntos de cada parcela. A partir de esta muestra se seleccionaron los frutos infectados por hongos presuntos *Botrytis cinerea* para obtener los cultivos puros en el laboratorio.

## 3.6. Muestreo de fresa

### 3.6.1. *Materiales y equipos*

**Tabla 2-3:** Materiales y equipos para el muestreo

| <b>Materiales</b>     | <b>Equipos/ dispositivos</b> |
|-----------------------|------------------------------|
| 5 Ziploc estéril      | GPS                          |
| 5 Envases estériles   |                              |
| Cámara fotográfica    |                              |
| Libreta de apuntes    |                              |
| Cooler de espuma Flex |                              |

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

### 3.6.2. *Criterio para la selección del punto de muestreo*

Las muestras de fresas se tomaron teniendo en cuenta los criterios de accesibilidad, representatividad y bioseguridad.

### **3.6.3. Ubicación de la zona de estudio**

Las fresas seleccionadas para el estudio según los criterios de muestreo fueron recolectadas de la parroquia El Rosario del Cantón Guano. Se establecieron tres sitios de recolección en diferentes parcelas, de cada uno de los cuales se tomaron 30 unidades de fruto, completando un estimado de 500 g.

### **3.6.4. Aspectos geográficos de la zona de estudio**

El sitio de estudio está ubicado en la Parroquia El Rosario, Cantón Guano, en el km 3½ vía Guano, en las siguientes coordenadas s 1°37'53.3"S 78°38'15.2"W. La Ilustración 2-3 muestra el área de muestreo.



**Ilustración 2-3:** Punto de muestreo km 3 ½ vía a Guano

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

### **3.6.5. Preparación del muestreo**

Previo al muestreo se procedió al rotulado de envases estériles y adecuación del porta muestras de poliuretano.

En el laboratorio se preparó todo el material de vidrio y medios de cultivo a emplearse para el experimento.

### **3.6.6. Procedimiento de toma de muestras**

Las fresas se tomaron una a una con guantes y una funda ziploc invertida antes de depositarlas en la bolsa termosellada de muestreo. Las muestras se ubicaron en la porta muestra y se trasladaron al laboratorio a la brevedad posible.

### **3.6.7. Análisis de campo**

El pH, la temperatura y la humedad especificados en el plan de muestreo se midieron "in situ" después de recolectar las muestras de fresa. Factores que se tomaron en cuenta porque influyen en el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

## **3.7. Inspección de muestras en el laboratorio**

En el laboratorio se procede a examinar cada una de las muestras respecto a integridad y etiquetado antes de aplicar el protocolo de trabajo. El cual constaba de:

Reactivación y control de los aislados de BAL, Inoculación directa del hongo en placas de PDA para examinar posteriormente el crecimiento del hongo, evidenciando por el sinema de *Botrytis cinerea*.

## **3.8. Revitalización del banco de aislados de las bacterias ácido-lácticas**

Los aislados almacenados en el laboratorio en crioviales con glicerol al 30% y a una temperatura de 20 °C se revitalizaron para viabilizar los cultivos de BAL que se emplearon en los ensayos de antagonismos frente a *Botrytis cinerea*. Los crioviales se descongelaron rápidamente y se abrieron en la cámara de flujo laminar de cada vial, se tomó 500 uL para inocular un tubo con 5 ml de caldo MRS. Se prepararon en total 30 tubos. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 y 48 horas.

### **3.8.1. Cultivo de las bacterias ácido-lácticas en medio MRS**

Con el asa de 10 uL se tomó un inóculo de cultivo de caldo MRS y se estirió la superficie de una paca con agar MRS a fin de obtener colonias aisladas. El estudio microscópico de las colonias reveló una purificación insuficiente, siendo necesario realizar un nuevo subcultivo en Agar MRS a partir de cada colonia aislada inicialmente.

### 3.9. Caracterización de las bacterias ácido-lácticas

Se seleccionaron 3 aislados de cada subcultivo y se sometieron a la tinción de Gram y ensayos de oxidasa y catalasa.

- **Tinción de Gram:** se preparó un frotis de cada colonia colocando material biológico en una placa porta objetos y suspendiendo una gota de solución salina estéril. El frotis se trató con los reactivos de gram: cristal violeta, 1 min, lavado con agua de grifo, lugol 1 min, lavado con agua, adición de solución decolorante del alcohol. Cetona 1 min o hasta decoloración completa de la placa, safranina 0,5 min, lavado final. Se dejó secar y se observó al microscópico con 100 x.
- **Prueba catalasa:** se colocó gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % y se adicionó material de una colonia, la formación de burbujas indica reacción positiva y la ausencia de burbujas indica reacción negativa.
- **Prueba oxidasa:** El material de las colonias se colocaron en tiras de papel para pruebas de oxidasa, si en 10 segundos cambia a color azul la reacción es positiva y si no hay color la reacción es negativa.

### 3.10. Aislamiento del hongo *Botrytis cinerea* a partir de fresas infectadas

Para el aislamiento directo de *Botrytis cinerea* a partir de fresas infectadas se realizó un pretratamiento de desinfección de la fruta con hipoclorito de sodio al 2%, con la finalidad de retirar impurezas y contaminantes exógenos que pudiesen afectar al cultivo y se inoculó directamente una porción del material vegetal infectado en las placas de PDA y agar Malta con sinema del hongo de interés.

#### 3.10.1. Purificación del hongo *Botrytis cinerea* en los medios PDA y MALTA

A partir de la primera inoculación de *Botrytis cinerea* en los medios selectivos e incubación a temperatura ambiente durante cinco días se obtuvieron colonias típicas del hongo, en algunos casos se encontraron hongos interferentes, por tal razón, se procedió a la purificación de colonias de *Botrytis cinerea* mediante una segunda y tercera inoculación en los medios de cultivo selectivos hasta obtener colonias aisladas de *Botrytis* sin presencia de otros hongos contaminantes. Para ello se realizó en orden secuencial las siguientes actividades:

Se realizó la rehidratación de PDA y agar Malta, según indicaciones y se procedió a colocar el medio en las placas. Consecutivamente, se inoculó el hongo en la superficie seca del medio de

cultivo en cada vértice de un triángulo imaginario y se incubaron las placas en posición normal a temperatura ambiente (18 °C – 20 °C) durante 7 días.

### **3.10.2. Identificación fenotípica de *Botrytis cinerea***

Para la identificación fenotípica se procedió al estudio de las morfologías macroscópica y microscópica. La descripción macroscópica empleó técnicas clásicas de observación de colonias que crecen en placas de PDA y agar Malta. Para este estudio se toma en cuenta el tamaño, la forma, el color en el anverso y reverso de la placa adicionalmente se tomaron fotografías (Bergey & Holt, 1994).

### **3.10.3. Identificación microscópica de *Botrytis cinerea***

Para la descripción microscópica de las estructuras fungales se empleó la técnica de montaje con cinta adhesiva, en breve, consiste en tomar un segmento de 4 cm de cinta y presionar sobre la superficie de la colonia del hongo de interés, después la cinta con las estructuras fúngicas adheridas por el reverso se coloca sobre un portaobjetos que tiene una gota de colorante de azul de algodón, esta técnica permite observar claramente las hifas y las esporas del hongo (Harris, 2000).

### **3.10.4. Identificación genotípica de *Botrytis cinerea***

La identificación del hongo se llevó a cabo en un laboratorio externo IDgen con el protocolo correspondiente extracción y amplificación del ADN, medida de la concentración y calidad del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop, se amplificó ITS (secuencia espaciadora del transcrito interno) del ADN ribosomal con cebadores específicos para el género *Botrytis* por medio del método PCR. Los productos PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, enviado a secuenciación y se realizaron alineamientos para cada secuencia analizada, y los consensos fueron comparados con otras secuencias disponibles en GenBank mediante la búsqueda BLASTn. Cuando el porcentaje de cobertura e identidad supero el 98 % se designó género y especie a las muestras. ANEXO U.

### **3.10.5. Cinética de crecimiento del hongo**

Se excavó un pozo de 6 ml de diámetro en el centro de placas con PDA y agar Malta. A partir de colonias fúngicas aisladas y purificadas se tomó cilindro de agar con crecimiento fúngico y 6 mL de diámetro y se colocó en el pozo perforado, el crecimiento del hongo se monitoreo midiendo el

diámetro de las colonias con una regla durante 7 días consecutivos se graficó la evolución del hongo del diámetro en cm frente al tiempo en horas.

### **3.10.6. *Conteo de esporas del hongo Botrytis cinerea en la Cámara de Neubauer***

Para el conteo de esporas del moho *Botrytis cinerea* se realizó el procedimiento descrito a continuación:

Se inoculó el hongo *Botrytis cinerea* puro en 5 tubos de Agar Malta inclinados, se incubó durante 10 días a temperatura ambiente (18 °C). Después de la incubación a cada tubo inclinado se adicionó 5 µL de agua de peptona al 0,1%, tween 80 al 0,1 % con una varilla estéril se frotó la superficie inclinada para desprender las esporas y formar una solución homogénea.

Se tomaron 100 µl de suspensión de esporas y se llenó la cámara de recuento, se esperó 3 min antes de iniciar el recuento. Las esporas se contaron en 4 cuadrículas de 0,1 mm<sup>3</sup> de volumen, se tomó un promedio. Se hicieron ajustes hasta obtener 1x10<sup>5</sup> esporas/mL.

### **3.11. *Ensayo de antagonismo in vitro de bacterias ácido-lácticas (BAL) frente a Botrytis cinerea***

Para determinar el antagonismo de las BAL frente al hongo *Botrytis cinerea* se realizó lo siguiente:

Se preparó cultivos de caldo MRS de cada aislado de BAL, se inoculó a 37 °C durante 24 y 48 horas. A partir de cada cultivo se tomó una azada de 10 µL y se descargó en la superficie de agar MRS diluyendo 2 líneas paralelas de 2 cm con un espacio de 2 cm entre líneas. Se inoculó a 37 °C, 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo e incubación se colocó 10 mL de agar semisólido de extracto Malta y PDA, compuesto por 9 ml del medio de cultivo semisólido y 1000 µL de esporas con una concentración de 1 x 10<sup>5</sup> esporas/mL. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a la misma temperatura durante 5 o 7 días (Magnusson, 2003).

El porcentaje de inhibición se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Área de Inhibición}}{\text{Área de la caja Petri}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$



### **3.12. Ensayo de antagonismo in vitro de BAL mediante fermentación batch frente a *Botrytis cinerea***

Se prepararon cultivos líquidos de BAL en 25 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C por 24 horas. Se transfirieron 25 mL del inóculo en 250 mL de caldo MRS. Se incubó a 30 °C y a 150 rpm durante 48 h en una incubadora con agitación orbital ESCO (Modelo: IBS-NR-25-9). Se tomaron dos azadas de 10 µL de cada cultivo, se descargó una azada a la vez en la superficie de agar MRS, trazando 2 líneas paralelas de 2 cm de longitud con un espacio de 2 cm entre cada línea, y se incubó a 37 °C durante 24 horas (30 placas) y 48 horas (30 placas). Transcurrido el tiempo de incubación se colocó 10 mL de agar semisólido PDA, compuesto por 9 mL del medio de cultivo semisólido y 1000 µL de esporas con una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a la misma temperatura durante 5 - 7 días. El antagonismo se midió como porcentaje de inhibición del hongo.

### **3.13. Ensayo de antagonismo in vitro de sobrenadantes de cultivo líquido de BAL frente a *Botrytis cinerea* en cultivo dual**

Para la extracción del sobrenadante del cultivo líquido de bacterias ácido-lácticas se inoculó BAL en 5 mL de caldo MRS, se incubó a 37 °C por 24 horas. Se transfirieron los 5 mL del inóculo bacteriano a tubos Falcón por duplicado. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 4.000 rpm a 4 °C, a continuación, los sobrenadantes se pasaron a través de filtros de membrana de 22 µm.

Para determinar el antagonismo de extractos libres de células de BAL frente al hongo *Botrytis cinerea* se realizó lo siguiente:

Se colocó 20 µL del sobrenadante de cada aislado de BAL en dos líneas paralelas de 2 cm de longitud, dejando secar por 5 minutos. Posteriormente, se preparó una suspensión stock de esporas de  $1 \times 10^5$  esporas/mL y se mezcló 1000 µL de la suspensión de esporas en 9 ml de medio semisólido agar Malta. Se adicionó una sobrecapa de 10 mL de este medio semisólido. Se dejó a temperatura ambiente durante 5 o 7 días hasta evidenciar el crecimiento micelial. Pasado el tiempo se procedió a medir la zona de inhibición fungal.

### **3.14. Ensayo de antagonismo in vitro de sobrenadantes de BAL frente a *Botrytis cinerea* en cultivo batch con agitación**

Para la extracción de sobrenadante de bacterias ácido-lácticas se inoculó BAL en 25 mL de medio MRS caldo y se incubó a 37 °C por 24 horas. Se transfirieron 25 mL de sobrenadante en 250 mL

de caldo MRS. Se incubó a 30 °C y a 150 rpm durante 48 h en una incubadora con agitación orbital ESCO (Modelo: IBS-NR-25-9). Se distribuyeron 50 mL del inóculo bacteriano en tubos Falcón por duplicado. Se centrifugó por 15 minutos a 4.000 rpm a 4 °C y posteriormente se filtró a través de filtros de membrana de 22 µm (Fuentes et al., 2017, pp.48).

Para el antagonismo de extracto libre de células de BAL frente al hongo *Botrytis cinerea* se realizó lo siguiente:

Se colocó 20 µL del sobrenadante de cada aislado de BAL en discos de papel filtro blanco de pruebas de susceptibilidad antimicrobianas, dejando secar por 5 minutos. Posteriormente, se realizó una suspensión stock de esporas de  $1 \times 10^5$  esporas/mL y se mezcló 1000 µL de solución de esporas en 9 ml de medio semisólido PDA. Se procedió a realizar el antagonismo de cultivo dual colocando sobre el cultivo de BAL en agar MRS una sobrecapa de 10 mL del medio semisólido. Se dejó a temperatura ambiente durante 5 o 7 días hasta evidenciar el crecimiento micelial. Pasado el tiempo se procedió a medir la inhibición.

### **3.15. Ensayo de antagonismo in vitro de boscalid (3-piridincarboxamida) frente a *Botrytis cinerea***

Se preparó una solución stock de 5000 ppm de boscalid (3-piridincarboxamida) y 25 mL de las concentraciones 1000, 2000, 3000, y 4000 ppm. Se prepararon placas de PDA, 10 por cada concentración y por triplicado. Se realizó la siembra de 10 µL x 2 (Líneas paralelas) de cada concentración de 3-piridincarboxamida y se dejó secar por unos 5 minutos. Consecutivamente, se adicionó a cada placa la mezcla de 9 mL de agar semisólido con 1000 uL de una suspensión stock de esporas con  $1 \times 10^5$  esporas/mL. El crecimiento fungal en las placas almacenadas a temperatura ambiente se monitoreó durante 5 o 7 días. Pasado el tiempo se procedió a medir los resultados.

### **3.16. Ensayo in vivo de la bioactividad antifúngica de bacterias ácido-lácticas**

Se recolectaron fresas de tamaño uniforme, madurez similar y sin daño o infección por hongos, se lavaron con agua estéril para retirar las impurezas y se desinfectó con hipoclorito de sodio 2 % (v/v) por 2 minutos. A continuación, se enjuagó con agua estéril y se dejó secar a temperatura ambiente. Para testar la bioactividad de cada BAL se emplearon tres fresas. En el experimento se realizó una herida en el centro de la fresa de 2 mm de ancho por 3 mm de profundidad y se colocó 40 µL del inóculo bacteriano dejando secar por 2 horas en la cámara de flujo laminar. Posteriormente, las fresas fueron inoculadas con 15 µL de una suspensión de esporas ajustadas a  $1 \times 10^5$  esporas/mL y se incubó durante 7 días a una temperatura de 30 °C y 75 % de humedad relativa en la cámara ambiental BA-AtmoCONTROL-DE-DE24041 (memmert) (Manjarres et al.,

2021, p. 1399). Adicionalmente se preparó un control positivo de inhibición inoculando las fresas con 3-piridincarboxamida tomando en cuenta la dosis efectiva indicada por el fabricante.

### **3.17. Medición de algunos factores ecológicos intrínsecos de la fresa que influencia crecimiento de *Botrytis cinerea*.**

#### **3.17.1. Humedad**

El contenido de humedad se analizó con el método termogravimétrico, utilizando una termobalanza RADWAG (Modelo: MAC 50), la técnica consistió en pesar 10 g la fresa original y 10 g la fresa contaminada con *Botrytis cinerea*, a continuación, se colaron las muestras en la bandeja del equipo, la pérdida de agua a 105 °C se estabilizó en 57 min y 1 hora con 4 min de calentamiento con luz IR.

#### **3.17.2. pH**

Para medir el pH, primero se trituraron las muestras de fresa fresca y contaminada con *Botrytis cinerea*, se midió directamente el pH de cada una de ellas utilizando un potenciómetro.

#### **3.17.3. Estructuras biológicas**

Las características estructurales de las fresas frescas y la contaminada con *Botrytis cinerea* se inspeccionaron visualmente. Se hicieron preparaciones en fresco para la observación microscópica de los tejidos intactos y contaminados.

#### **3.17.4. Minerales totales**

Las muestras precalcadas se incineraron en una mufla a 600 °C, durante 8 horas para eliminar toda la materia orgánica y obtener el material inorgánico en las cenizas que se trataron mediante hidrólisis ácida (HCl/H<sub>2</sub>O) para determinar el porcentaje de cada uno de los minerales presentes mediante espectrometría de absorción atómica con llama.

##### **3.17.4.1. Calcio (Ca)**

El calcio se determinó con el método MO-LSAIA-03.01.02. Los resultados se formularon en porcentaje de Ca de la muestra de fresa seca.

#### 3.17.4.2. *Fósforo (P)*

El fósforo se determinó por el método MO-LSAIA-03.01.04. Los resultados se formularon como porcentaje de P en el extracto de fresa.

#### 3.17.4.3. *Magnesio (Mg)*

Para la determinación de magnesio se utilizó el método MO-LSAIA-03.01.02. Los resultados se formularon en porcentaje de Mg de muestra de fresa.

#### 3.17.4.4. *Potasio (K)*

El procedimiento de análisis de potasio se realizó con el método MO-LSAIA-03.01.03. Los resultados se dedujeron como el porcentaje de K de la muestra de fresa.

#### 3.17.4.5. *Sodio (Na)*

El sodio se determinó mediante el método MO-LSAIA-03.01.03. Los resultados se enunciaron como porcentaje de Na en muestras de fresa.

#### 3.17.4.6. *Cobre (Cu)*

El cobre fue determinado mediante el método MO-LSAIA-03.02. Los resultados se enunciaron en ppm de cobre para la muestra de fresa.

#### 3.17.4.7. *Hierro (Fe)*

El hierro se examinó a través del método MO-LSAIA-03.02. Los resultados se expresan en ppm Fe para la muestra de fresa.

#### 3.17.4.8. *Manganeso (Mn)*

El manganeso fue determinado mediante el método MO-LSAIA-03.02. Los resultados se enunciaron en ppm de manganeso para la muestra de fresa.

#### 3.17.4.9. Zinc (Zn)

El zinc se determinó mediante el método MO-LSAIA-03.02. Los resultados se expresan en ppm de Zinc para la muestra de fresa.

Las determinaciones se llevaron a cabo empleando los recursos del Laboratorio de Nutrición y Calidad de INIAP Sta. Anexo T.

#### 3.17.5. Azúcares totales

El examen de azúcares totales se realizó por el método de la antrona, que consiste en: hidrolizar el polímero en medio ácido a alta temperatura. El método se fundamenta en unir la antrona a las hexosas y a las aldopentosas para dar lugar a un compuesto de color azul-verde, cuya máxima absorbancia ocurre a los 625 nm. Las proteínas que contienen triptófano dan color rojo a la muestra y pueden entorpecer la reacción. Este procedimiento es muy sensible, por lo que se requiere diluir la muestra. El método posibilita la medición de concentraciones de azúcares totales de 0 a 50 mg/L. Se lleva a cabo siguiendo el método de (Dubois, 1956, pp. 350-356).

#### 3.17.6. Vitamina C

Para calcular la cantidad de vitamina C, aplicó Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) SHIMADZU (Modelo: LC-10Aí) ejecutando el siguiente protocolo: se realizó la dilución de las muestras de fresa licuada pesando 2 g de papilla representativa y aforando a 100 mL, se filtró al vacío. Posteriormente, se filtró a través de filtros de membrana de 0.44 µm. Seguidamente, se preparó el estándar de ácido ascórbico con una concentración de 10 ppm. Por último, se colocó cada una de las muestras en viales de HPLC.

Las condiciones del equipo de cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) LC-10AI SHIMADZU fueron: la Longitud de onda 245 µm, Fase móvil ácido orto fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Temperatura 30 °C, flujo de la fase móvil 1 mL/min, Luna 5 µm, 100 Å, LC columna de tipo C18 es 250 x 4.6 mm. Posteriormente, se corrió el equipo con el estándar de vitamina C y/o cada una de las muestras de fresa.

## CAPÍTULO IV

### 4. MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente apartado recoge el análisis y la discusión de los resultados obtenidos en la investigación.

#### 4.1. Actividad antagónica de BAL frente a *Botrytis cinerea*

##### 4.1.1. Revitalización de aislados de BAL provenientes de germinados de quinua

El banco de aislados de BAL provenientes de germinados de quinua constaba de 30 crioviales que se almacenaron a una temperatura de -20 °C. Se procedió a la revitalización y monitoreo de la viabilidad y pureza de los crioviales. Teniendo como resultados que los aislados fueron viables en un 100%, por lo cual se validó su morfología macroscópica y microscópica, Tabla 6-4.

**Tabla 1-4:** Morfología macroscópica de BAL obtenido de germinados de Quinua con respecto a cultivos estándares

| Características macroscópicas de BAL en cultivos estándares (Ismail, et al, 2018, pp. 3-4) |        |                     |         |            |              |                     |            |
|--|--------|---------------------|---------|------------|--------------|---------------------|------------|
| Forma  | Color  | Borde               | Olor    | Superficie | Consistencia | Aspecto             | Halo       |
| Elevada<br>Convexa   | Blanco | Regular<br>continuo | Láctico | Lisa       | Suave        | Creoso<br>brillante | Lenticular |
| BAL aislados de cultivos de quinua   |        |                     |         |            |              |                     |            |
| Forma  | Color  | Borde               | Olor    | Superficie | Consistencia | Aspecto             | Halo       |
| Elevada<br>Convexa   | Blanco | Regular<br>continuo | Láctico | Lisa       | Suave        | Creoso<br>Brillante | Lenticular |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la Tabla 6-4 se observa los resultados de la valoración macroscópica de las colonias de BAL revitalizadas y muestras estándares de BAL de leche griseio (Ismail et al., 2018, pp. 3-4). Las BAL procedentes de germinados de quinua presentaron mínimas diferencias de tamaño, borde y superficie respecto a las cepas estándar.

Los resultados de morfología macroscópica son comparables con los trabajos de Ramírez & Vélez (2016, pp. 115-128), quienes señalan que las cepas de *Lactobacillus* produjeron colonias de 1 a 2 mm de tamaño, de color blanco cremoso, puntiagudas o en forma de disco, sin bordes claramente

definidos y con una superficie convexa. De igual manera, Bennani, et al (2017, pp, 4934), caracterizaron e identificaron un total de 280 cepas bacterias ácido-lácticas obtenidas de 30 muestras de leche cruda de vaca con propiedades generales (forma; borde; redondeado; convexo; superficie, liso; y color: blanco) de todas las cepas observaron una gran cantidad de colonias lenticulares blancas, cocos, diplococos en cadenas cortas.

**Tabla 2-4:** Características morfológicas microscópicas y pruebas de identificación de la revitalización de BAL de quinua

| Cepa    | Morfología Microscópica | Tinción Gram | Catalasa | Oxidasa |
|---------|-------------------------|--------------|----------|---------|
| QBAL 1  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 2  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 3  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 4  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 5  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 6  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 7  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 8  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 9  | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 10 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 11 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 12 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 13 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 14 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 15 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 16 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 17 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 18 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 19 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 20 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 21 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 22 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 23 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 24 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 25 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 26 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 27 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 28 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 29 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |
| QBAL 30 | Bacilos cortos          | +            | -        | -       |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

La Tabla 2-4, muestra las características microscópicas de colonias propias de BAL, un total de 30 cepas revitalizadas y purificadas. La tinción Gram se utiliza como una prueba cualitativa para verificar la pureza del cultivo y observar la morfología microscópica de las BAL de la quinua, en este caso, los bacilos que predominan son cortos. Para lograr esta pureza, se realizaron 4 purificaciones sucesivas, lo que implica que la pureza del cultivo es fundamental antes de realizar pruebas genotípicas.

Los ensayos de catalasa y oxidasa contribuyen de una manera rápida a descartar cepas analizadas, diferentes a BAL. Los resultados de este trabajo coinciden con varios estudios donde las BAL identificadas arrojan resultados negativos para catalasa, lo que significa que las BAL no producen esta enzima para transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (García, 2007, pp. 1-96).

Sin embargo, las BAL a menudo están expuestas al estrés oxidativo, que ocurre debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de las células como resultado de la reducción incompleta del oxígeno molecular a radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) y causan daños graves a todas las macromoléculas celulares. Dado que las BAL no poseen una cadena completa de transporte de electrones. No obstante, se encontró que varias cepas de BAL poseen las principales enzimas de defensa antioxidante como son las catalasas y peroxidasa NADH (Bryukhanov et al., 2022, pp. 1).

#### **4.2. Aislamiento de *Botrytis cinerea* a partir de fresas deterioradas**

El hongo *Botrytis*, proveniente de fresas contaminadas, presentó características morfológicas macroscópicas y microscópicas típicas que se aprecia en la Tabla 3-4. El inóculo se sembró en medios selectivos para hongos: agar Malta y PDA ver Ilustraciones 1-4 y 2-4. Paralelamente, se determinó la cinética de crecimiento como se aprecia en la Tabla 4-4.



#### 4.2.1. Identificación fenotípica

**Tabla 3-4:** Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de *Botrytis cinerea* aislado de la fresa

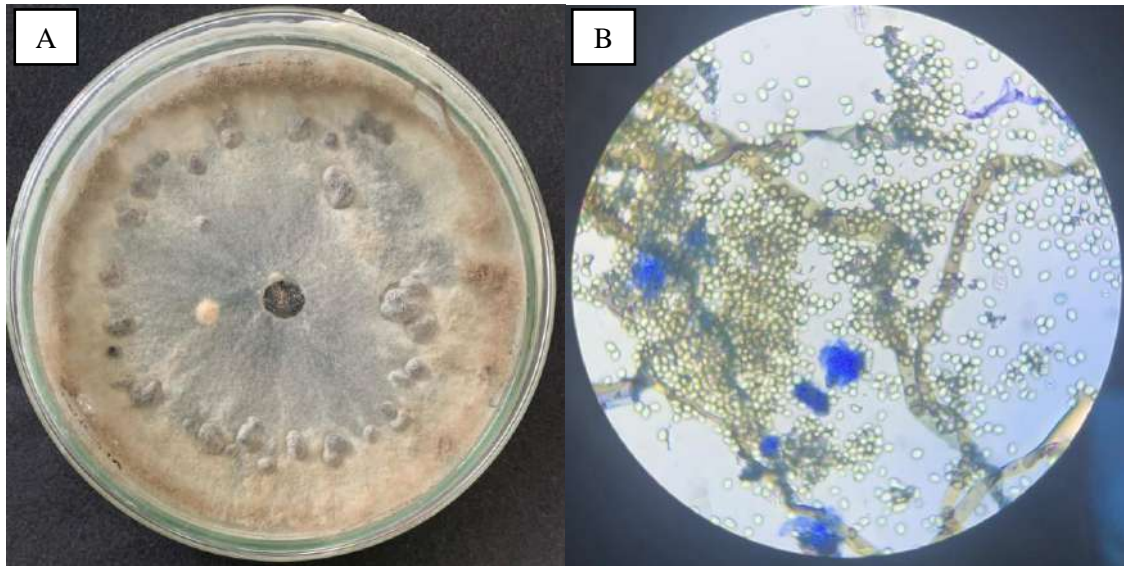
| Cepa aislada            | Características Macroscópicas   | Características Microscópicas   |
|-------------------------|---|---|
| <i>Botrytis cinerea</i> | Forma: circular<br>Tamaño: crecimiento ilimitado<br>Color: Blanco en centro y gris en la periferia<br>Superficie: densa, algodonosa, con esclerocios<br>Elevación: micelio bajo<br>Margen: entero | Conidióforos largos, hialinos, ramificados, los conidios son hialinos arbolados o colores marrón pálidos, unicelulares ovalados con células apicales redondeadas. |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

De acuerdo con la Tabla 3-4 el hongo aislado de la fresa fue del género *Botrytis cinerea*, se realizó un total de 40 aislamientos en diferentes medios PDA y MALTA, se hizo la purificación de dichos aislamientos, 10 de los cuales, es decir 5 de cada medio presentaron características morfológicas macroscópicas y microscópicas de interés, por lo cual la cepa escogida para el antagonismo fue la más representativa en base a su morfología de *Botrytis cinerea* (Ilustración 1-4).

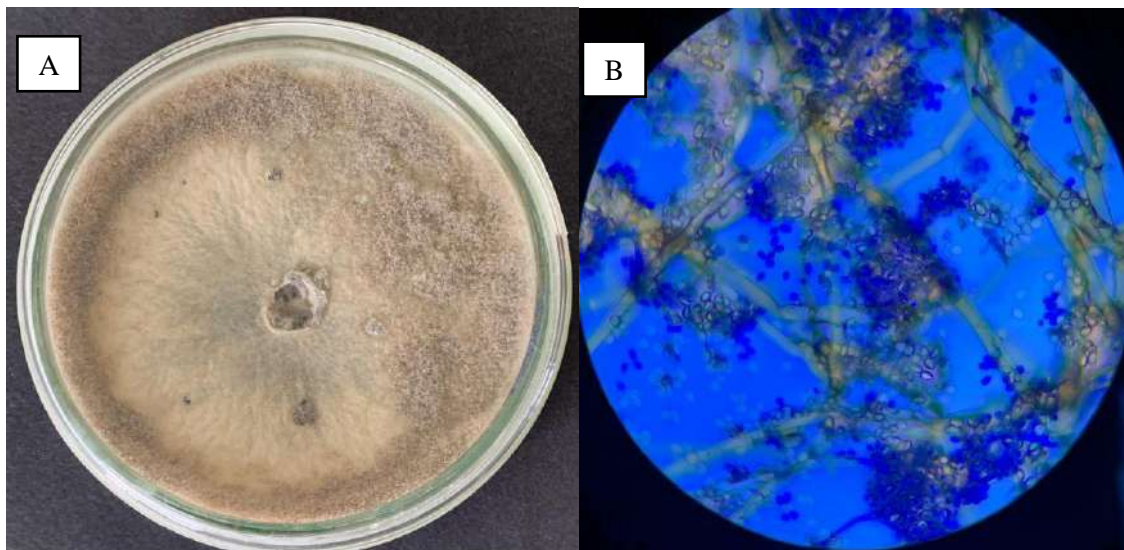
Los resultados son comparables con la investigación de Leiva, et al (2019), en la cual, todos los aislados presentaron colonias con micelio blanco, denso, piloso, que luego se tornó gris. La presencia de nódulos fúngicos en colonias de *B. cinerea* comenzó a observarse el día 21. Las hifas son septadas, transparentes e irregularmente ramificadas. La mayoría de las especies del género *Botrytis* forman micelio. Sin embargo, la abundancia depende de las condiciones de incubación, aislamiento y medio de cultivo utilizado. Tales estructuras están diseñadas para soportar condiciones ambientales adversas. Se observó que estaban presentes conidióforos macronematosos septados que no desarrollaron estructuras especializadas antes de emerger del micelio. Cada conidióforo tenía una estructura al final que se asemejaba a una ampolla, donde se desarrollaron conidios solitarios, unicelulares, lisos, globosos, con dimensiones promedio de 9-11 x 6-7  $\mu\text{m}$ .

En las Ilustraciones 1-4 y 2-4 se aprecia la morfología macroscópica y microscópica en agar PDA y agar Malta.



**Ilustración 1-4:** A) Morfología macroscópica de *Botrytis cinerea* en PDA B) Morfología microscópica *Botrytis cinerea* en azul algodón de lactofenol

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.



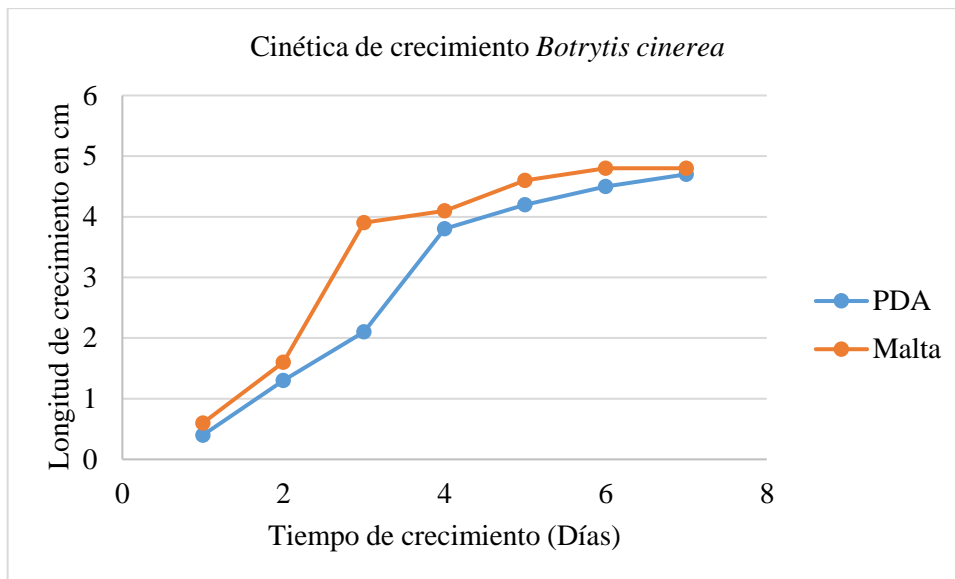
**Ilustración 2-4:** A) Morfología macroscópica de *Botrytis cinerea* en agar Malta B) Morfología microscópica *Botrytis cinerea* en azul algodón de lactofenol

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

**Tabla 4-4:** Cinética de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* aislado de las fresas

| Hongo                   | Medio | Día 1  | Día 2  | Día 3  | Día 4  | Día 5  | Día 6  | Día 7  |
|-------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Botrytis cinerea</i> | PDA   | 0,4 cm | 1,3 cm | 2,1 cm | 3,8 cm | 4,2 cm | 4,5 cm | 4,7 cm |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Malta | 0,6 cm | 1,6 cm | 3,9 cm | 4,1 cm | 4,6 cm | 4,8 cm | 4,8 cm |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.



**Ilustración 3-4:** Cinética de crecimiento en PDA y agar Malta de *Botrytis cinerea*

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la Ilustración 3-4 se observa la cinética de crecimiento del hongo gracias a la medición continua del diámetro de las colonias de *Botrytis cinerea* durante todo el período de incubación a 18 °C, el inicio del crecimiento exponencial fue evidente al segundo día, con máxima esporulación al quinto día, y también se puede decir que en el agar Malta el hongo tuvo un crecimiento y esporulación más acelerado, lo que podría servir para la posterior enumeración de esporas en el cámara de Neubauer.

Los resultados de esta prueba concuerdan con la evaluación de Boukaew, et al (2022, pp. 1), quienes sugirieron que la forma de crecimiento de los hongos filamentosos está relacionada con el aumento ordenado de componentes celulares en condiciones óptimas de desarrollo.

En esta investigación se utilizaron los medios de cultivo PDA y Malta, donde se puede evidenciar una diferencia clara de crecimiento; en medio PDA *Botrytis* presenta menor esporulación, reportando micelio escaso y se observa mayor número de esclerocios. En el medio agar Malta, el hongo se presenta como micelio aéreo algodonoso y menor número de esclerocios, es decir, que coincide con las valoraciones de Isaza, et al (2019, pp. 1- 13), en donde los esclerocios se consideran las estructuras más importantes para la supervivencia de los hongos (*Botrytis cinerea*).

Todas las especies de *Botrytis* forman esclerocios, que pueden variar en tamaño y forma según el huésped y las condiciones ambientales. La producción, tamaño y forma de los esclerocios en un sustrato natural es extremadamente fluctuante a diferencia de un medio de cultivo. Por esta razón, algunos aislados del hongo no forman esclerocios, mientras que otros los producen

abundantemente (Terrones et al., 2019, pp. 365-375). En efecto, en el presente estudio, el medio de cultivo con más nutrientes facilita la formación de esclerocios.

La morfología macroscópica y microscópica de *Botrytis* se corroboró con el examen de identidad genotípica, determinándose que pertenece al género *Botrytis* para el cual la región ITS no es muy variable y da un 100 % de identidad para cinerea y otras especies, la discriminación fue hecha bajo el análisis fenotípico.

#### 4.3. Resultados del ensayo in vitro del antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas sobre *Botrytis cinerea*

En general, el tiempo asignado para la ejecución del presente estudio, se lo dedicó al ensayo de antagonismo con cultivo dual y al conteo de esporas fungales de *Botrytis cinerea* para lograr el inóculo necesario para el cual se obtuvo en una viabilidad de  $1,52 \times 10^5$ . Además, se activaron y purificaron 30 cultivos de BAL de germinados de quinua conservados en crioviales a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lo cual fue necesario para el ensayo de antagonismo dual.

A continuación, en las Tablas 5-4, 6-4 y 7-4 se puede observar los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de las BAL de quinua cada una con 3 réplicas y en diferentes medios.

**Tabla 5-4:** Porcentaje de inhibición de BAL de Quinua sobre *Botrytis cinerea* en medio agar Malta

| Agar MALTA |  |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Aislado    | Organismo                              | 24 HORAS        |                 |                 | 48 HORAS        |                 |                 |
|            |  | % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 | % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 |
| QBAL1      | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 53.32           | 54.46           | 54.57           | 49.28           | 29.86           | 16.10           |
| QBAL2      | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 49.98           | 55.55           | 56.44           | 43.29           | 33.01           | 35.37           |
| QBAL3      | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> *  | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| QBAL4      | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 47.53           | 46.65           | 49.29           | 44.80           | 30.34           | 16.50           |
| QBAL5      | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> *  | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| QBAL6      | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 48.41           | 29.05           | 56.44           | 35.65           | 22.01           | 21.63           |
| QBAL7      | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> * | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| QBAL8      | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 53.60           | 54.15           | 55.61           | 40.87           | 25.09           | 25.68           |
| QBAL9      | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 49.86           | 45.82           | 35.21           | 44.01           | 26.41           | 28.29           |

|        |  |       |       |       |       |       |       |
|--------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| QBAL10 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 38.48 | 43.29 | 55.61 | 37.72 | 22.45 | 16.50 |
| QBAL11 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 49.23 | 51.87 | 52.62 | 39.23 | 19.71 | 23.20 |
| QBAL12 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 46.65 | 48.41 | 55.17 | 35.37 | 22.56 | 22.01 |
| QBAL13 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> * | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| QBAL14 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 57.43 | 55.77 | 57.43 | 35.37 | 22.56 | 16.03 |
| QBAL15 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> * | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| QBAL16 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 43.23 | 56.52 | 36.31 | 35.27 | 34.58 | 16.50 |
| QBAL17 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 36.07 | 33.79 | 48.32 | 38.42 | 29.71 | 20.91 |
| QBAL18 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 56.44 | 43.23 | 40.87 | 41.69 | 27.04 | 18.86 |
| QBAL19 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 49.28 | 42.44 | 23.89 | 47.30 | 30.10 | 17.60 |
| QBAL20 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 28.29 | 51.87 | 49.15 | 45.77 | 29.80 | 14.52 |
| QBAL21 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 43.23 | 46.49 | 39.85 | 28.67 | 18.61 | 18.39 |
| QBAL22 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 49.04 | 48.32 | 50.08 | 40.05 | 17.60 | 24.49 |
| QBAL23 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 42.44 | 46.49 | 46.68 | 35.44 | 29.16 | 23.11 |
| QBAL24 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 61.30 | 46.49 | 38.95 | 40.74 | 19.81 | 18.86 |
| QBAL25 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 49.98 | 29.74 | 55.61 | 33.12 | 19.77 | 15.84 |
| QBAL26 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 29.55 | 38.32 | 27.48 | 51.84 | 25.09 | 15.95 |
| QBAL27 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 12.26 | 50.93 | 26.03 | 55.45 | 35.05 | 28.29 |
| QBAL28 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> *  | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| QBAL29 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 13.20 | 55.45 | 31.06 | 52.81 | 19.77 | 29.08 |
| QBAL30 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 50.14 | 47.41 | 57.43 | 35.37 | 17.60 | 24.76 |

\*: Cultivos duales en agar Malta donde no se aprecia la bioactividad antagonista de las BAL frente a *Botrytis cinerea*

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la Tabla 5-4 se evidencian los porcentajes totales de inhibición del hongo por la bioactividad de las 30 BAL incubadas durante 24 horas a una temperatura de 37 °C, en este caso el promedio de inhibición fue de 45.5%, mientras el porcentaje promedio de inhibición fungal por efecto de las BAL incubadas durante 48 horas a la misma temperatura, fue de 29.22%.

**Tabla 6-4:** Porcentaje de inhibición de BAL de Quinoa sobre *Botrytis cinerea* en medio PDA

| PDA      |  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
|----------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Asislado | Organismo                              | 24 HORAS              |                       |                       | 48 HORAS              |                       |                       |
|          |  | %<br>Inhibición<br>R1 | %<br>Inhibición<br>R2 | %<br>Inhibición<br>R3 | %<br>Inhibición<br>R1 | %<br>Inhibición<br>R2 | %<br>Inhibición<br>R3 |
| QBAL1    | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 25.13                 | 27.71                 | 44.95                 | 33.79                 | 24.43                 | 31.83                 |
| QBAL2    | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 35.37                 | 38.48                 | 37.72                 | 29.00                 | 37.05                 | 42.44                 |
| QBAL3    | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> *  | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| QBAL4    | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 28.50                 | 33.24                 | 27.59                 | 33.89                 | 29.05                 | 32.44                 |
| QBAL5    | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> *  | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| QBAL6    | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 30.18                 | 31.83                 | 28.29                 | 16.03                 | 10.03                 | 22.01                 |
| QBAL7    | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> * | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| QBAL8    | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 36.97                 | 37.10                 | 36.31                 | 28.07                 | 26.36                 | 25.01                 |
| QBAL9    | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 23.89                 | 29.71                 | 27.59                 | 38.48                 | 19.57                 | 18.61                 |
| QBAL10   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 38.42                 | 41.50                 | 41.65                 | 27.07                 | 22.63                 | 16.50                 |
| QBAL11   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 37.49                 | 39.14                 | 36.88                 | 30.46                 | 15.70                 | 17.92                 |
| QBAL12   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 32.87                 | 35.37                 | 33.10                 | 21.46                 | 25.09                 | 22.01                 |
| QBAL13   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> * | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| QBAL14   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 35.82                 | 39.30                 | 36.78                 | 32.22                 | 13.38                 | 31.44                 |
| QBAL15   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> * | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| QBAL16   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 27.73                 | 28.29                 | 28.20                 | 30.46                 | 17.05                 | 16.50                 |
| QBAL17   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>    | 26.88                 | 26.97                 | 30.41                 | 32.54                 | 25.59                 | 26.41                 |
| QBAL18   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 25.01                 | 30.18                 | 26.41                 | 32.44                 | 23.86                 | 27.71                 |
| QBAL19   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>   | 27.71                 | 29.55                 | 28.07                 | 30.18                 | 17.64                 | 18.52                 |

|        |                                       |       |       |       |       |       |       |
|--------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| QBAL20 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>   | 29.55 | 29.71 | 30.37 | 33.01 | 17.45 | 22.01 |
| QBAL21 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>  | 35.08 | 39.92 | 35.37 | 26.96 | 19.98 | 19.25 |
| QBAL22 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>  | 34.58 | 36.07 | 35.15 | 30.04 | 21.46 | 23.26 |
| QBAL23 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>  | 25.68 | 29.55 | 26.88 | 35.46 | 20.18 | 18.86 |
| QBAL24 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>  | 42.49 | 41.65 | 42.36 | 30.29 | 32.51 | 32.51 |
| QBAL25 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>   | 28.89 | 33.24 | 33.24 | 27.48 | 24.76 | 16.50 |
| QBAL26 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>   | 33.95 | 36.94 | 37.60 | 19.77 | 35.37 | 36.78 |
| QBAL27 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>  | 28.29 | 31.03 | 34.58 | 37.60 | 19.24 | 23.51 |
| QBAL28 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> * | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| QBAL29 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>   | 27.60 | 30.18 | 31.03 | 34.47 | 31.12 | 22.56 |
| QBAL30 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>   | 29.64 | 35.43 | 35.37 | 28.20 | 26.17 | 22.01 |

\*: Cultivos duales en PDA donde no se aprecia la bioactividad antagonica de las BAL frente a *Botrytis cinerea*

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

**Tabla 7-4:** Porcentaje de inhibición de BAL de Quinoa sobre *Botrytis cinerea* en medio PDA en fermentación batch

| PDA     |                                      |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Aislado | Organismo                            | 24 HORAS        |                 |                 | 48 HORAS        |                 |                 |
|         |                                      | % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 | % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 |
| QBAL3   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | 33.98           | 38.51           | 39.15           | 34.71           | 22.30           | 27.07           |
| QBAL5   | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | 26.41           | 32.22           | 29.74           | 36.20           | 27.07           | 31.44           |
| QBAL7   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | 30.41           | 38.51           | 36.15           | 28.81           | 26.41           | 31.83           |
| QBAL13  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | 34.71           | 33.01           | 36.94           | 32.44           | 21.46           | 16.98           |
| QBAL15  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | 30.65           | 28.92           | 30.81           | 37.68           | 32.54           | 29.00           |
| QBAL28  | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | 33.51           | 35.37           | 34.99           | 30.41           | 29.00           | 31.83           |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

La Tabla 6-4 indica los resultados de la inhibición del hongo en medio PDA por los 30 aislados de BAL y sus tres réplicas, a las 24 horas se obtuvo un promedio de inhibición igual al 32.86 % y a las 48 horas fue de 25.86 %. Evidenciándose que hay diferencias en la inhibición relacionadas con el tiempo de incubación de las BAL en los dos medios de cultivo.

De acuerdo con la investigación de Bernal, et al (2019, pp. 5), se sabe que *Botrytis cinerea* es el primer causante del deterioro de muchos productos agrícolas en postcosecha, el subproducto de este moho gris es muy perjudicial para el consumo del ser humano.

El control y la prevención del hongo se puede dar por la actividad de los metabolitos secundarios de las BAL tales como: ácido láctico, lactoperoxidasa, ácido fórmico, ácido acético, ácido caproico y ácido feniláctico (PLA), ácidos orgánicos, dióxido de carbono, ácidos grasos hidroxilados, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, reuterina, dipéptidos cíclicos, los compuestos proteicos, la acetoína y los compuestos volátiles como el diacetilo o la 2,3, butanodiona (Nasrollahzadeh et al., 2022, p. 395).

La actividad antifúngal de las BAL se explicaría por los ácidos orgánicos láctico, acético y propiónico que en su forma protonada o no dissociada son lipofílicos y difunden a través de la membrana celular y el citoplasma inhibiendo el crecimiento del micelio; se conoce que el ácido láctico tiene menor actividad inhibitoria en relación con el ácido acético y propiónico. El ácido láctico por su  $pK_a$  más bajo desprotona más fácilmente que los otros ácidos. De otro lado, se ha reportado una concentración inhibitoria mínima (MIC) más baja contra el crecimiento fungal del ácido acético y propionico comparados con el ácido láctico (Sadiq et al., 2019, p. 3).

A través de este experimento, se demostró que 24/30 BAL provenientes de los fermentados de quinua germinada y sus metabolitos tienen el efecto de anular el crecimiento miceliar de *Botrytis*, las Ilustraciones 4-4 y 5-4 demuestran este resultado.

Cabe mencionar que 6 de 30 aislados tanto en PDA como en Agar Malta dieron negativa la prueba de bioactividad cuando dichos aislados almacenados en criocongelación se revitalizaron en 5 mL de caldo MRS. Sin embargo, la actividad antagonica se observó al utilizar tanto células en suspensión como sobrenadantes de cultivos batch agitados con un volumen efectivo de trabajo de 250 mL, incubados a 150 rpm a 30 °C, durante 48 horas. Estos cultivos mostraron actividad antifúngica, los resultados se muestran en la tabla 7-4.

Una mayor bioactividad antagonica con los cultivos discontinuos agitados coincide con los estudios de Wang, et al (2020, pp. 7-8) donde se indica que el crecimiento celular depende de la temperatura por ser uno de los factores que afecta la actividad enzimática relacionada con el



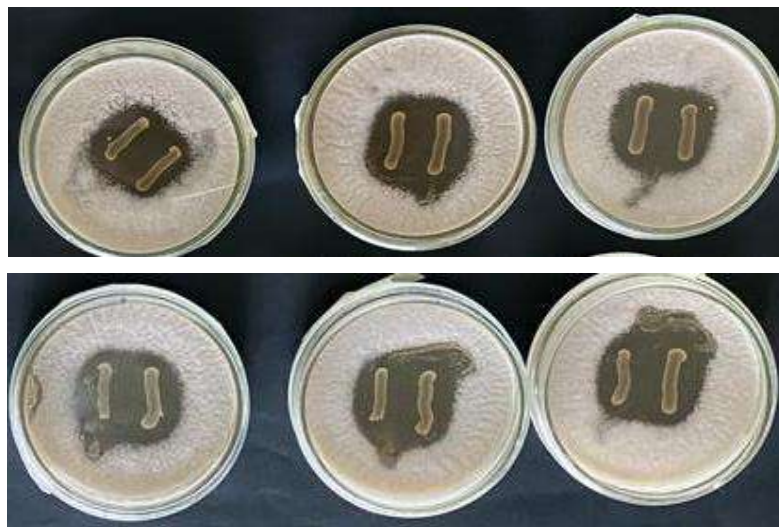
metabolismo celular y el control del crecimiento. Adicionalmente, se sugiere que a un pH 5 la actividad enzimática será mayor debido a la mejor resistencia a los ácidos de las BAL como *L. pentosus*. En cuanto a la velocidad de agitación, este parámetro contribuye a la oxidación de NADH de la cadena respiratoria que a su vez tiene impacto en la formación de biomasa y en el metabolismo celular durante la fermentación.



**Ilustración 4-4:** Actividad antagonista de BAL de quinua sobre *Botrytis cinerea* en placas de agar malta.

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

De acuerdo a Chen Cen (2020, pp. 1) y colaboradores, el crecimiento micelial de *B. cinerea* en PDA fue inhibido entre 55.27 % y 79.80 % a diferencia de lo encontrado en el presente estudio 32.86 % y 25.86%.



**Ilustración 5-4:** Actividad antagonista de BAL de quinua sobre *Botrytis cinerea* en placas de PDA.

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

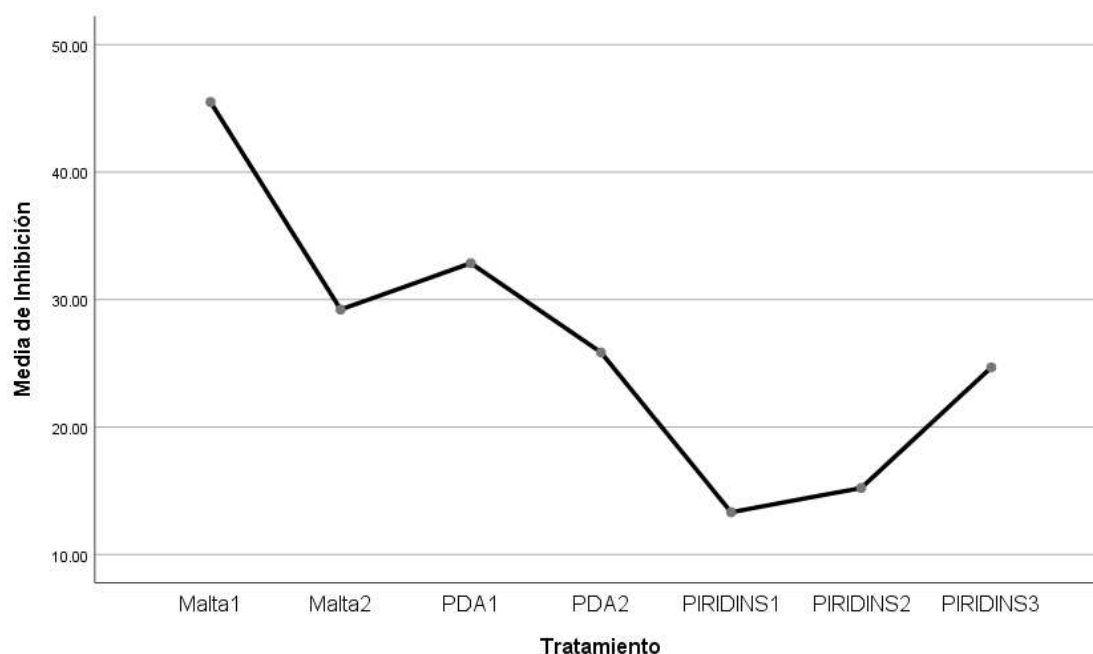
La bioactividad antifúngal de las BAL también ha sido sustentada por Abouloifa, según lo expresado en el epígrafe 2.3.5. son los compuestos anfífilos que permite el contacto entre el hongo presente en el compartimento hidrofílico y los antifúngicos hidrofóbicos.

**Tabla 8-4:** Porcentaje de inhibición de 3-piridincarboxamida sobre *Botrytis cinerea*

| S1              |                 |                 | S2              |                 |                 | S3              |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 | % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 | % Inhibición R1 | % Inhibición R2 | % Inhibición R3 |
| 11.79           | 14.13           | 14.13           | 12.57           | 12.57           | 12.97           | 23.89           | 26.41           | 21.46           |
| 13.58           | 11.40           | 11.40           | 16.50           | 16.50           | 12.76           | 29.55           | 25.68           | 24.76           |
| 15.50           | 13.20           | 13.20           | 11.40           | 11.40           | 11.79           | 27.04           | 22.68           | 24.52           |
| 14.62           | 11.44           | 11.44           | 17.45           | 17.45           | 16.10           | 20.36           | 22.63           | 23.84           |
| 9.75            | 12.67           | 12.67           | 14.85           | 14.85           | 13.75           | 31.03           | 27.66           | 25.09           |
| 14.15           | 12.97           | 12.97           | 12.73           | 12.73           | 14.08           | 24.76           | 24.43           | 23.34           |
| 11.40           | 11.40           | 11.40           | 21.27           | 21.27           | 19.49           | 16.98           | 23.29           | 22.98           |
| 16.57           | 16.50           | 16.50           | 15.59           | 15.59           | 16.60           | 31.69           | 23.34           | 25.75           |
| 14.52           | 13.16           | 13.16           | 14.13           | 14.13           | 14.13           | 21.46           | 23.89           | 23.77           |
| 16.50           | 13.67           | 13.67           | 18.11           | 18.11           | 15.72           | 27.71           | 24.76           | 25.75           |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la Tabla 8-4 se observa los resultados de inhibición del químico 3-piridincarboxamida sobre *Botrytis cinerea* con tres concentraciones diferentes S1= 1000 ppm, S2= 2000 ppm y S3 = 3000 ppm, cada una con 3 réplicas, donde PIRIDINS3 mostró el mayor porcentaje de inhibición con un promedio de 24.68%.



**Ilustración 6-4:** Medias de los Porcentajes de inhibición de *Botrytis cinerea* dado por BAL en medio Malta, PDA y 3-piridincarboxamida

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la Ilustración 6-4 muestra los porcentajes de inhibición generados por BAL para *Botrytis cinerea* en los distintos tratamientos empleados en la investigación, demostrando asimetría en la bioactividad de las BAL en agar Malta y PDA durante 24 horas, con fuerte concentración hacia los porcentajes altos de inhibición.

#### 4.3.1. Resultados de sobrenadantes de bacterias ácido lácticas frente a *Botrytis cinerea*

En las Tablas 9-4 y 10-4 se puede observar los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición del extracto libre de células de BAL.

**Tabla 9-4:** Actividad antagonica de los sobrenadantes de BAL frente a *Botrytis cinerea*

| Aislado de BAL<br>3 réplicas                    | % de inhibicion |
|---|-----------------|
| SQBAL 1   | -               |
| SQBAL 2   | -               |
| SQBAL 3   | -               |
| SQBAL 4   | -               |
| SQBAL 5   | -               |
| SQBAL 6   | -               |
| SQBAL 7   | -               |
| SQBAL 8   | -               |
| SQBAL 9   | -               |
| SQBAL 10  | -               |
| SQBAL 11  | -               |
| SQBAL 12  | -               |
| SQBAL 13  | -               |
| SQBAL 14  | -               |
| SQBAL 15  | -               |
| SQBAL 16  | -               |
| SQBAL 17  | -               |
| SQBAL 18  | -               |
| SQBAL 19  | -               |
| SQBAL 20  | -               |
| SQBAL 21  | -               |
| SQBAL 22  | -               |
| SQBAL 23  | -               |
| SQBAL 24  | -               |
| SQBAL 25  | -               |
| SQBAL 26  | -               |
| SQBAL 27  | -               |
| SQBAL 28  | -               |
| SQBAL 29  | -               |
| SQBAL 30  | -               |
| Control negativo<br>( <i>Botrytis cinerea</i> ) | -               |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

**Tabla 10-4:** Actividad antagonica de los sobrenadantes de BAL (con fermentación batch) sobre *Botrytis cinerea*

| Sobrenadantes de BAL | % Inhibicion |
|----------------------|--------------|
| SQBAL 2              | -            |
| SQBAL 3              | -            |
| SQBAL 5              | -            |
| SQBAL 7              | -            |
| SQBAL 8              | -            |
| SQBAL 12             | -            |
| SQBAL 13             | -            |
| SQBAL 15             | -            |
| SQBAL 24             | -            |
| SQBAL 28             | -            |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

Los sobrenadantes de los aislados SQBAL 1 a SQBAL 30 Tabla 9-4 y los sobrenadantes de la fermentación Batch tabla 10-4 obtenidos según la metodología indicada en el epígrafe 3.19. no mostraron bioactividad antagonica frente a *Botrytis* coincidiendo con los resultados de la investigación de Chen Cen y colaboradores.

El experimento de Chen Cen (2020, pp.4) y sus colaboradores consistió en determinar si la inhibición de *Botrytis* in vitro era consistente con la inhibición in vivo, evaluando los efectos de las suspensiones celulares de BAL y de los sobrenadantes libres de células; al respecto encontraron que, los sobrenadantes tenían poco efecto en el desarrollo de la enfermedad mientras las suspensiones de BAL redujeron significativamente el rigor de la pudrición por *Botrytis* en frutos de fresa en una relación directa con el aumento del número de células microbianas. Concluyeron que el mejor control del moho gris en fresa se logró con la suspensión celular lavada de *L. plantarum*.

Cabe anotar que en el presente estudio los sobrenadantes de los cultivos libres de células no presentaron ningún efecto inhibitorio en el ensayo in vitro ni aun después de haber sometido a una fermentación tipo batch, sugiriendo que los metabolitos bioactivos no se encuentran en el sobrenadante o quizás sus cantidades son muy pequeñas para ser detectadas método de cultivo dual.

#### 4.4. Resultados del ensayo in vivo del antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas sobre *Botrytis cinerea*

**Tabla 11-4:** Resultados del ensayo in vivo del antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas sobre *Botrytis cinerea*

| Aislado de BAL | Organismo                            | Antagonismo dado por BAL sobre <i>Botrytis Cinerea</i> in vivo |        |         |
|----------------|--------------------------------------|--|--------|---------|
|                |                                      | Fresa 1  | Fresa2 | Fresa 3 |
| QBAL 1         | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | +      | +       |
| QBAL 2         | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | -      | +       |
| QBAL 3         | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | -  | -      | -       |
| QBAL 4         | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | +      | -       |
| QBAL 5         | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | -  | -      | -       |
| QBAL 6         | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | -  | +      | +       |
| QBAL 7         | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | -  | -      | +       |
| QBAL 8         | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | +  | +      | +       |
| QBAL 9         | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | -  | +      | -       |
| QBAL 10        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | +  | -      | +       |
| QBAL 11        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | -  | -      | +       |
| QBAL 12        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | -  | -      | +       |
| QBAL 13        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | +      | -       |
| QBAL 14        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | +  | +      | -       |
| QBAL 15        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | -      | -       |
| QBAL 16        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | -  | +      | -       |
| QBAL 17        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | +  | -      | +       |
| QBAL 18        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | +      | -       |
| QBAL 19        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | +      | +       |
| QBAL 20        | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | +  | -      | +       |
| QBAL 21        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | -  | +      | +       |
| QBAL 22        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | -  | +      | +       |
| QBAL 23        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | +  | -      | +       |

|                      |                                      |   |   |   |
|----------------------|--------------------------------------|---|---|---|
| QBAL 24              | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | - | - | + |
| QBAL 25              | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | - | + | + |
| QBAL 26              | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | + | + | + |
| QBAL 27              | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | - | + | + |
| QBAL 28              | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | + | + | + |
| QBAL 29              | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | + | - | + |
| QBAL 30              | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | - | + | + |
| 3-piridincarboxamida |                                      | + | + | + |
| Control negativo     | <i>Botrytis cinerea</i>              | - | - | - |
| Control positivo     | fresas pinchadas                     | - | - | - |

+: Inhibición del hongo

-: no inhibe al hongo

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la Tabla 11-4 se aprecia los efectos del antagonismo in vivo de Bacterias Ácido Lácticas sobre *Botrytis cinerea*, es necesario mencionar que se incluyó Boscalid (3-piridincarboxamida) en concentración (0,5 g /L) según indicaciones del fabricante. De forma general, los resultados sugieren que las bacterias ácido-lácticas en este ensayo funcionaron como inhibidores de *Botrytis cinerea* con una frecuencia del 63 % (57/90, respuestas positivas) lo que se explicaría por la afinidad del hongo para atacar de preferencia tejidos dañados o senescentes significando que el 37 % pudo haber tenido una lesión inicial en los tejidos (Petrasch et al., 2019, pp. 877-892).

De acuerdo con Axel, et al (2015, pp. 1701) la capacidad inhibitoria de las BAL puede atribuirse a la secreción de un solo tipo de compuesto, a varios o a la sinergia entre ciertas sustancias; entre los compuestos bioactivos también se han mencionado a los ácidos 3-fenil-láctico, 4-hidroxifenil-láctico, 2-hidroxiopropanoico.

Otros compuestos implicados en la actividad antifúngica son los surfactantes, moléculas complejas conformadas por mezcla de carbohidratos, proteínas, lípidos, glucolípidos, lipopéptidos y compuestos poliméricos, los mismos que pueden producirse extracelularmente y en la superficie celular (Muhialdin et al., 2018, p.557). Los resultados coinciden con Jaramillo (2022), quien afirma que las cepas BAL presentan acción antagonica contra fitopatógenos, tanto en ensayos in vitro como in vivo.

#### 4.5. Resultados de los factores ecológicos intrínsecos

Los factores ecológicos intrínsecos determinan el crecimiento, o la supervivencia o muerte de los microorganismos que colonizan una matriz alimentaria (Preetha & Narayanan, 2020, p. 57). En este sentido, se evidenciaron los factores ecológicos que pueden favorecer el desarrollo del fitopatógeno, al igual que los cambios que este puede generar al crecer a la matriz alimentaria.

##### 4.5.1. Humedad y Ph

La Tabla 12-4 indica el efecto de *Botrytis cinerea* sobre el pH y el contenido de agua de la fresa original sin deterioro.

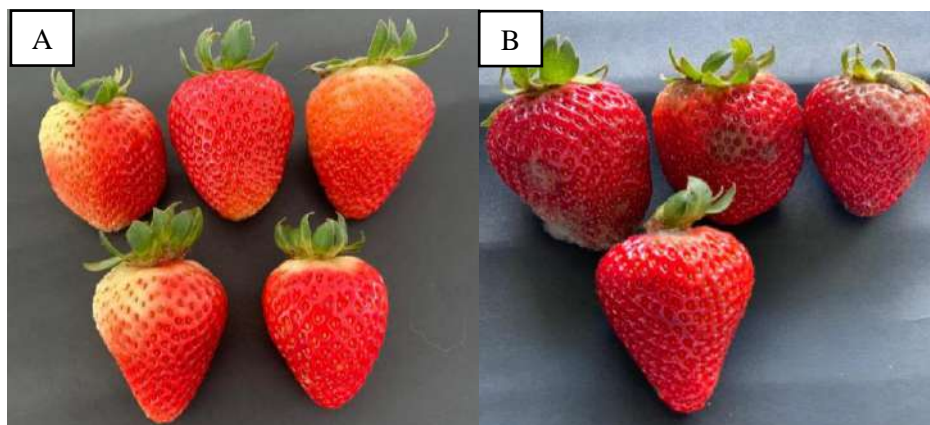
**Tabla 12-4:** Humedad y pH de fresa intacta y fresa con *Botrytis cinerea*

| Tipo    | Fresa intacta | Fresa con <i>Botrytis cinerea</i> |
|---------|---------------|-----------------------------------|
| Humedad | 87.621        | 89.027                            |
| Ph      | 3.51          | 3,91                              |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

##### 4.5.2. Estructura biológica

De acuerdo con Ilustración 7-4 A), indica la morfología macroscópica de la fresa intacta en donde se aprecia una fruta de color rojo brillante, en contraste de la Ilustración 7-4 B), muestra una fresa infectada de *Botrytis cinerea* agente de la podredumbre gris, se destaca un micelio algodonoso, en el punto inicial de la infección.

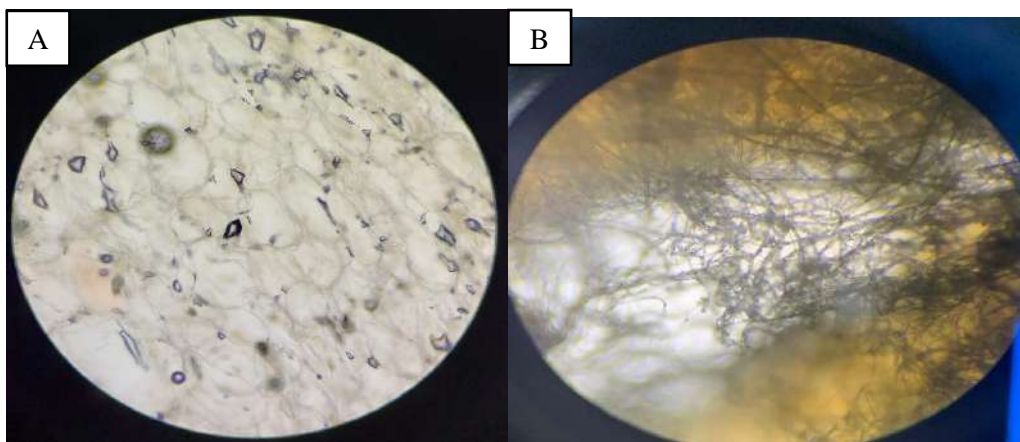


**Ilustración 7-4:** A) Morfología macroscópica de fresas intactas B) Morfología macroscópica de fresas con *Botrytis cinerea*

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

En la ilustración 8-4 A) se aprecia la pared celular íntegra de la fresa sin infección a diferencia de la estructura microscópica Ilustración 8-4 B), de la fresa con *Botrytis cinerea* donde se observa la presencia de micelio en la pared celular, la literatura señala que la maduración está asociada con el desmontaje de las paredes celulares, es decir la degradación de la pared celular lo cual reduce las barreras mecánicas de protección favoreciendo a la propagación de *B. cinerea* y facilitando el acceso a azúcares simples como fuente de carbono y aumentando las posibilidades de formación de hematomas en la fruta.

En la fresa, la solubilización de la pared celular se correlaciona con un aumento en el contenido de azúcar de la fruta, como resultado de la degradación de los polisacáridos, disminución de las pectinas solubles en ácido y de la fracción insoluble en alcohol de las paredes celulares, mientras que aumenta el contenido soluble en agua. *B. cinerea* secreta una amplia gama de enzimas como las cutinasas, poligalacturonasas que degradan la pared celular y actúan sobre la mayoría de los polisacáridos y las pectinas (Petrasch et al., 2019, pp. 5).

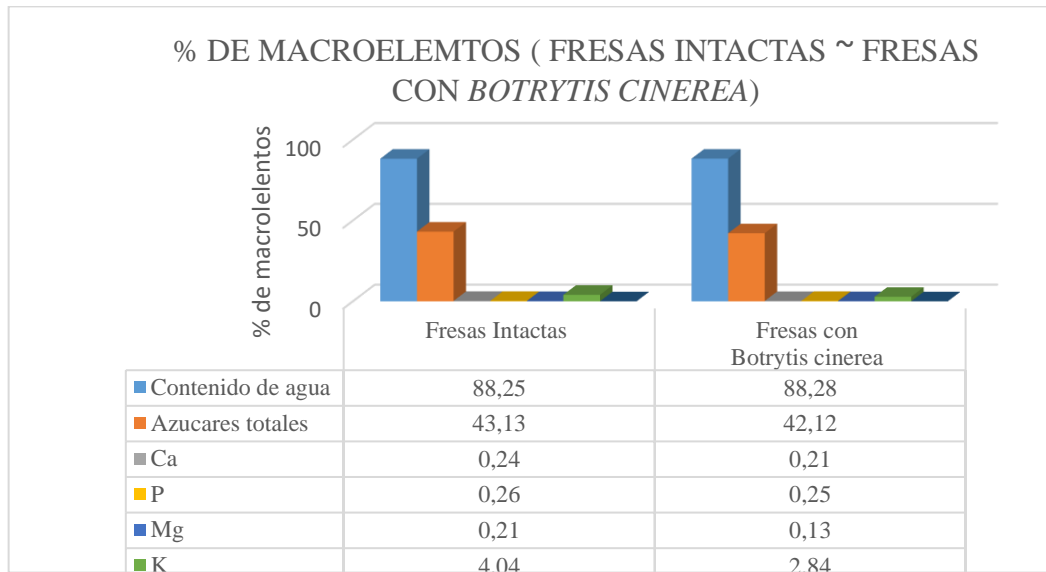


**Ilustración 8-4:** A) Morfología microscópica de fresas intactas B) Morfología microscópica de fresas con *Botrytis cinerea*

**Realizado por:** Escudero, L; Pérez, P, 2023.

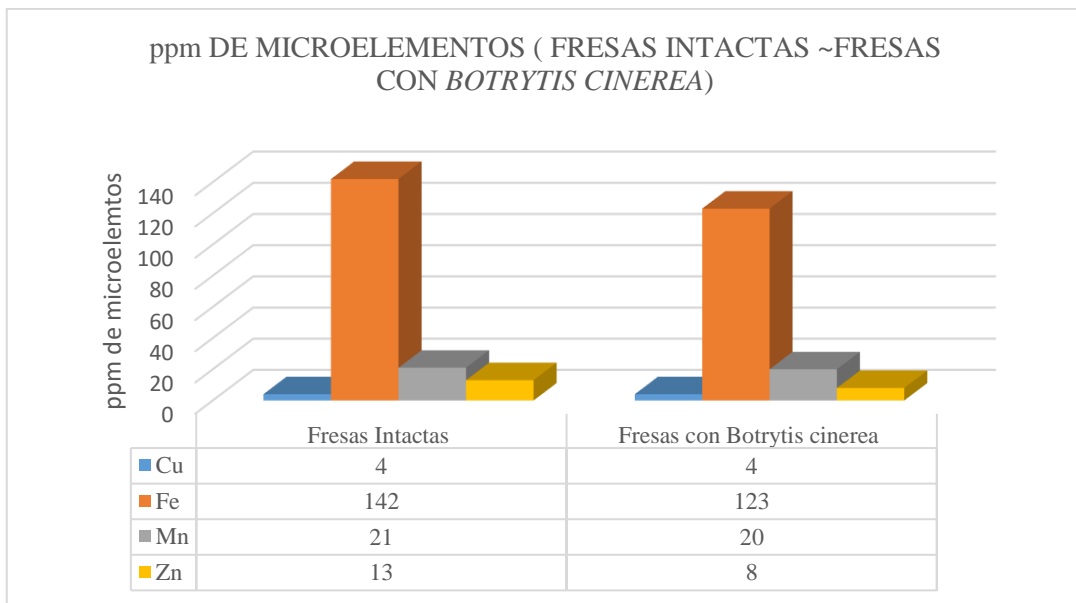


#### 4.5.3. *Minerales y Azúcares totales*



**Ilustración 9-4:** Porcentaje de Macroelementos de Fresas Intactas y Fresas con *Botrytis cinerea*

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.



**Ilustración 10-4:** Contenido de Microelementos en ppm de Fresas Intactas y Fresas con *Botrytis cinerea*

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

Los análisis realizados para minerales y azúcares totales en muestra seca indican que los valores tienden a cambiar según el tipo de modelo, es decir, fresas intactas y fresas contaminadas con *Botrytis cinerea*. Según los Ilustración 9-4 y 10-4, los contenidos de Ca, P, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn y Zn el contenido de macromelementos y microelementos son superiores en fresa intacta en comparación de la fresa con *Botrytis cinerea*.

En la determinación de azúcares totales se evidencia una reducción en su contenido, en la matriz infectada por *Botrytis* lo que sugiere el uso de azúcares para la nutrición del hongo. Ozcan (2007, pp. 1023-1026) menciona que, de acuerdo con los datos, la disminución de estos elementos ocurre porque *Botrytis cinerea* que está afectando la composición química, las características físicas, el valor nutritivo, las cualidades organolépticas y la conservación de la fruta (Oliveira et al., 2021, 1815). Se conoce que, aunque los azúcares pueden servir como un factor de susceptibilidad, las altas concentraciones de azúcar no son esenciales para infección por *B. cinerea* (Petrasch et al., 2019).

#### **4.5.4. Vitamina C**

Los resultados del análisis de las concentraciones de ácido ascórbico de las dos muestras de jugo de fresa, con mayor concentración, fue la fresa intacta, con un resultado de 18.27 mg/100 g, seguido de la muestra 2 de la fresa con un 30 % de contaminación de *Botrytis cinerea* con 14.64 mg/100 g es decir se puede apreciar una diferencia significativa con respecto a la fresa intacta. Cabe señalar que en este el contenido de vitamina C correspondientes la fresa Albión supera a los valores encontrados en otros tipos de fresa. No obstante, en función de la composición química de los frutos rojos, el resultado obtenido por este método no varía significativamente y mantiene las proporciones de los datos teóricos.

Además, los estudios de Mendoza (2018), sobre degradación de la vitamina C en jugos de fresas frescas demostraron que, durante el almacenamiento o postcosecha de estas, las concentraciones de ácido ascórbico disminuyeron gradualmente con el tiempo a un ritmo que dependía de la temperatura, almacenamiento, presencia de azúcar y la aparición de hongos filamentosos, esté último dato coincide con los hallazgos del presente estudio (Sapei & Hwa, 2014, pp. 62-66).

#### **4.6. Comprobación de hipótesis**

Hipótesis Planteada:

La bioactividad antagónica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida actúan como inhibidores de *Botrytis cinerea* de fresas, mediante ensayo in vitro.

Para la comprobación de la hipótesis se aplicó el análisis estadístico que se muestra a continuación, con los porcentajes de inhibición obtenidos en los diferentes tratamientos utilizados para la investigación.

**Tabla 13-4:** Prueba de homogeneidad de varianza

| Prueba de homogeneidad de varianzas |   |                       |     |         |      |
|-------------------------------------|---|-----------------------|-----|---------|------|
|                                     |   | Estadístico de Levene | gl1 | gl2     | Sig. |
| Inhibición                          | Se basa en la media                     | 21.775                | 6   | 371     | .000 |
|                                     | Se basa en la mediana                   | 17.397                | 6   | 371     | .000 |
|                                     | Se basa en la mediana y con gl ajustado | 17.397                | 6   | 197.547 | .000 |
|                                     | Se basa en la media recortada           | 19.873                | 6   | 371     | .000 |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

**Tabla 14-4:** Prueba Anova

| ANOVA            |                   |     |                  |         |      |
|------------------|-------------------|-----|------------------|---------|------|
| Inhibición       |                   |     |                  |         |      |
|                  | Suma de cuadrados | gl  | Media cuadrática | F       | Sig. |
| Entre grupos     | 34877.531         | 6   | 5812.922         | 101.202 | .000 |
| Dentro de grupos | 21309.900         | 371 | 57.439           |         |      |
| Total            | 56187.431         | 377 |                  |         |      |

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

Estimaciones del tamaño del efecto eta,  $F=101.202$ , que supera al  $F$  crítico, dado que la significancia es menor que 0.05, por tanto, es una  $F$  significativa que indica que la bioactividad antagonica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida actúan como inhibidores de *Botrytis cinerea* en las fresas.

**Tabla 15-4:** Análisis Tukey

| Porcentaje de Inhibición |    |                              |         |         |         |
|--------------------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
| HSD Tukey <sup>a,b</sup> |    |                              |         |         |         |
| Tratamiento              | N  | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |         |         |
|                          |    | 1                            | 2       | 3       | 4       |
| PIRIDINS1                | 30 | 13.3153                      |         |         |         |
| PIRIDINS2                | 30 | 15.2197                      |         |         |         |
| PIRIDINS3                | 30 |                              | 24.6833 |         |         |
| PDA2                     | 72 |                              | 25.8561 |         |         |
| Malta2                   | 72 |                              | 29.2179 | 29.2179 |         |
| PDA1                     | 72 |                              |         | 32.8571 |         |
| Malta1                   | 72 |                              |         |         | 45.5033 |
| Sig.                     |    | .897                         | .071    | .258    | 1.000   |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 45.000.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Realizado por: Escudero, L; Pérez, P, 2023.

El tratamiento que tiene el mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* pertenece al grupo 4 con una media de inhibición de 45.50% con crecimiento en agar Malta en un periodo de tiempo de 24 horas, seguido por el grupo 3 con una media de inhibición de 29.22% para el agar Malta en un período de tiempo de 48 horas y en el agar PDA con una media de inhibición de 32.86% en un período de tiempo de 24 horas y 25.86 % en 48 horas, por lo tanto, en el grupo 4 no existe diferencia estadísticamente significativa entre usar el agar malta o PDA.

De acuerdo con la investigación realizada y la sustentación teórica pertinente, se ha demostrado los múltiples beneficios del uso de las bacterias ácido-lácticas como antifúngicos y bioconservantes por lo que, se recomienda utilizar estos tratamientos para la prevención y control del hongo *Botrytis cinerea* en cultivos de fresa.

Por lo tanto, aceptamos la hipótesis general planteada:

*“La bioactividad antagónica de las bacterias ácido-lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida SI actúa como inhibidor de Botrytis cinerea de fresas, mediante ensayo in vitro”.*

## CAPÍTULO V

### 5. MARCO PROPOSITIVO

#### 5.1. Propuesta

Las bacterias ácido lácticas (BAL), revitalizadas de germinados de Quinoa, pueden ser empleadas como bioconservantes de frutos al inhibir microorganismos fitopatógenos; por lo cual en la presente investigación se describieron los posibles problemas que está afectando a plantaciones de fresa por el deterioro por hongos entre ellos *Botrytis cinerea*, y los posibles efectos para la calidad comercial y la inocuidad alimentaria, frente a esta problemática se estableció la hipótesis de investigación dirigida a evaluar la bioactividad antagónica de las bacterias ácido lácticas y la actividad de 3-piridincarboxamida sobre *Botrytis cinerea* de fresas, mediante ensayos in vitro.

En este contexto, mediante ensayos de antagonismo se analizó la actividad antifúngica de las BAL, encontrándose que los aislados de BAL identificados fenotípica y genéticamente como *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactiplantibacillus pentosus* se comportaron de modo similar respecto a los rangos de inhibición fungal, actividad que fue ratificada por un ensayo in vivo. Adicionalmente, se encontró que 3-piridincarboxamida también inhibe a *Botrytis*, pero este presenta una tasa de alta residualidad en cultivos de fresa.

Es necesario detallar que se mejoró la actividad de BAL al escalar el cultivo inicial a 250 mL como volumen efectivo de trabajo. De otro lado, la variabilidad en los datos de las repeticiones sugiere el empleo de otro método diferente al cultivo dual para examinar antagonismo, se propone trabajar con cultivos líquidos en micropocillos. Cabe señalar que la variabilidad de respuesta puede estar ligada a variables del experimento, tales como el número de esporas fungales, la densidad poblacional de las BAL, que no se pueden ajustar con exactitud y precisión, por su naturaleza biológica.

En todo caso, la respuesta del ensayo in vivo indica que los ensayos in vitro funcionan bien como herramienta de tamizaje para detectar antagonismo. Es necesario determinar los metabolitos de BAL responsables de su bioactividad. Por lo tanto, los datos recopilados en este estudio podrán ser validados, mejorados y aplicados en la elaboración de un biofungicida o biopreservante para el control de *B. cinerea* en fresa (*Fragaria ananassa*), variedad Alvién.

## CONCLUSIONES

Las BAL aisladas de germinados de quinua mostraron actividad antagónica contra *Botrytis cinerea*, a través del ensayo de cultivo dual, destacándose la variación en la capacidad inhibitoria de las BAL en función del tiempo de incubación de los cultivos, siendo mejor incubar a 37 °C durante 24 horas antes que a 37 °C por 48 horas. Esta actividad se atribuye a los diversos metabolitos secundarios de BAL, lo que evidencia el potencial antifúngico de la BAL y la posibilidad de utilizarla como biofungicida en plantaciones o biopreservante durante la postcosecha de la fresa (*Fragaria ananassa*), variedad Albión.

A diferencia de la bioactividad encontrada con cultivos de BAL, los sobrenadantes, no mostraron actividad contra *Botrytis*, en contraste, 3 piridincarboxamida controla el hongo, aunque por su residualidad afecta a la salud humana y al ambiente.

La técnica antagonismo dual permitió apreciar que la biomasa de BAL en suspensión funcionó mejor que los sobrenadantes libres de células en la inhibición de *Botrytis* crecido en dos medios selectivos diferentes, PDA y agar Malta.

Los factores intrínsecos de la fresa, contenido en agua, pH, estructuras biológicas, azúcares totales, macronutrientes, micronutrientes y vitamina C aportan al crecimiento de *Botrytis cinerea* evidenciándose a la vez una reducción de los nutrientes en la matriz deteriorada por hongos. En cambio, el aumento del agua y pH puede explicarse por reacciones metabólicas de *Botrytis* al contaminar las fresas.

De acuerdo a la identificación genotípica, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactiplantibacillus pentosus* provenientes de germinado de quinua presentaron actividad antagónica frente a *Botrytis cinerea*.

## **RECOMENDACIONES**

Investigar mediante métodos analíticos de vanguardia la identidad de los compuestos responsables del antagonismo de las BAL frente a *Botrytis*.

Se recomienda ampliar el campo de investigación sobre las bacterias del ácido lácticas tendientes a desarrollar fungicidas naturales para el control microbiano en la poscosecha de fresas, mejorando su preservación.

Se recomienda analizar las BAL realizando ensayos in vitro e in vivo frente a otros hongos fitopatógenos de las plantaciones de fresas, con el fin de garantizar la integridad e inocuidad del fruto.

Se debe evaluar la resistencia de *Botrytis* a los fungicidas utilizados para su control, puesto que se han detectado frutos resistentes a fungicidas comerciales, debiendo a la vez formular bioconservantes para mitigar el uso de químicos.

## GLOSARIO

**Acetoína:** es procedente por la levadura *Saccharomyces* durante el proceso de fermentación alcohólica. Afecta tanto al bouquet del vino y, en particular, es un precursor de la biosíntesis de 2,3-butanodiol y diacetilo (Han et al., 2019, pp. 1-54)

**Ácido fenilacético:** es miembro de la clase de fitohormonas de las auxinas. Actúa como promotor del crecimiento de las plantas, posee una actividad antimicrobiana sustancial y además tiene una amplia distribución y se ha estudiado en bacterias, hongos, algas y plantas terrestres (Cook, 2019, pp. 243–254).

**Esporas:** son unidades reproductivas pequeñas, unicelulares, originadas para propagar material genético por microbios procariotas y eucariotas, incluidas algas y protozoos, plantas vasculares inferiores e incluso un subconjunto de animales. Las esporas ubicadas debajo de las hojas de las plantas sin flores, similares a las semillas de las frutas o las flores, transfiere material genético a la siguiente generación y, a menudo, a nuevos entornos (Blango et al., 2019: pp. 1-8).

**Reuterina:** es un metabolito activo que actúa contra bacterias grampositivas y gramnegativas hongos, protozoos y levaduras, secretada por *L. reuteri* un probiótico que puede ser directamente bacteriostático o bactericida (Doron, 2016, pp. 99-109).



## **BIBLIOGRAFÍA**

**ABOULOIFA, H., et al.** “*Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application in food biopreservation*”. *Advances in Applied Microbiology* [en línea], 2022, (Marruecos) 120, p. 33-77. [Consulta: 04 diciembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2022.07.001>

**AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL.** Nota de análisis sectorial agricultura y desarrollo rural. *Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación – roma dirección del centro de inversiones* [en línea]. Quito-Ecuador: Editorial Debate, 2025. [Consulta: 03 diciembre 2021]. Disponible en: <https://es.readkong.com/page/ecuador-nota-de-analisis-sectorial-agricultura-y-7950362>

**AGRIPOULOU, Sofia, et al.** “*Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables*”. *Quality and safety aspects. Microorganisms* [en línea], 2020, (Kalamata-Greece) 8(6), pp. 952. [Consulta: 10 diciembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>

**AHLBERG, Sara H.; JOUTSJOKI, Vesa; KORHONEN, HANNU J.** *Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation.* *International journal of food microbiology*, [en línea], 2015, (Jokioinen Finland) 207, pp. 87-102. [Consulta: 11 diciembre 2022]. Disponible en: DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042)

**ARQUÉS, Juan L., et al.** *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens.* [en línea], *BioMed research international*, 2015, (Madrid- España). [Consulta: 07 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2015/584183>

**AKIMOV, M. U., et al.** *Nutrient value of fruit in promising strawberry varieties.* *Voprosy pitaniia*, [en línea], 2019, (Russia) 8(2), pp. 64-72. [Consulta: 26 diciembre 2022]. Disponible en: DOI: [10.24411/0042-8833-2019-10019](https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10019)

**AXEL, Claudia, et al.** *Antifungal activities of three different Lactobacillus species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough.* *Applied microbiology and biotechnology*, [en línea], 2016, (Berlín- Alemania)100, pp. 1701-1711. [Consulta: 14 febrero 2023]. Disponible en: DOI: [10.1007/s00253-015-7051-x](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7051-x)

**AYIVI, Raphael D., et al.** Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, [en línea], 2020, vol. 1, no 3, p. 202-232. [Consulta: 05 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>

**BANGAR, Sneh Punia, et al.** Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food bioscience*, [en línea], 2022, (Estados Unidos) 46, pp. 101615. [Consulta: 25 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>

**BARBIERI, Tiago José Amaral.** Modifications of grape berry metabolism in response to *Botrytis cinerea* infection. [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría). Universidade do Minho, Portugal. 2020. pp.10. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: <http://repositorium.uminho.pt/bitstream/1822/73631/1/Dissertacao%2BRetificada-PG33848.pdf>

**BATTINO, MAURIZIO, et al.** The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation. *Phytomedicine*, [en línea], 2021, (España) 86, pp. 1-10. [Consulta: 25 octubre 2021]. Disponible en: DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153170

**BERGEY, David Hendricks.** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. [en línea]. Ninth edition. Philadelphia-Tokyo. Lippincott Williams & Wilkins, 1994. [Consulta: 25 octubre 2022]. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/11178154>

**BENNANI, S., et al.** *Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk*. Greener Journal of Biological Science, [en línea], 2017, vol. 25, p. 4934-4944. [Consulta: 05 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.jmaterenvironsci.com/>

**BERNAL, Angela R. Romero, et al.** *Botrytis cinerea* response to pulsed light: Cultivability, physiological state, ultrastructure and growth ability on strawberry fruit. *International journal of food microbiology*, [en línea], 2019, vol. 309, p. 108311. [Consulta: 03 enero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108311>

**BINTSIS, Thomas.** Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, [en línea], 2018, vol. 4, no 4, p. 665. [Consulta: 02 noviembre 2021]. Disponible en: DOI: 10.3934/microbiol.2018.4.665

**BOUKAEW, Sawai, et al.** *Impact of environmental factors on Streptomyces spp. metabolites against Botrytis cinerea.* Journal of Basic Microbiology, [en línea], 2022, vol. 62, no 5, p. 611-622. [Consulta: 05 febrero 2023]. Disponible en: DOI: 10.1002/jobm.202100423

**BRYUKHANOV, A. L.; KLIMKO, A. I.; NETRUSOV, A. I.** *Antioxidant Properties of Lactic Acid Bacteria.* Microbiology, [en línea], 2022, vol. 91, no 5, p. 463-478. [Consulta: 20 enero 2023]. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261722601439>

**BLANGO, Matthew G.;** *Conidial surface proteins at the interface of fungal infections.* PLoS pathogens, [en línea], 2019, vol. 15, no 9, p. e1007939. [Consulta: 07 septiembre 2022]. Disponible en: DOI: 10.1371/journal.ppat.1007939

**CANPOLAT, Elif, et al.** *Antifungal activity of some lactic acid bacteria against several soil-borne fungal pathogens isolated from strawberry plants.* Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, [en línea], 2018, vol. 6, no 9, p. 1163-1167. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i9.1163-1167.1975>

**CASIMIRO MELGAREJO, Hugo Benny.** *Control del Moho gris (Botrytis cinerea Pers.) en Tomate (Solanum lycopersicum) cv. Huascarán mediante fertilizantes foliares en La Molina.* [en línea], 2022. [Consulta: 18 septiembre 2021]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5259>

**COSME, Fernanda, et al.** *Red Fruits Composition and Their Health Benefits—A Review.* Foods, [en línea], 2022, vol. 11, no 5, p. 644. [Consulta: 24 octubre 2021]. Disponible en: DOI: 10.3390/foods11050644

**COBO-MONTERROZA, Rodrigo, et al.** *Native lactic acid bacteria as a starter culture for the production of Mexican cream cheese.* Agronomía Mesoamericana, [en línea], 2019, vol. 30, no 3, p. 855-870. [Consulta: 13 octubre 2021]. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.34673>

**COOK, Sam D.** *An historical review of phenylacetic acid.* Plant and Cell Physiology, [en línea], 2019, vol. 60, no 2, p. 243-254. [Consulta: 13 diciembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz004>

**CYBULSKA, J., DROBEK, M., PANEK, J., CRUZ-RUBIO, J., et. al.** *Changes of pectin structure and microbial community composition in strawberry fruit (Fragaria × ananassa Duch.)*

during cold storage. *Food Chemistry*, [en línea], 2022, Vol 381, [Consulta: 21 septiembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132151>

**CHANG, L. I. U., et al.** Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, [en línea], 2009, vol. 22, no 5, p. 401-412. [Consulta: 23 octubre 2022]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60018-9)

**CHAVES, VITOR C.; CALVETE, EUNICE; REGINATTO, FLÁVIO H.** *Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (Fragaria x ananassa duch) cultivars*. *Scientia horticulturae*, [en línea], 2017, vol. 225, p. 293-298. [Consulta: 05 enero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.013>

**CHEN, CEN, et al.** A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Biological Control*, [en línea], 2020, vol. 148, p. 104306. [Consulta: 05 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104306>

**CHEN, Pei-Hua; CHEN, Rou-Yun; CHOU, Jui-Yu.** *Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of Botrytis cinerea on strawberry fruits*. *Mycobiology*, [en línea], 2018, vol. 46, no 1, p. 33-46. [Consulta: 05 febrero 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>

**DE LA CRUZ, Vilma Julia Reyes; VILLANUEVA, Emilio Fredy Yábar.** Aislamiento y uso de bacterias ácido lácticas nativas en la elaboración de tocosh en condiciones naturales y controladas. *Journal of Agri-food Science*, [en línea], 2022, vol. 3, no 1, p. 44-52. [Consulta: 01 marzo 2022]. Disponible en: <https://revistas.uncp.edu.pe/index.php/jafs/article/view/1440>

**DE MOURA, Ginaini Grazielli Doin, et al.** Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against *Botrytis cinerea* L. *Microbiological Research*, [en línea], 2021, vol. 251, p. 126793. [Consulta: 01 Mayo 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126793>

**DARA, S. K.** *Evaluating biological fungicides against botrytis and other fruit rots in strawberry*. *UCANR eJournal of Entomology and Biologicals*. [en línea], 2020. [Consulta: 08 mayo 2022]. Disponible en: <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=43633>

**DOPAZO, Victor, et al.** Potential application of lactic acid bacteria in the biopreservation of red grape from mycotoxigenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [en línea], 2022, vol. 102, no 3, p. 898-907. [Consulta: 08 Julio 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11422>

**DORON, Shira; GORBACH, Sherwood L.** Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert review of anti-infective therapy*, [en línea], 2006, vol. 4, no 2, p. 261-275. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: DOI: 10.1002/jcph.1121

**DUBOIS, Michel, et al.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, [en línea], 1956, vol. 28, no 3, p. 350-356. [Consulta: 25 abril 2021]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60111a017>

**ESTELA, Waldir, et al.** Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and continuous cultivation. [en línea], 2007. [Consulta: 26 junio 2021]. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>

**ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A., et al.** Highly sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for boscalid analysis in strawberries. *Food chemistry*, [en línea], 2018, vol. 267, p. 2-9. [Consulta: 26 septiembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.013>

**FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., et al.** Resistencia a múltiples fungicidas en *Botrytis cinerea* en fresa. *Agric. Vergel*, [en línea], 2017, p. 327-330. [Consulta: 28 septiembre 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6206090>

**FILLINGER, Sabine; ELAD, Yigal.** *Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* [en línea]. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016. [Consulta: 17 octubre 2021]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-23371-0>

**FREIRE, Thayná Thamires, et al.** “Bactérias ácido lácticas suas características e importância” *Research, Society and Development* [en línea], 2021,(Portugal) 10(11), pp. 1-14. [Consulta: 27 septiembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19964>

**GACNIK, Sasa, et al.** Salicylate treatment affects fruit quality and also alters the composition of metabolites in strawberries. *Horticulturae*, [en línea], 2021, vol. 7, no 10, p. 400. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100400>

**GANHAO, Rui, et al.** *Characterization of nutritional, physicochemical, and phytochemical composition and antioxidant capacity of three strawberry “Fragaria × ananassa Duch.” cultivars (“Primoris”, “Endurance”, and “Portola”) from Western Region of Portugal.* *Foods*, [en línea], 2019, vol. 8, no 12, p. 682. [Consulta: 03 diciembre 2021]. Disponible en: DOI: 10.3390/foods8120682

**GARCÍA, J.** Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. [en línea] (Trabajo de titulación). (Licenciatura) *Universidad autónoma del estado de Hidalgo, México, Extraído el*, 2007, vol. 15, p. 1-96. [Consulta: 15 enero 2023]. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/10742>

**GIAMPIERI, Francesca, et al.** The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, [en línea], 2012, vol. 28, no 1, p. 9-19. [Consulta: 27 noviembre 2021]. Disponible en: DOI: 10.1016/j.nut.2011.08.009

**GORDON, T. R., et al.** The effect of pH on spore germination, growth, and infection of strawberry roots by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, cause of *Fusarium* wilt of strawberry. [en línea], *Plant disease*, 2019, vol. 103, no 4, p. 697-704. [Consulta: 28 diciembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1296-RE>

**HAN, Guomin; WEBB, Michael R.; WATERHOUSE, Andrew L.** Acetaldehyde reactions during wine bottle storage. *Food chemistry*, [en línea], 2019, vol. 290, p. 208-215. [Consulta: 28 abril 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.137>

**HATTI-KAUL, Rajni, et al.** Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, [en línea], 2018, vol. 365, no 20, p. fny213. [Consulta: 28 noviembre 2021]. Disponible en: DOI: 10.1093/femsle/fny213

**HUA, Li, et al.** “Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables”. *Food Quality and Safety*, [en línea], 2018, vol. 2, n° 3, pp. 111–119. [Consulta: 28 Agosto 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>

**Harris, J.L.** *Safe, Low-Distortion Tape Touch Method for Fungal Slide Mounts. Journal of Clinical microbiology*, [en línea], 2000, Vol 38, no 12, p. 4683-4684. [Consulta: 07 septiembre 2021]. Disponible en: doi: 10.1128/jcm.38.12.4683-4684.2000

**HIDALGO, Gábor-Indra; ALMAJANO, María Pilar.** Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants*, [en línea], 2017, vol. 6, no 1, p. 7. c. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: doi: 10.3390/antiox6010007

**INTRIAGO-REYNA, Hamilton Octavio, et al.** *Emirates Journal of Food and Agriculture*, Outbreaks of crown rot in *Fragaria x ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador. [en línea], 2021, p. 520-527. [Consulta: 28 agosto 2021]. Disponible en: DOI <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i6.2718>

**IQBAL, Mudassir, et al.** Biological control of strawberry crown rot, root rot and grey mould by the beneficial fungus *Aureobasidium pullulans*. *BioControl*, [en línea], 2021, vol. 66, no 4, p. 535-545. [Consulta: 28 octubre 2022]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10526-021-10083-w>

**ISMAIL, Y. S.; YULVIZAR, C.; MAZHITOV, B.** Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir. En *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, [en línea], 2018. p. 012019. [Consulta: 28 enero 2023]. Disponible en: DOI 10.1088/1755-1315/130/1/012019

**ISAZA, Liliana; ZULUAGA, Yenni Paola; MARULANDA, Marta Leonor.** Morphological, pathogenic and genetic diversity of *Botrytis cinerea* Pers. in blackberry cultivations in Colombia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, [en línea], 2019, vol. 41. [Consulta: 17 enero 2023]. Disponible en: DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019490>

**JANURIANTI, Ni Made Defy; UTAMA, I. Made Supartha; GUNAM, Ida Bagus Wayan.** Colour and quality of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) at different levels of maturity. *SEAS (Sustainable Environment Agricultural Science)*, [en línea], 2021, vol. 5, no 1, p. 22-28. [Consulta: 01 febrero 2022]. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.22225/seas.5.1.3166.22-28>

**JESUS, Gabriel Lucas de, et al.** Calidad de la fresa afectada por la relación nitrato: amonio en la solución nutritiva. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, [en línea], 2021, vol. 12, no 5, p.

753-763. [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en:  
<https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2764>

**KOIKE, S.; & BOLDA, M.** El moho gris o pudrición de fresa. *United States: California Strawberry Comission*, [en línea], 2016. [Consulta: 05 diciembre 2021]. Disponible en:  
<https://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>

**KESSEL, Domini, et al.** Potentialities of chitosan for strawberry. Uses in the improvement and conservation of the fruits. *Cultivos Tropicales*, [en línea], 2018, vol. 39, no 1, p. 134-142. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en:  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183313469>

**LEÓN, Á., MONTOYA, O., MOTATO, K., GRANDA, D., CARO, C., et. al.** Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida”. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, [en línea], 2006, vol. 13, n°2, pp. 26-35. ISSN 0121-4004. [Consulta: 10 noviembre 2022]. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a04.pdf>

**LEIVA-MORA, M., et al.** Differential aggressiveness amongs Botrytis cinerea pers. isolates in *Fragaria vesca* L. cv. Albion. *Revista de Protección Vegetal*, [en línea], 2019, vol. 34, no 1. [Consulta: 30 enero 2023]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v34n1/2224-4697-rpv-34-01-e02.pdf>

**LI, Guangjin, et al.** Butanedione suppresses gray mold of postharvest fruit by activating the autophagy of Botrytis cinerea. *Postharvest Biology and Technology*, [en línea], 2022, vol. 193, p. 112057. [Consulta: 08 Nobiembre 2022]. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112057>

**LIU, Jianming, et al.** Systems biology–A guide for understanding and developing improved strains of lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, [en línea], 2019, vol. 10, p. 876. [Consulta: 07 diciembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00876>

**LIU, Shengming, et al.** Resistance to boscalid in Botrytis cinerea from greenhouse-grown tomato. *Plant Disease*, [en línea], 2021, vol. 105, no 3, p. 628-635. [Consulta: 28 enero 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1191-RE>



**LONDOÑO, Natalia Agudelo, et al.** Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, [en línea], 2015, vol. 23, no 36, p. 186-205. [Consulta: 25 febrero 2022]. Disponible en: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/356/306>

**LUZ MÍNGUEZ, Carlos.** Actividad antifúngica y antitoxigénica in vitro y en alimentos de bacterias ácido lácticas (Trabajo de titulación) (Doctorado) [en línea] Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia, Valencia. 2020. pp. 1-15. [Consulta: 08 junio 2021]. Disponible en: <file:///Users/as/Downloads/tesis%20C.%20Luz.pdf>

**MAGNUSSON, Jesper, et al.** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology letters* [en línea], 2003, (Uppsala-Suecia) 219(1), pp. 129-135. [Consulta: 03 septiembre 2022]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)

**MANJARRES MELO, Juan J., et al.** Antagonistic activity of Lactic Acid Bacteria against phytopathogenic fungi isolated from cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). *Current Microbiology*, [en línea], 2021 vol. 78, no 4, p. 1399-1408. [Consulta: 03 diciembre 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02416-w>

**MARTÍN BONILLA, Carina, et al.** Utilización de agentes de biocontrol para prevenir el deterioro de la fruta en poscosecha. (Trabajo de titulación) (Maestría) [en línea] Universidad de la Laguna, España. 2019. pp. 1-13. [Consulta: 21 diciembre 2022]. Disponible en: <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/17327>

**MATUTE, P.** Control biológico del moho gris (*botrytis cinerea*) en cultivos de fresa (*fragaria vesca* l.) mediante hongos. *SciELO*, [en línea], 2019, vol. 3, n°2, (ecuador) pp. 121-234. [Consulta: 09 agosto 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18147>

**MENG, Lijuan; HÖFTE, Monica; VAN LABEKE, Marie-Christine.** Varying the time of red light exposure influences leaf resistance to different *Botrytis cinerea* isolates in strawberry. *Journal of Plant Diseases and Protection*, [en línea], 2022p. 1-6. [Consulta: 05 Diciembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111988>

**MENDOZA RAMIREZ, Eduard Eithel.** Alteración de los alimentos tratados térmicamente: descripción, causas, microorganismos alterantes. (Trabajo de titulación) (Trabajo de titulación) [en línea] Universidad Nacional de la Amazonía peruana, Facultad de Industrias Alimentarias,

Perú. 2018. pp. 18-42. [Consulta: 18 febrero 2021]. Disponible en: [https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/6750/Eduard\\_Suficiencia\\_%20Titulo\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/6750/Eduard_Suficiencia_%20Titulo_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

**MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA.** *Manual técnico de procedimientos para el registro y control de agentes de control biológico, extractos vegetales, preparados minerales, semioquímicos y productos afines de uso agrícola.* Ministerio de agricultura y ganadería república del Ecuador. Ecuador: Edit Andes, [en línea], 2019, p.56. [Consulta: 13 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/cc2.pdf>

**PALMIERI, Luisa, et al.** Genotype-by-environment effect on bioactive compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). [en línea], 2017, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 97, no 12, p. 4180-4189. [Consulta: 06 Julio 2021]. Disponible en: DOI: 10.1002/jsfa.8290

**MUHIALDIN, Belal J.; HASSAN, Zaiton; SAARI, Nazamid.** *In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products.* *Annals of Microbiology*, [en línea], 2018, vol. 68, no 9, p. 557-567. [Consulta: 17 enero 2023]. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201800285296>

**NASROLLAHZADEH, Ahmad, et al.** *Antifungal preservation of food by lactic acid bacteria.* *Foods*, [en línea], 2022, vol. 11, no 3, p. 395. [Consulta: 02 febrero 2023]. Disponible en: doi: 10.3390/foods11030395

**NOWICKA, Agnieszka, et al.** *Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria x ananassa* Duch.* *Food chemistry*, [en línea], 2019, vol. 270, p. 32-46. [Consulta: 04 agosto 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.015>

**OLIVEIRA FILHO, Josemar Gonçalves de, et al.** *Chemical composition and antifungal activity of essential oils and their combinations against *Botrytis cinerea* in strawberries.* *Journal of Food Measurement and Characterization*, [en línea], 2021 vol. 15, p. 1815-1825. [Consulta: 15 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00765-x>

**OZCAN, Mehmet Musa; HACISEFEROĞULLARI, Haydar.** *The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: chemical composition, physical properties and mineral contents.* *Journal of Food*

Engineering, [en línea], 2007, vol. 78, no 3, p. 1022-1028. [Consulta: 15 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.014>

**PETRASCH, Stefan, et al.** *Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen Botrytis cinerea.* [en línea], 2019, Molecular plant pathology, [en línea], 2019, vol. 20, no 6, p. 877-892. [Consulta: 15 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>

**PRASAD, Raghavendra; LISIECKA, Jolanta; RAJ, Kavana.** *Strawberry–More than a Popular Summer Fruit: A Mini-Review.* Adv in Nutri and Food Sci: ANAFS, [en línea], 2022, vol. 2, n°8, (USA) pp. 1-6. [Consulta: 05 enero 2023]. Disponible en: DOI: 10.37722/ANAFS.2022201

**PREETHA, S. S.; NARAYANAN, Rita.** *Factors influencing the development of microbes in food.* Shanlax International Journal of Arts, Science and Humanities, [en línea], 2020, vol. 7, no 3, p. 57-77. [Consulta: 20 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.34293/sijash.v7i3.473>

**QIAN, Le, et al.** *Toxic effects of boscalid on the growth, photosynthesis, antioxidant system and metabolism of Chlorella vulgaris.* Environmental pollution, [en línea], 2018, vol. 242, p. 171-181. [Consulta: 23 noviembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.055>

**QUINTERO, Melvys Jacqueline Vega.** *Bacterias del ácido láctico un potencial para la producción de alimentos probióticos fermentados en la industria láctea de Panamá.* [en línea], 2018, KnE Engineering, [en línea], 2018, p. 38-47[Consulta: 26 junio 2022]. Disponible en: DOI: 10.18502/keg.v3i1.1411

**RAJ, Rahul; COSGUN, Akansel; KULIĆ, Dana.** *Strawberry Water Content Estimation and Ripeness Classification Using Hyperspectral Sensing.* Agronomy, [en línea], 2022, vol. 12, no 2, p. 425. [Consulta: 05 agosto 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/agronomy12020425>

**RAMÍREZ-LÓPEZ, C.; VÉLEZ-RUIZ, J. F.** *Isolation, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat milk and fresh artisanal-goat cheese.* Inf. Tecnol, [en línea], 2016, vol. 27, no 6. [Consulta: 25 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>

**REINER, Karen.** *Catalase test protocol*. American society for microbiology, [en línea], 2010, p. 1-6. [Consulta: 28 diciembre 2021]. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf>

**RIOLO, Mario, et al.** *Antifungal activity of selected lactic acid bacteria from olive drupes*. Food Bioscience, [en línea], 2023, p. 102422. [Consulta: 25 febrero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102422>

**ROMANAZZI, Gianfranco; FELIZIANI, Erica.** *Botrytis cinerea (gray mold)*. En Postharvest decay. Academic Press, [en línea], 2014, p. 131-146. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>

**RAMO, Sari; KAHALA, Minna; JOUTSJOKI, Vesa.** *Aflatoxin B1 Binding by Lactic Acid Bacteria in Protein-Rich Plant Material Fermentation*. Applied Sciences [en línea], 2022(Finland)12 (24), pp. 12769. [Consulta: 07 septiembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/app122412769>

**ROSAS-QUIJANO, Raymundo, et al.** “Capacidad antifúngica de biopelículas de quitosán conteniendo bacterias ácido lácticas” *Journal of Negative and No Positive Results*, [en línea], 2020, vol. 5, no 10, p. 1071-1096. [Consulta: 14 noviembre 2021]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.19230/jonnpr.3545>

**SADIQ, Faizan Ahmed, et al.** *Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, [en línea], 2019, vol. 18, no 5, p. 1403-1436. [Consulta: 25 enero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>

**SAPEI, Lanny; HWA, Lie.** *Study on the kinetics of vitamin C degradation in fresh strawberry juices*. Procedia Chemistry, [en línea], 2014, vol. 9, p. 62-68. [Consulta: 20 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.008>

**SANTOS, Newton Carlos, et al.** *Influence of ethanol and ultrasound on drying, bioactive compounds, and antioxidant activity of strawberries (Fragaria × ananassa)*. *Journal of the Indian Chemical Society*, [en línea], 2022, vol. 99, no 7, p. 100542. [Consulta: 24 agosto 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100542>

**SAVADOGO, Aly, et al.** *Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview*. African journal of biotechnology, [en línea], 2006, vol. 5, no 9. [Consulta: 04 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/42771>

**SHIELDS, Patricia; CATHCART, Laura.** *Oxidase test protocol*. American Society for Microbiology, [en línea], 2010, p. 1-9. [Consulta: 21 abril 2022]. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf>

**SHABANA, Y. M.; AHMED, Al-Zahraa E.; SOBHY, Mohamed.** *Sensitivity of Botrytis cinerea Isolates Collected from Strawberry to SDHI Fungicide Boscalid*. Journal of Plant Protection and Pathology, [en línea], 2022, vol. 13, no 9, p. 221-224. [Consulta: 23 junio 2022]. Disponible en: DOI: 10.21608/jppp.2022.161968.1093

**TARAZONA ROCH, Andrea.** Estudio de la actividad actividad antioxidante y antiinflamatoria de la fresa (*Fragaria× ananassa*) y su relación con la composición en compuestos bioactivos. (Trabajo de titulación) (Maestría) [en línea] Universitat Politècnica de Valencia, Valencia. 2020. pp. 6-17. [Consulta: 18 febrero 2021]. Disponible en: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/158038/Tarazona%20-%20Estudio%20de%20la%20actividad%20actividad%20antioxidante%20y%20antiinflamatoria%20de%20la%20fresa%20\(Fragari...pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/158038/Tarazona%20-%20Estudio%20de%20la%20actividad%20actividad%20antioxidante%20y%20antiinflamatoria%20de%20la%20fresa%20(Fragari...pdf?sequence=1)

**TAYE, Yeshambel, et al.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. The Scientific World Journal, [en línea], 2021. vol. 2021. [Consulta: 05 diciembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/4697445>

**TERRONES-SALGADO, José, et al.** *Botrytis cinerea causante del moho gris en frutos de zarzamora en México*. Revista mexicana de fitopatología, [en línea], 2019, vol. 37, no 3, p. 365-382. [Consulta: 03 febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>

**VAGELAS, I., et al.** Biological control of Botrytis fruit rot (gray mold) on strawberry and red pepper fruits by olive oil mill wastewater. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, [en línea], 2009, vol. 23, no 4, p. 1489-1491. [Consulta: 28 noviembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.2478/V10133-009-0017-3>

**VANTI, Gulamnabi L.; LESHEM, Yehoram; MASAPHY, Segula.** *Resistance response enhancement and reduction of Botrytis cinerea infection in strawberry fruit by Morchella conica*

mycelial extract. *Postharvest Biology and Technology*, [en línea], 2021, vol. 175, p. 111470. [Consulta: 07 septiembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111470>

**VIRDIS, Carla, et al.** *Lactic acid bacteria in wine: Technological advances and evaluation of their functional role*. *Frontiers in microbiology*, [en línea], 2021, vol. 11, p. 612118. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: DOI: 10.3389/fmicb.2020.612118

**WANG, Fang, et al.** *Biocontrol ability and action mechanism of Bacillus halotolerans against Botrytis cinerea causing grey mould in postharvest strawberry fruit*. *Postharvest Biology and Technology*, [en línea], 2021, vol. 174, p. 111456. [Consulta: 19 enero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111456>

**WILLIAMSON, Brian, et al.** *Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease*. *Molecular plant pathology*, [en línea], 2007, vol. 8, no 5, p. 561-580. [Consulta: 28 abril 2022]. Disponible en: DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x

**WANG, F., XIAO, J., ZHANG, &, LI, R., LIU, L., & DENG, J.,** *Biocontrol ability and action mechanism of Bacillus halotolerans against Botrytis cinerea causing grey mould in postharvest strawberry fruit*. *Postharvest Biology and Technology*, [en línea], 2020, vol 174, 111456. [Consulta: 28 diciembre 2022]. Disponible en: [Doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111456](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111456).

**WANG, Jianfei, et al.** *Parametric optimization and kinetic study of l-lactic acid production by homologous batch fermentation of Lactobacillus pentosus cells*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, [en línea], 2021, vol. 68, no 4, p. 809-822. [Consulta: 23 diciembre 2021]. Disponible en: DOI: 10.1002/bab.1994

**YOON, Yeong-Seok, et al.** *Assessment of changes in microbiological, physicochemical, and sensory qualities of  $\gamma$ -irradiated strawberries (*Fragaria  $\times$  ananassa* Duch. "Maehyang") during storage*. *Journal of Food Processing and Preservation*, [en línea], 2022, vol. 46, no 7, p. 166 [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16618>



## ANEXOS

### ANEXO A: MUESTREO DE LA FRESA ALBIÓN


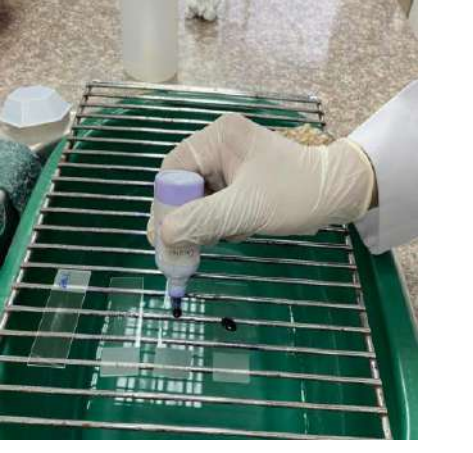
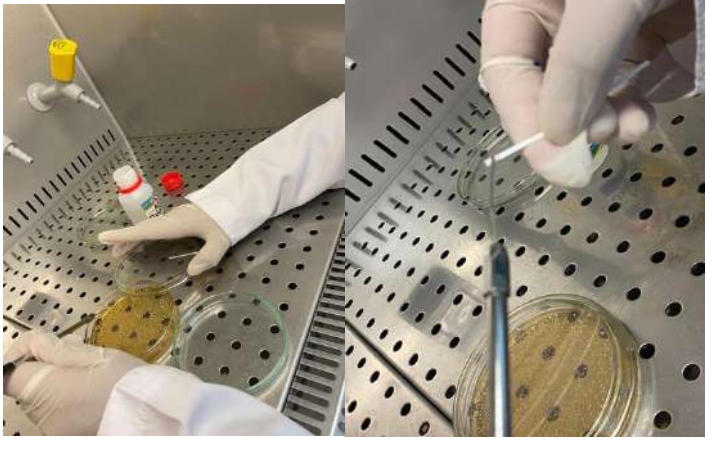
| Localización del punto de muestreo  | Muestreo en medios estériles   |
|---|--|
|  |  |



## ANEXO B: REVITALIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS DE QUINUA

| Crioviales de Bacterias ácido lácticas  | Revitalización en medio MRS caldo  | Técnica de siembra por estría   |
|---|--|---|
|  |  |  |

## ANEXO C: PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

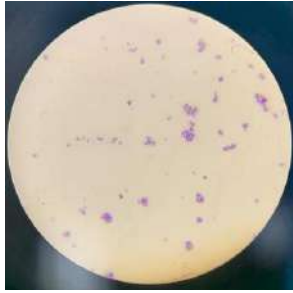
| Identificación Macroscópica  | Tinción Gram  | Ensayo Catalasa y Oxidasa  |
|--|---|--|
|  |  |  |



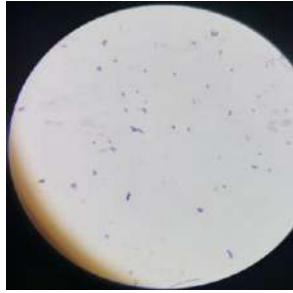
**ANEXO D: PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS**

| <b>ó<br/>digo</b> | <b>Tamaño</b> | <b>Forma</b>       | <b>Color</b> | <b>Borde</b>          | <b>Olor</b> | <b>Superficie</b> | <b>Consistencia</b> | <b>Aspecto</b> |
|-------------------|---------------|--------------------|--------------|-----------------------|-------------|-------------------|---------------------|----------------|
| QBAL 1            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 2            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 3            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 4            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 5            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 6            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Irregular<br>lobulado | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 7            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 8            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 9            | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 10           | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Irregular<br>lobulado | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 11           | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Irregular<br>lobulado | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 12           | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 13           | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |
| QBAL 14           | 0,1           | Elevada<br>convexa | Blanco       | Regular<br>Continua   | Láctico     | Lisa              | Blanda              | Cremoso        |

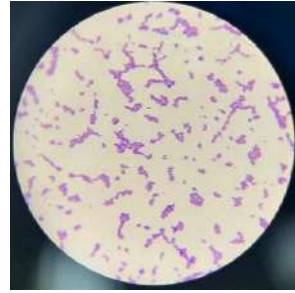
|         |     |                 |        |                    |         |      |        |         |
|---------|-----|-----------------|--------|--------------------|---------|------|--------|---------|
| QBAL 15 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 16 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 17 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 18 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 19 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 20 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 21 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Irregular lobulado | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 22 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 23 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 24 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Irregular lobulado | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 25 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 26 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 27 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 28 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 29 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |
| QBAL 30 | 0,1 | Elevada convexa | Blanco | Regular Continua   | Láctico | Lisa | Blanda | Cremoso |



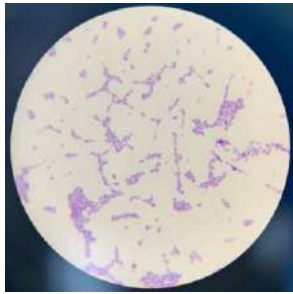
QBAL 1



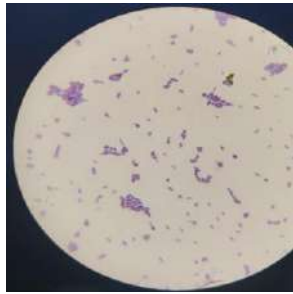
QBAL 2



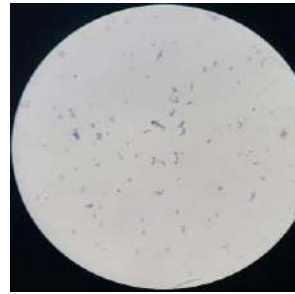
QBAL 3



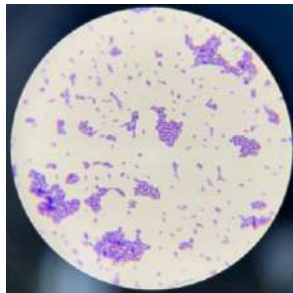
QBAL 4



QBAL 5



QBAL 6



QBAL 7



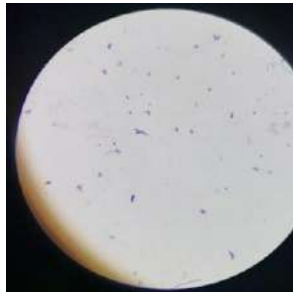
QBAL 8



QBAL 9



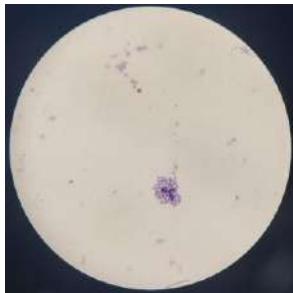
QBAL 10



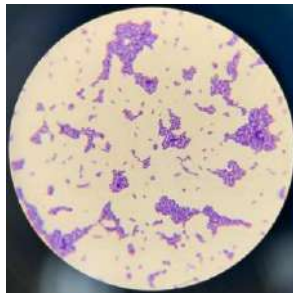
QBAL 11



QBAL 12



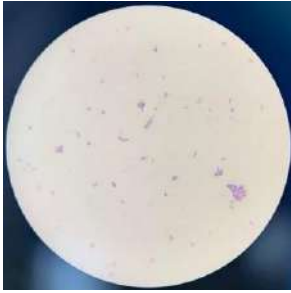
QBAL 13



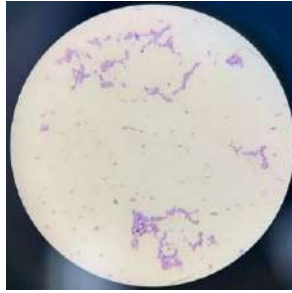
QBAL 14



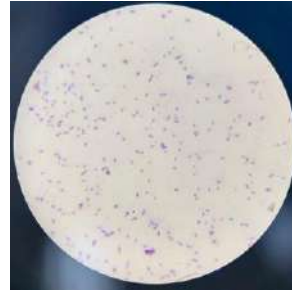
QBAL 15



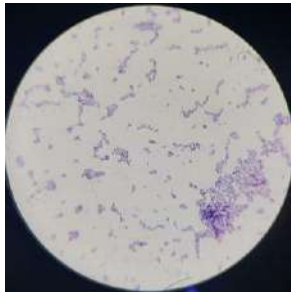
QBAL 16



QBAL 17



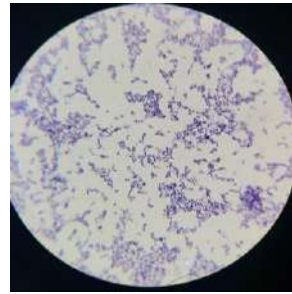
QBAL 18



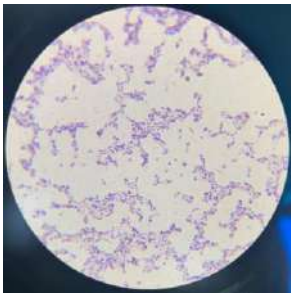
QBAL 19



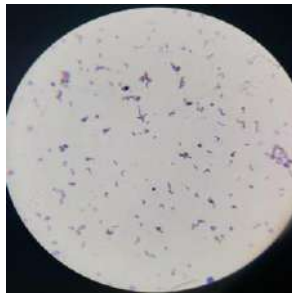
QBAL 20



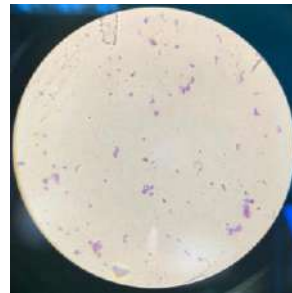
QBAL 21



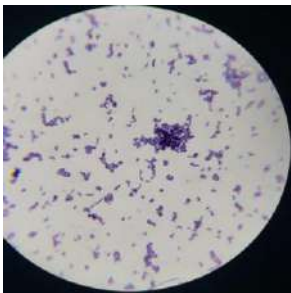
QBAL 22



QBAL 23



QBAL 24



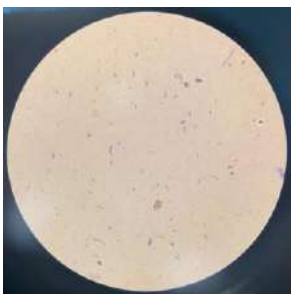
QBAL 25



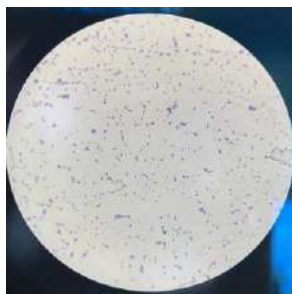
QBAL 26



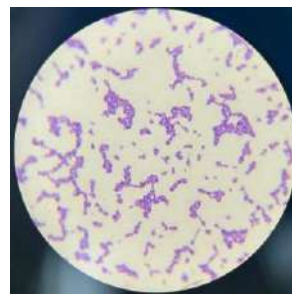
QBAL 27



QBAL 28



QBAL 29





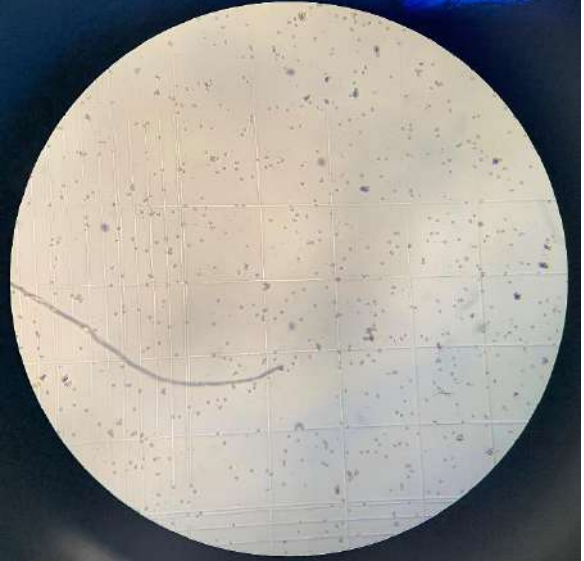
QBAL 30

**ANEXO E: PURIFICACIÓN DEL HONGO *BOTRYTIS CINEREA***

| <b>Identificación de <i>Botrytis cinerea</i> de la fresa</b>                       | <b>Aislamiento del hongo en medio PDA</b>  | <b>Purificación del hongo en medio PDA y MALTA</b>                                   |
|--|--|--|
|  |  |  |





**ANEXO F: CONTEO DE ESPORAS DEL HONGO AISLADO EN CÁMARA DE NEUBAUER**

| <b>Tubos con <i>Botrytis cinerea</i></b>   | <b>Dilución de la suspensión de esporas en 0.1 de peptona y 0,1% de tween 80</b>   | <b>Conteo en cámara de Neubauer <i>Botrytis cinerea</i></b>   |
|--|--|---|
|  Three test tubes with white caps containing suspensions of Botrytis cinerea. The leftmost tube shows a thick, white, fuzzy mass at the bottom. The middle tube shows a more uniform, cloudy suspension. The rightmost tube shows a clear, yellowish liquid with a small amount of white residue at the bottom. |  A glass bottle containing a clear liquid with a syringe inserted. A hand in a blue glove holds a small test tube containing a yellowish suspension, likely the spore suspension being diluted. |  A circular microscopic view of a Neubauer chamber showing a grid of small squares. Numerous small, dark, oval-shaped spores are visible, scattered across the grid. |

**ANEXO G: ENSAYO DE ANTAGONISMO DE LAS BAL SOBRE *BOTRYTIS CINEREA***




| <b>Siembra masiva de BAL</b>  | <b>Inoculación de solución stock de esporas en medio semisólido de extracto de malta</b>  | <b>Ensayo de antagonismo dual</b>   |
|---|---|---|
|  <p>A photograph showing a biosafety cabinet with a perforated metal work surface. On the surface, there are approximately 20 petri dishes arranged in a grid. Each dish contains a layer of yellowish agar medium. The dishes are placed on a metal tray with a grid pattern.</p> |   <p>Two photographs showing laboratory work in a biosafety cabinet. The top photograph shows a scientist wearing a white lab coat, blue gloves, and a blue hairnet, using a pipette to transfer liquid into small containers. The bottom photograph shows a metal rack containing several test tubes filled with a yellowish liquid, placed on a metal tray inside the biosafety cabinet.</p> |  <p>A photograph showing a biosafety cabinet with a perforated metal work surface. On the surface, there are approximately 20 petri dishes arranged in a grid. Each dish contains a layer of yellowish agar medium. The dishes are placed on a metal tray with a grid pattern.</p> |

**ANEXO H: ENSAYO DE ANTAGONISMO DUAL**

| <b>Ensayo de antagonismo dual Medio Malta</b>  | <b>Ensayo de antagonismo dual agar PDA</b>   |
|--|--|
|  <p>A grid of 35 petri dishes arranged in 5 rows and 7 columns. Each dish contains a dark, semi-transparent agar medium. The dishes show varying degrees of bacterial growth, with some showing clear zones of inhibition or distinct patterns of growth, indicating dual antagonism between the two strains.</p> |  <p>A grid of 35 petri dishes arranged in 4 rows and 9 columns. The dishes contain a white, semi-transparent agar medium. The growth patterns are similar to the Maltese medium, showing zones of inhibition and distinct growth patterns, demonstrating dual antagonism between the two strains.</p> |



**ANEXO I: PRODUCTO COMERCIAL, BOSCALID: 3-PIRIDINCARBOXAMIDA Y PREPARACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES**

| <b>Producto comercial BOSCALID: 3-PIRIDINCARBOXAMIDA</b>                          | <b>Preparación de diluciones de 3-piridincarboxamida a diferentes concentraciones</b> | <b>Siembra del Químico</b>   |
|---|---|--|
|  |     |  |

**ANEXO J: ANTAGONISMO DE CONTROL POSITIVO, BOSCALID: 3-PIRIDINCARBOXAMIDA Y BLANCO DE *BOTRYTIS CINEREA***




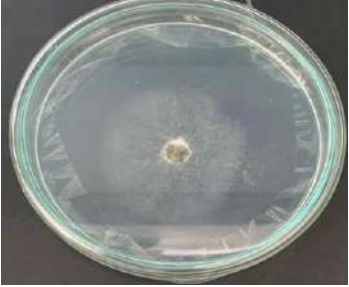
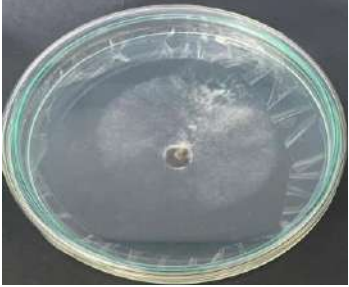


**Siembra masiva del Químico**



**Ensayo de antagonismo dual**




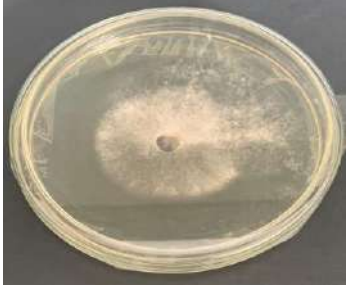
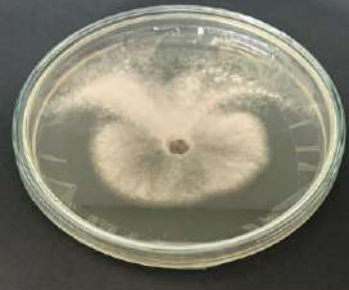




**ANEXO K: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *BOTRYTIS CINEREA* EN PDA MEDIANTE MEDICIÓN DIARIA DE MICELIO**

| Día 1   | Día 2  | Día 3   |
|---|--|---|
|    |  |  |
| Día 4   | Día 5  | Día 6   |
|    |  |  |
| Día 7   |  |   |
|  |  |   |



**ANEXO L: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *BOTRYTIS CINEREA* EN AGAR MALTA MEDIANTE MEDICIÓN DE MICELIO**

| Día 1   | Día 2  | Día 3   |
|---|--|---|
|    |  |  |
| Día 4   | Día 5  | Día 6   |
|    |  |  |
| Día 7   |  |   |
|  |  |   |

**ANEXO M: BANCO DE CEPAS DE BAL DE QUINUA CRIO PRESERVADAS EN GLICEROL AL 30%**

**BANCO DE CEPAS DE BAL DE QUINUA**



**ANEXO N: EXTRACCIÓN DE SOBRENADANTES DE BAL SOBRE *BOTRYTIS CINEREA***

**Incubación de BAL en Shaker Incubadora**




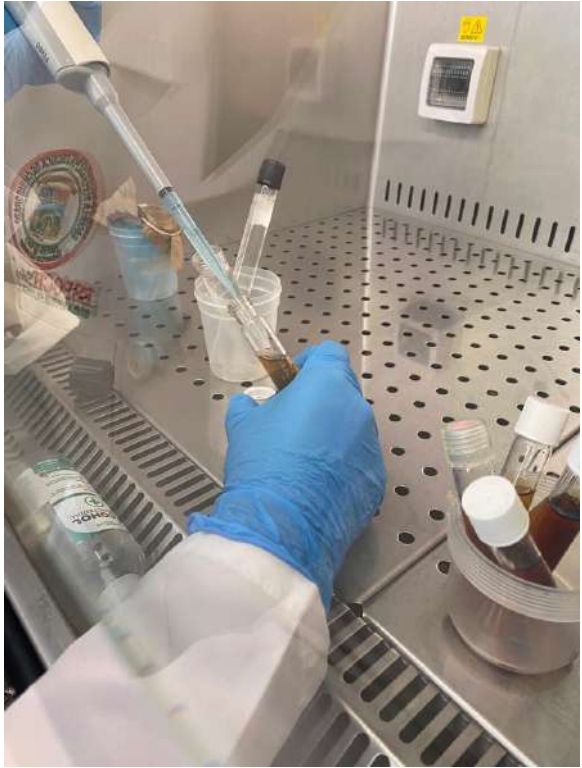
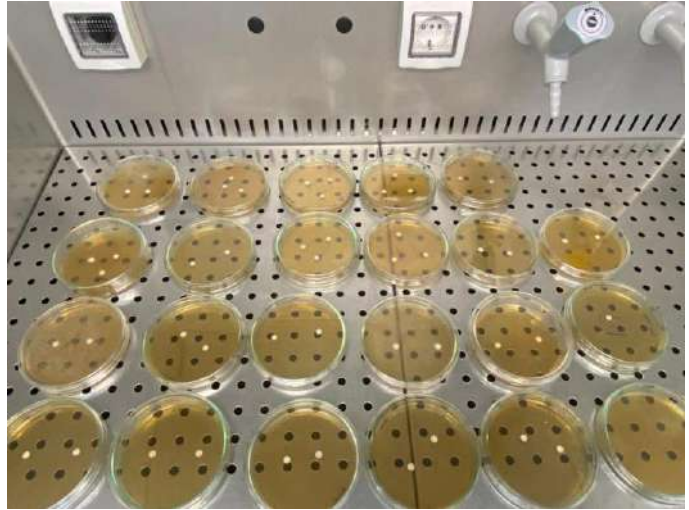
**Centrifugación de BAL**



**Filtración de sobrenadante de BAL**



**ANEXO O: ANTAGONISMO DE SOBRENADANTES DE BAL SOBRE *BOTRYTIS CINEREA***

| <b>Inoculación de sobrenadantes en Agar MRS</b>                                    | <b>Solución stock de esporas</b>  | <b>antagonismo sobrenadante de BAL</b>  |
|--|---|---|
|  |  |  |



**ANEXO P: PRUEBA IN VIVO DE FRESA CON BAL SOBRE *BOTRYTIS CINEREA***

QBAL 1



QBAL 2



QBAL 3



QBAL 4



QBAL 5



QBAL 6



QBAL 7



QBAL 8



QBAL 9

QBAL 10

QBAL 11

QBAL 12





QBAL 13



QBAL 14



QBAL 15



QBAL 16



QBAL 17



QBAL 18



QBAL 19



QBAL 20



QBAL 21



QBAL 22



QBAL 23



QBAL 24



QBAL 25



QBAL 26



QBAL 27



QBAL 28



QBAL 29



QBAL 30






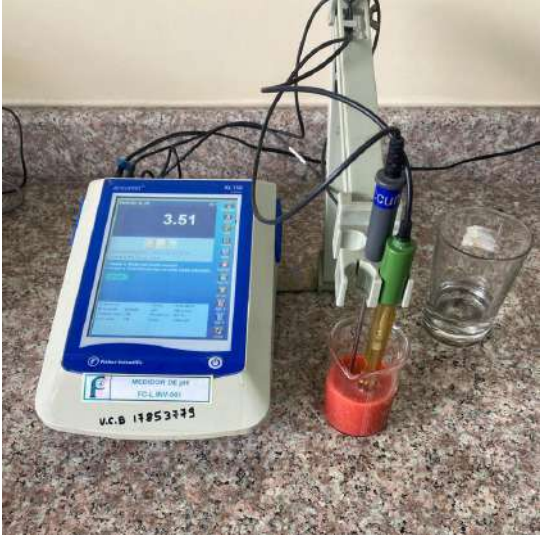

3-piridincarboxamida Si hay control inhibitorio



3-piridincarboxamida Si hay control inhibitorio



ANEXO Q: ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA

| Humedad   | pH   | Estructuras Biológicas  |
|---|--|---|
|  |  |  |

## ANEXO R: ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA









INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
 ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA  
 DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD  
 LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS  
 Panamericana Sur Km. 1. CutuglaguaTlfs. 2690691-3007134. Fax 3007134  
 Casilla postal 17-01-340



INFORME DE ENSAYO No: 22-0126

| ANÁLISIS   | HUMEDAD         | VITAMINA C      | AZÚCARES TOT.Ω | **IDENTIFICACIÓN            |
|------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| MÉTODO     | MO-LSAIA-01.01  | MO-LSAIA-10     | MO-LSAIA-21    |                             |
| METODO REF | U. FLORIDA 1970 | Reflectométrico | DUBOIS 1956    |                             |
| UNIDAD     | %               | mg Vit.C/ g     | %              |                             |
| 22-0647    | 88,28           | 5,28            | 43,13          | Fresas Intactas             |
| 22-0648    | 88,25           | 4,67            | 42,12          | fresas con Botrytis Cinerea |

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.

**OBSERVACIONES:** Muestra entregada por el cliente



Verónica Acaacchicoma para:  
 IVAN RODRIGO  
 SAMANIEGO  
 MAIGUA

Dr. Iván Samaniego, MSc.  
 RESPONSABLE TÉCNICO

RESPONSABLES DEL INFORME

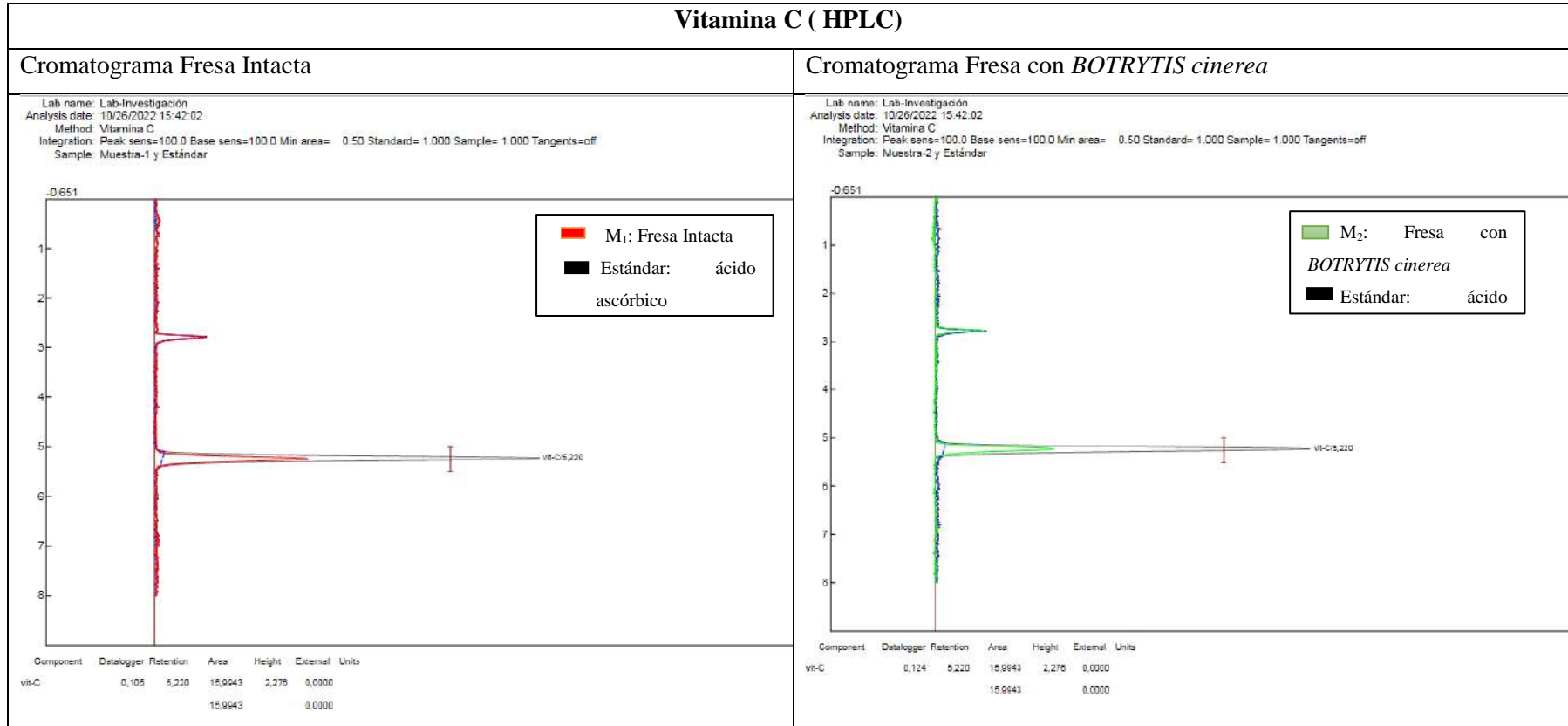


Verónica Acaacchicoma para:  
 VERÓNICA  
 ALEXANDRA ARIAS  
 BENITES

Quim. Verónica Arias  
 ANALISTA DE LABORATORIO



## ANEXO T: ANÁLISIS DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS INTRÍNSECOS DE LA FRESA



Realizado por: Escudero, Ligia; Pérez, Pablo, 2023.

## ANEXO U: ANÁLISIS MOLECULAR DE BAL Y HONGO



Av. De los Granados 114-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998562450  
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com  
R.U.C. 1713443479001

### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** identificación molecular de microorganismos – Lija Escudero  
**Informe No.:** A-359  
**Técnico Responsable:** Camila Gallegos, Ing.  
**Fecha:** 18/01/2023

### Resumen de Resultados

| Código IDgen | Muestra  | Longitud | Organismo  | Fragmento | % de Identidad | Nº Accesoión   |      |   |     |     |  |
|--------------|----------|----------|--|-----------|----------------|--|------|---|-----|-----|--|
| B532         | QBAL3    | 1489     | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | 165       | 100            | <a href="#">CP039121.1</a><br><a href="#">CP032757.1</a>   |      |   |     |     |  |
| B534         | QBAL5    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B535         | QBAL6    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B536         | QBAL7    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B538         | QBAL9    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B539         | QBAL10   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B540         | QBAL11   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B541         | QBAL12   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B543         | QBAL14   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B544         | QBAL15   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B545         | QBAL16   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B546         | QBAL17   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B548         | QBAL19   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B549         | QBAL20   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B554         | QBAL25   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B555         | QBAL26   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B542         | QBAL13   | 1497     | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus pentosus</i>  | 165       | 100            | <a href="#">CP039121.1</a><br><a href="#">CP032757.1</a>   |      |   |     |     |  |
| B547         | QBAL18   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B550         | QBAL21   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B553         | QBAL24   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B556         | QBAL27   | 1412     | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus pentosus</i><br><i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus pentosus</i> | 165       | 100            | <a href="#">CP039121.1</a><br><a href="#">MN328657.1</a><br><a href="#">MN328667.1</a><br><a href="#">KX805780.1</a><br><a href="#">CP035012.1</a><br><a href="#">CP039121.1</a><br><a href="#">CP039121.1</a><br><a href="#">CP032757.1</a> |      |   |     |     |  |
| B530         | QBAL1    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B531         | QBAL2    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B533         | QBAL4    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B537         | QBAL8    |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B551         | QBAL22   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B552         | QBAL23   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B557         | QBAL28   |          |  |           |                |  |      |   |     |     |  |
| B558         | QBAL29   |          |  |           |                |  | 908  | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>   | 165 | 100 | <a href="#">CP032757.1</a>                               |
| B559         | QBAL30   |          |  |           |                |  | 1432 | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i><br><i>Lactiplantibacillus pentosus</i> | 165 | 100 | <a href="#">CP039121.1</a><br><a href="#">CP032757.1</a> |
| H478         | Botrytis | 503      | <i>Botrytis fabae</i><br><i>Botrytis perlangii</i>   | 175       | 100            | <a href="#">MH855020.1</a><br><a href="#">6-0718296.1</a>  |      |   |     |     |  |

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.  
Propietario IDgen

Fuente: IDgen, 2023



esPOCH

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 17/04/2023

|  |
|--|
| <b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>   |
| <b>Nombres – Apellidos:</b> Ligia Liliana Escudero Vilema / Pablo Hernán Pérez Londo |
| <b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>   |
| <b>Facultad:</b> Ciencias  |
| <b>Carrera:</b> Química  |
| <b>Título a optar:</b> Química/o   |
| <b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo         |

