

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y
Alimentaria I



ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara

Biorefinerías avanzadas - 4D09A

**Pruebas in vivo de cepas de *Bacillus* con capacidad de biocontrol para *Fusarium sp.* en
planta de fresa *Fragaria anannassa***

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en biotecnología Monserrat de la Mora Fernández

Ing. en biotecnología Aime Estephania Pérez Martínez

Profesor PAP: Dr. Alejandro Arana Sánchez y Dr. Luis Eduardo Segura García

Tlaquepaque, Jalisco, mayo de 2022.

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	0
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	0
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	0
1.2 Caracterización de la organización.....	1
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	1
1.4 Planeación de alternativa(s).....	1
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	2
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	2
1.7. Bibliografía y otros recursos	2
1.8. Anexos generales.....	2
2. Productos	3
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	4
3.1 Sensibilización ante las realidades	4
3.2 Aprendizajes logrados	4

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

En caso de requerirse alguna adecuación al nombre de las fases propuestas para este componente, se puede realizar siempre y cuando sea complementario a lo ya establecido.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El biocontrol es un método de control biológico contra agentes patógenos que se desea utilizar para reemplazar a los métodos tradicionales que son perjudiciales para el ecosistema y la salud. En el presente trabajo se demostró el posible potencial de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* para ser utilizado como un agente antagonista ante un patógeno en plantas de fresa (*Fragaria anannassa*), presentando así un menor riesgo que los plaguicidas. Así como el uso de *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* fue perjudicial para el crecimiento de las plantas ya que presentó una tasa de muerte de las hojas o de la planta total. Esto se determinó con las pruebas de peso seco, volumen radicular y fijación de nitrógeno.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Las berries o frutos rojos son una serie de especies de frutos del bosque, biológicamente este nombre se otorga a los frutos generados a partir del ovario de una sola flor en la que la pared externa del mismo ovario se convierte en el pericarpio de la fruta, comunmente éstas no contienen hueso, sin embargo, pueden presentar semillas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2017).

En México, de acuerdo con estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), actualmente se cultiva un aproximado de 34 mil hectáreas de berries, con una producción estimada de alrededor de 900 mil toneladas al año, donde predomina en superficie la zarzamora, con un 45% de la superficie total, no obstante, la fresa es la que produce mayor volumen de producto (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2020) donde, a nivel internacional, la exportación de berries mexicanas contribuye con el 10.2% de las berries que se consumen a nivel mundial, posicionándose como el quinto productor de berries del mundo, debajo de China, Estados Unidos, Rusia y Polonia.

Actualmente los estados que encabezan la producción de estos frutos en México son Michoacán, Jalisco, Baja California y Guanajuato, donde se realiza más del 60% de la producción nacional, y Jalisco, tras aproximadamente 3 años desde la introducción de estos frutos a la agricultura mexicana, se posiciona como líder nacional en producción de berries, con una producción anual de 104 mil toneladas en 6,269 hectáreas según las cifras oficiales de la SIAP a 2021 (Gutiérrez, 2021).

Las plagas y enfermedades representan entre el 20 y 40% de las pérdidas en la producción de agricultura mundial general, el biocontrol, también conocido como control biológico, es una estrategia de manejo integrado para el control de diversas plagas y enfermedades que afectan a la agricultura, de manera simbiótica y respetuosa con el medio ambiente, con el propósito de disminuir la utilización excesiva de algunos agroquímicos, como pesticidas y plaguicidas nocivos, mediante el uso de organismos o metabolitos de éstos, que tengan capacidad de biocontrol (Zeriough, 2012).

Diversos tipos de microorganismos, tales como virus, hongos y bacterias con la capacidad de producción de reacciones metabólicas, bioquímicas o mecánicas que ayudan a la inhibición de un organismo patógeno han sido empleados como control biológico para la inhibición parcial o

total de enfermedades, dentro de los cuales destacan los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, debido a que son microorganismos versátiles, y sus estructuras permiten su almacenamiento y producción a temperatura ambiente (Pedraza, et al., 2020). El género *Bacillus*, perteneciente a la familia *Bacillaceae*, es una de las familias bacterianas reportadas en la literatura científica con mayor actividad bioquímica, son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram positivos con presencia de flagelos, y pueden sobrevivir en un pH de entre 5.5 y 8.5 y su capacidad biocontroladora está mediada por la producción de una serie de metabolitos antibióticos y antimicrobianos, mediante una serie de péptidos de síntesis ribosomal, policétidos (PK) y pequeñas moléculas peptídicas que afectan directamente a algunos fitopatógenos (Figura 1). Un ejemplo de esto es la Gramicidina S (GS), producto de la expresión de los genes GrsA y GrsB, con la función de traslocar los aminoácidos en las posiciones específicas dentro del pentapéptido en formación, lo que afecta a algunos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* (Layton, et al., 2011).

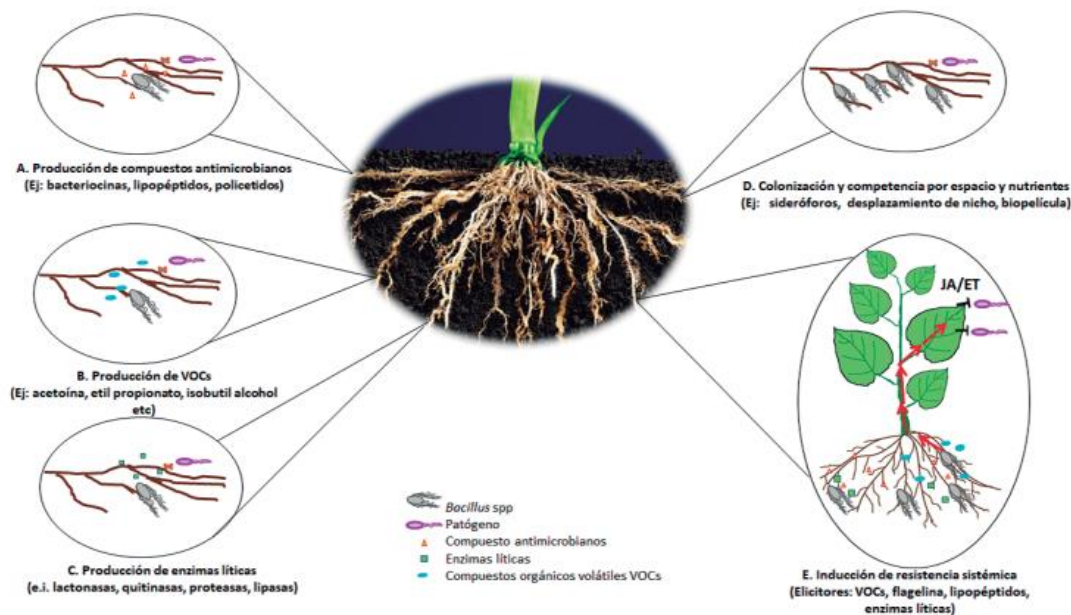


Figura 1. Mecanismos de biocontrol de cepas de *Bacillus* spp. contra microorganismos fitopatógenos en plantas (Pedraza, et al., 2020).

1.2 Caracterización de la organización o comunidad

La investigación en el ITESO se estructura a través de Programas Formales de Investigación (PFI). El PFI articula el conjunto de líneas y proyectos de investigación del departamento, así como su relación con las labores educativas y de vinculación de la propia dependencia. Procura, al mismo tiempo, la coordinación con las líneas y proyectos de investigación de otras dependencias de la universidad desde la perspectiva de la interdisciplinariedad.

El Programa Formal de Investigación del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales tiene como objetivo general el desarrollo de conocimiento teórico y práctico para la intelección y solución de problemas en torno al aprovechamiento de los recursos naturales y su impacto sobre el medio ambiente y las comunidades, particularmente en el occidente de México.

Sus líneas de investigación con respectivos objetivos son las siguientes:

1. Energía:

Desarrollar tecnología para el ahorro y uso eficiente de la energía en procesos productivos que se desarrollan en el occidente de México, empleando enfoques que van desde la organización y administración de procesos hasta el desarrollo de prototipos de equipos eficientes y ahorradores de energía. Desarrollar conocimiento aplicado y tecnología para el aprovechamiento de energías renovables en procesos donde puedan resultar económicas y oportunas y resolver problemas específicos de índole doméstica o productiva, rural o urbana en el occidente de México.

2. Alimentos:

Estudiar productos agropecuarios del occidente de México que potencialmente contengan sustancias bioactivas subutilizadas con el objeto de aprovecharlos integralmente. Diseñar y desarrollar alimentos funcionales que ayuden a prevenir enfermedades agudas y crónicas empleando microorganismos probióticos y sustancias nutracéuticas. Desarrollar procesos para el aprovechamiento secundario de materiales que actualmente son residuos de industrias alimentarias con el objeto de producir un mejor rendimiento económico y un menor impacto ambiental. Estudiar las cadenas de abastecimiento de los productos agropecuarios del occidente de México, desde su origen hasta su consumo final, y proponer alternativas factibles que ayuden a mejorar su rendimiento económico y disminuir su impacto ambiental.

3. Medio ambiente:

Mejorar el conocimiento sobre los servicios de ecosistemas en la región occidente de México y su relación con el bienestar y la salud humanos. Desarrollar y aplicar metodologías que permitan entender, cuantificar y prever cambios ambientales acumulativos resultantes de proyectos (planes o programas) hídricos, urbanos y energéticos. Desarrollar conocimiento aplicado, tecnología y herramientas de gestión para evitar, mitigar o compensar cambios en ecosistemas y sus impactos en comunidades vulnerables y generaciones futuras.

La presente investigación se desarrolla bajo el proyecto: Aislamiento e identificación de microorganismos con potencial para bio-control. Cuyo titular es el Dr. Alejandro Arana Sánchez y tiene como objetivo general obtener levaduras de procesos fermentativos artesanales y cultivos de la región, cuyos metabolismos estén orientados a la producción de metabolitos con potencial para el biocontrol.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

El Estado de Jalisco es uno de los principales productores agrícolas con mayor impacto al producto interno bruto (PIB) de la República mexicana, siendo este el cuarto productor a nivel nacional de Fresa (Lagunes-Fortiz, *et al.* 2020). Esto es gracias que el Estado de Jalisco posee las condiciones necesarias para la producción, por ello se calculó que en todo el estado hay una superficie de siembra de 480 hectáreas; con un volumen total de producción de 16,461 toneladas, por lo que esto aporta un 4.3% de la participación nacional (Cih, *et al.* 2016).

La gran demanda de exportación que hay a nivel nacional ha requerido estándares de excelencia de calidad por parte de empresas grandes como Aneberries, Berrymex, Driscoll's, etc. Ellos se dedican a comercializar a nivel nacional e internacional por lo que garantizar la seguridad fitosanitaria es muy importante (Lagunes-Fortiz, *et al.* 2020), por ello se han buscado tecnologías de mejoramiento de la calidad de estos productos, por lo que el biocontrol ha sido la respuesta, teniendo una amplia categoría de organismos y

microorganismos filogenéticos, así como también mecanismos de inhibición de agentes patógenos en las plantas. Estos agentes antagónicos deben ser bien seleccionados para su uso como biopesticidas con respecto a las características y requisitos que se deben cumplir, como el no ser tóxicos para los humanos, plantas o animales, ser eficientes en el control del agente patógeno objetivo, el que sobrevivan en diferentes condiciones, que sean económicamente viables para su producción a gran escala, que su vida útil sea larga y con la compatibilidad de distintos pesticidas y/o fertilizantes (Fontana, *et al.* 2021).

El uso excesivo de los plaguicidas y agroquímicos genera consecuencias ya que se ha demostrado que existen peligros a largo plazo para el medio ambiente, por lo que en los Convenios de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) quedaron estrictamente prohibidos el uso de algunos de ellos. El uso de ellos ha contribuido a una crisis en la agricultura ya que ha dificultado la preservación del ecosistema, afectando la salud de los habitantes de las comunidades agrícolas, los recursos naturales que se encuentran en esta, así como el consumo de los productos. Por ello el artículo 2º del código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas (FAO, 1990), definió los plaguicidas como cualquier sustancia que previene, destruye o controla a cualquier plaga, así como vectores de enfermedades humanas o de animales, que se utiliza para combatir insectos, arácnidos y otro tipo de plagas en o sobre su cuerpo (del Puerto Rodríguez, *et al.* 2014).

1.4. Planeación de alternativa(s)

A partir de los resultados obtenidos en semestres pasados acerca de la capacidad de biocontrol en diversas cepas, se eligieron algunas de género *Bacillus* y se generó un diseño de experimentos para realizar una diversa serie de pruebas de forma *in vivo* su capacidad de biocontrol en un escenario preventivo y un escenario correctivo ante la plaga de *Fusarium oxysporum* en plantas de fresa *Fragaria ananassa*.

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

En el PAP de semestres pasados se realizó un aislamiento y caracterización de una diversa serie de microorganismos mediante las técnicas de PCR-RFLP y MALDI-TOF, con el propósito de encontrar y caracterizar microorganismos con potencial biocontrolador, en el PAP del semestre en curso se realizará una serie de pruebas *in vivo* para comprobar y experimentar su acción en el biocontrol preventivo y correctivo ante la presencia de un hongo infeccioso para la planta de fresa *Fragaria anannassa*.

Adaptación de la planta

Inicialmente a las plántulas de fresa sufrieron de un shock por cambio de condiciones climáticas e insolación con una temperatura promedio de la primera semana de 28°C, hasta los 34°C de la última semana, debido a esto se ajustó el sistema de riego y se les cambió el sustrato a un suelo de tipo arenoso con capacidad de aireación, con presencia de material orgánico al cual se le ajustó el pH inicial de 7.82 a un pH de 6.67 con tierra de pH más ácido para cumplir con el rango de pH apto para plantas de fresa de entre 4.6 y 7 (Milosevic et al., 2009).

Medición de volumen radicular y densidad

A las plantas saludables se les tomaron medidas iniciales de diámetro y volumen radicular, considerando raíces de distintos tamaños, así como densidad de raíces mediante el uso de un vernier electrónico para conseguir el promedio de volumen y densidad de raíces en plantas saludables.

Peso seco

Posteriormente se realizaron pruebas de peso seco mediante el secado de hojas de diversos tamaños de cada una de las plantas para determinar su capacidad de retención de agua en condiciones normales, así como al finalizar las diversas pruebas mencionadas en la Figura 2 para obtener el dato de la afectación de las cepas en la absorción de agua y formar una relación con los cambios en el volumen radicular.

Concentración de nitrógeno en hojas

Con las muestras de peso seco se calculó la concentración en mg/L de nitrógeno presente en las hojas, esto se hizo realizando diluciones 1:2 con etanol al 96%, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos para separar el sobrenadante del pélet para tomar la muestra de la dilución, dichas muestras fueron medidas en el espectrofotómetro a 660 nm (Arango & Pérez, 2004).

Preparación de inóculos

Se realizó la reactivación gradual de crioviales de 4 distintas cepas de *Bacillus sp.* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloquefaciens* y *Bacillus pumilus*) para posteriormente inocular en cajas petri con medio sólido LB por duplicado y se dejó durante 48 horas a 37°C. A partir de la caja petri se realizó inoculó en matraces con medio LB líquido, se dejó 24 horas en la incubadora a 37°C con una agitación de 150 rpm, para conseguir una concentración celular de entre 100-1000 células/mm³ a partir del cual se prepararon todas las pruebas para lo que se inocularon 6 tubos de cada cepa, utilizando tubos falcon de 15mL con 10mL de medio LB y 100μL de inóculo y se repitió el proceso de incubación y conteo celular hasta que se consiguió una concentración promedio de 450 células/mm³. Este proceso se repitió pasadas dos semanas para obtener los inóculos de la segunda fase de pruebas.

Para la propagación de *Fussarium oxysporum* a partir de una muestra en caja petri con medio YPD sólido, se inoculó en medio YPD líquido para repetir el procedimiento antes mencionado, se incubó a 37°C durante 24h y se repitió el proceso para cada uno de los tubos falcon necesarios para las pruebas *in vivo* en tiempo cero y pasadas dos semanas.

Montado de vivero y pruebas in vivo

Se realizó el arado y limpieza del área, así como el montaje de un toldo para proveer sombra al espacio donde se montarán los viveros para las pruebas in vivo que seguirán el siguiente diseño de experimentos:

PRUEBA	Tipo	procedimiento
CONTROL	Cero	No se inoculó con ninguna cepa con potencial de biocontrol ni fitopatógeno para observar el crecimiento de una planta

		en condiciones saludables.
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Se inoculó con <i>Fusarium oxysporum</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo pasadas dos semanas.
	<i>Bacillus subtilis</i> (12)	Se inoculó con <i>Bacillus subtilis</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo pasadas dos semanas.
	<i>Bacillus megaterium</i> (10)	Se inoculó con <i>Bacillus megaterium</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo pasadas dos semanas.
	<i>Bacillus pumilus</i> (20)	Se inoculó con <i>Bacillus pumilus</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo pasadas dos semanas.
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (8)	Se inoculó con <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo pasadas dos semanas.
PREVENTIVA	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Fusarium sp.</i>	Se inoculó con <i>Bacillus subtilis</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> pasadas dos semanas.
	<i>Bacillus megaterium</i> + <i>Fusarium sp.</i>	Se inoculó con <i>Bacillus megaterium</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> pasadas dos semanas.
	<i>Bacillus pumilus</i> + <i>Fusarium sp.</i>	Se inoculó con <i>Bacillus pumilus</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> pasadas dos semanas.

CORRECTIVA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> + <i>Fusarium sp.</i>	Se inoculó con <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> pasadas dos semanas.
	<i>Fusarium sp.</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	Se inoculó con <i>Fusarium oxysporum</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Bacillus subtilis</i> pasadas dos semanas.
	<i>Fusarium sp.</i> + <i>Bacillus megaterium</i>	Se inoculó con <i>Fusarium oxysporum</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Bacillus megaterium</i> pasadas dos semanas.
	<i>Fusarium sp.</i> + <i>Bacillus pumilus</i>	Se inoculó con <i>Fusarium oxysporum</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Bacillus pumilus</i> pasadas dos semanas.
	<i>Fusarium sp.</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Se inoculó con <i>Fusarium oxysporum</i> en un tiempo cero y un segundo inóculo de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> pasadas dos semanas.

Figura 2. Clasificación de pruebas in vivo y descripción del proceso.

Posterior a la inoculación de las plantas con sus respectivas pruebas que se realizarán por triplicado, se realizará un muestreo periódico de hojas, se medirá que estas tengan aproximadamente el mismo tamaño, se cuantificará el peso fresco para llevar a peso seco y revisar las condiciones de absorción de agua, vista al microscopio y observación de características físicas de la planta en búsqueda de señales de afectación por la infección como lo son:

- En hojas en etapa senescente (1) el hongo se activa y produce una cubierta aterciopelada de micelio gris, así como lesiones de color café en los bordes de las hojas.
- Las flores sintomáticas muestran lesiones de color café en sus pétalos (2) y sépalos (3).
- Si el hongo afecta al pedúnculo (4) esto causará la marchitez y muerte de la flor y la fruta

en pleno estado de maduración.

- En la fruta madura se puede presentar una cubierta de esporas de color gris o blanquecino o como una marchitez causando frutos secos y duros de color oscuro en un patrón de anidación por áreas.



Figura 3. partes de la flor de fresa *Fragaria ananassa*.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

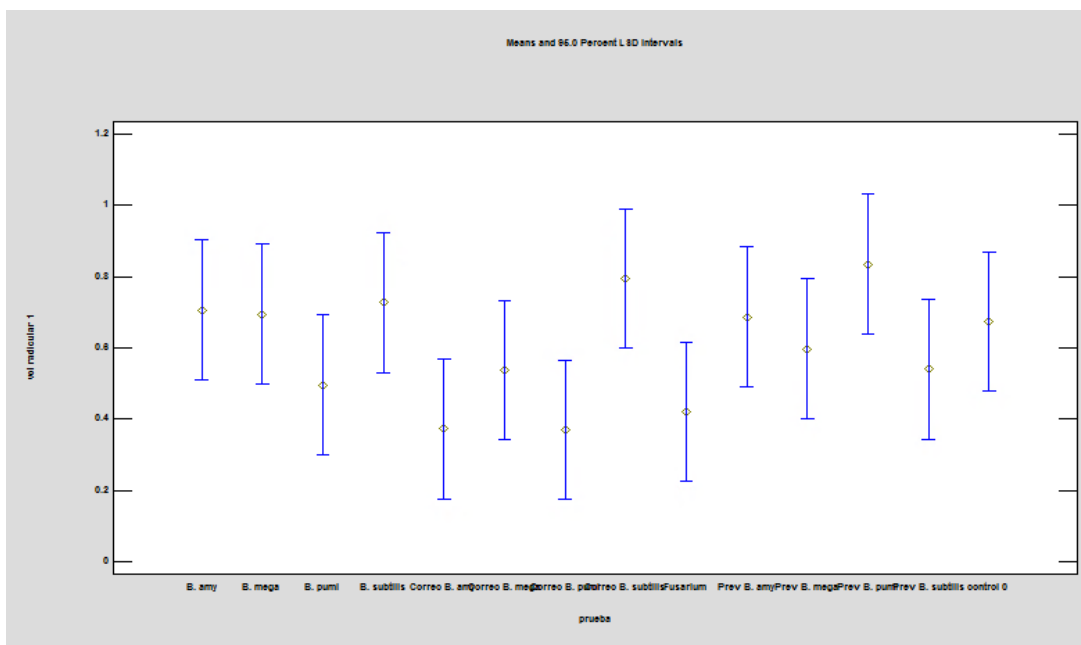


Figura 4. Comparación de los volúmenes radiculares al inicio y final de las pruebas *in vivo* con prueba Tuckey.

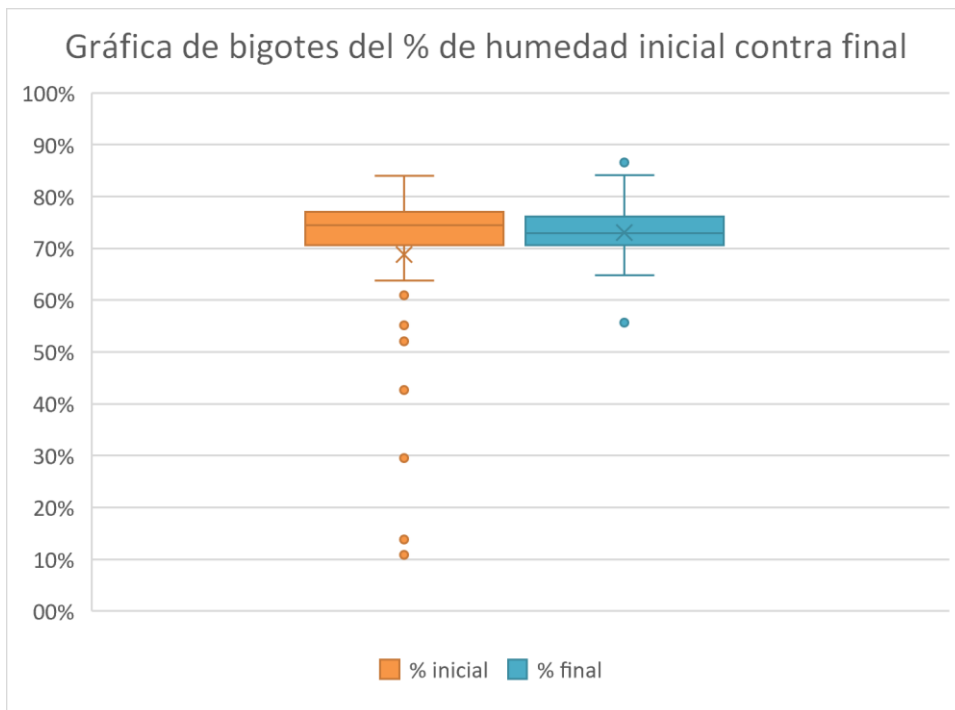


Figura 5. Comparación de los % de humedad en las hojas al inicio y final de las pruebas *in vivo*.

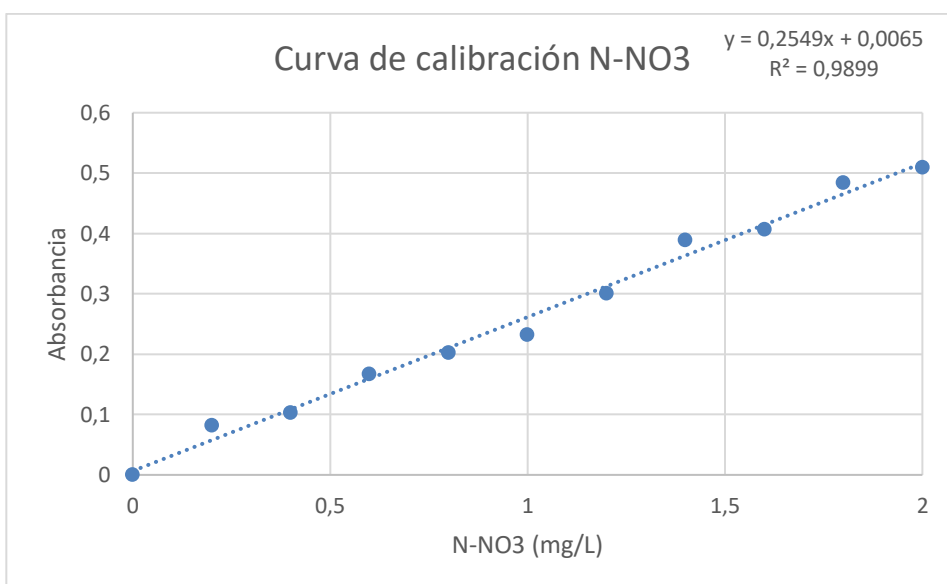


Figura 6. Curva de calibración de ión N-NO_3^- medido a 660 nm (Arango & Pérez, 2004).

#	prueba	Abs	prom abs	Concentracion (mg/L)
1	control 0	0.453	0.450	1.697
2		0.276		
3		0.622		
4	B. subtilis	0.585	0.450	1.695
5		0.415		
6		0.350		
51	B. mega	0.450	0.494	1.862
47		0.537		
44		0		
20	B. pumi	0	0.398	1.497
33		0.398		
18		0		
16	B. amy	0	0.462	1.741
17		0.281		
14		0.643		
25	Prev B. subtilis	0.245	0.385	1.446
26		0.703		
27		0.206		
11	Prev B. mega	0.276	0.632	2.392
12		1.092		
41		0.529		
19	Prev B. pumi	0	0.477	1.799
32		0		
38		0.477		
29	Prev B. amy	0	0.617	2.334
30		0.617		
31		0		
58	Correc B. subtilis	0	0.725	2.747
59		0.617		
60		0.833		
23	Correc B. mega	0	0.458	1.724
24		0.717		
43		0.198		
53	Correc B. pumi	0	0.362	1.359
54		0		
67		0.568		
61	Correc B. amy	0.413	0.476	1.793
62		0.538		
64		0		
65	Fusarium	0.343	0.345	1.294
66		0.394		
68		0.298		

Figura 7. Resultados de absorbancias para la captación de nitrógeno en las hojas medida a 660 nm de las pruebas *in vivo*. Se muestran de color rojo las plantas que se secaron por completo.

Como podemos observar a lo largo de las pruebas se pudo demostrar la eficiencia de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* como un posible agente de biocontrol, al contrario de *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloquefaciens* que fue perjudicial para la planta, ya que presentaron una disminución de volumen radicular, una disminución en la captación de nitrógeno (fig. 7),

señales de sequía y bajas en las plantas de forma más rápida incluso que los controles inoculados únicamente con *Fusarium oxysporum*. La prueba de volumen radicular (fig. 4) nos muestra que hubo una disminución del volumen en la mayoría de las plantas, esto se puede deber posiblemente también al estrés al que han estado sometidas las plántulas por el aumento de temperatura ambiental a la que han sido expuestas dado que las pruebas iniciaron a principios de marzo con un promedio de temperatura de 24°C y finalizaron a finales de mayo con promedios de temperatura de hasta 35°C, así como la exposición a diversos patógenos y crecimiento de plantas no identificadas a partir de semillas que se encontraban en el sustrato utilizado, lo que pudo haber afectado directamente a la capacidad de absorción de agua y oxigenación de las plantas, y por ende, el crecimiento general de las plantas.

Para la prueba de peso seco podemos observar en la figura 5 donde se muestra un gráfico de caja y bigotes, por lo que podemos analizar la población en dos distintas etapas, al principio del experimento y al final de él. Podemos observar cómo el tiempo cero tiene muchos más datos atípicos y esto se debe ya que fue la prueba inicial y todas las plantas estaban sanas, y a lo largo del proceso las plantas enfermas no podían ser evaluadas ya que no poseían hojas que nos dieran un resultado confiable porque se encontraban marchitas. Estos valores atípicos de la prueba t0 fluctuaron mucho también ya que fueron la aclimatación de las plantas al sustrato con el pH controlado y el sol alteraron las pruebas *in vivo*. La comparación entre los % de humedad es muy pequeña ya que la t0 va de 70%-74% y la t4 70%-76%, por lo que las hojas sanas tuvieron una humedad similar a lo largo del experimento.

Para la determinación de nitrógeno en plantas se realizó una curva de calibración mediante una dilución de concentración conocida de Nitrato de sodio, posteriormente se realizó un digesto de las hojas de cada una de las pruebas y se midió la absorbancia a 660nm, longitud de onda reportada para detectar los nitratos presentes, y se obtuvo un promedio de mg/L de nitratos en muestra, se realizó el cálculo de la concentración de nitrógeno que fue captado por las hojas con la curva de calibración que se muestra en la figura 6, utilizando la ecuación del gráfico $y = 0.2549x + 0.0065$, para el cálculo de concentración que se muestra en la figura 7, donde podemos ver que los controles (a excepción del control de *B. pumilus*) y las pruebas preventivas tienen una captación del nitrógeno en el sustrato mayor que las pruebas correctivas, y que el control *Fusarium oxysporum* y control, prueba correctiva y preventiva de *B. pumilus*

que presentó una muy baja captación del nitrógeno, puesto la planta se encontraba muy enferma. Se puede observar cómo tiene una mayor fijación de nitrógeno en las plantas inoculadas con *Bacillus megaterium* y *amyloquefaciens*. En el anexo se añadieron fotos de las plantas en tres etapas; inicial al momento del primero inóculo, media al pasar 15 días para observar los cambios ocurridos a partir del inóculo inicial y final donde podremos observar el cambio que presentaron a lo largo del experimento.

A partir de los datos obtenidos se puede llegar a la conclusión que la cepa con mejores resultados fue *Bacillus subtilis*, teniendo un volumen radicular casi constante durante todo el experimento y donde hubo pocas muertes de plantas inoculadas con dicha cepa, resultados positivos en la absorción de nitrógeno, así como una visible recuperación de las plantas en el tratamiento correctivo.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- Arango, G. & Pérez, J. C. (2004). DETERMINACIÓN DE NITRATOS EN MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE EL USO DE ELECTRODOS SELECTIVOS. Universidad Nacional de Colombia, 3840.
- Cih, I. R., Moreno, A. & Sandoval, J. A. (2016). La agricultura por contrato: Berries en Jalisco. ECORFAN.
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S. & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Rev Subana Hig Epidemiol, 52 (3).
- Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (2020) *Las Berries en México*. Recuperado el 11/03/2022 desde el sitio <https://acortar.link/oreHuG>
- Fontana, D. C., de Paula, S., Galon Torres, A., Moura de Souza, V. H., Pascholati, S. F., Schmidt, D. & Dourado Neto, D. (2021). Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. Pathogens, 10 (5), pp. 570.
- Gutiérrez, N. (2021) *Al cierre de 2020, Jalisco continúa creciendo en su producción de*

frambuesa. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado el 11/03/2022 desde el sitio <https://sader.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/3432>

- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. C., Sánchez, L. C. (2011) *Bacillus spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos*. NOVA; 9(16).
- Lagunes-Fortiz, E. R., Lagunes-Fortiz, E., Gómez-Gómez, A. A., Leos-Rodríguez, J. A. & Omaña-Silvestre, J. M. (2020). Competitividad y rentabilidad de la producción de frutillas en Jalisco. *Revista Mexicana Ciencia Agrícolas* 11 (8).
- Leifert, C., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H. & Harbour. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Jornal of Applied Microbiology*; 1995(78): 97-108.
- Milosevic, T. M., Milosevic, N. T., Glisic, I. P. (2009) Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) yield as affected by the soil pH. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 81, pp.265-269.
- Pedraza, L. A., López, C. E., Uribe-Vélez, (2020) *Mecanismos de acción de Bacillus spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatogénicos durante su interacción con plantas*. *Acta Biológica Colombiana*; 25 (1).
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (2017) *Berries, frutillas, frutos rojos, bayas mexicanas... entre lo común y lo biológico*. Recuperado el 11/03/2022 desde el sitio <https://acortar.link/D6fsQ>
- Zeriyough, H. (2012) *Mecanismos de acción y determinantes bacterianos implicados en la actividad de biocontrol de bacillus*. Universidad de Málaga. España.

1.8. Anexos generales

#	tipo de prueba	% humedad inicial	% humedad final	diferencia	vol radicular 1	vol radicular 2	diferencia	densidad radicular 1	densidad radicular 2	diferencia
1	control 0	74.3%	70.6%	-3.7%	0.49	0.6467	32%	48.9	52.65	8%
2		74.5%	65.7%	-8.8%	0.7	0.6833	-2%	55.87	48.13	-14%
3		72.5%	64.8%	-7.7%	0.8333	0.4267	-49%	53.35	47.28	-11%
4	control B. subtilis	73%	75%	1.2%	0.5933	0.3067	-48%	33.65	21.34	-37%
5		76%	71%	-5.8%	0.2567	0.45	75%	51.84	39.15	-24%
6		78%	73%	-5.1%	0.6367	0.3533	-45%	42.55	47.89	13%
51	control B. amyloquefaciens	76%	72%	-4.3%	0.5167	0.3533	-32%	58.46	22.34	-62%
47		77%	71%	-6.8%	1.1	0.5033	-54%	47.12	36.12	-23%
44		30%		-29.5%	0.5033	0.4967	-1%	36.23	42.27	17%
20	control B. pumilus	76%		-75.9%	0.3467	0.56	62%	36.21	35.34	-2%
33		72%		-71.6%	0.7167	0.2967	-59%	35.43	32.08	-9%
18		55%	71%	15.7%	0.5567	0.27	-51%	45.8	38.24	-17%
16	control B. megaterium	75%	77%	2.2%	0.3733	0.2633	-29%	55.04	29.78	-46%
17		11%		-10.9%	0.7867	0.43	-45%	47.57	30.24	-36%
14		14%	78%	64.6%	0.6333	0.5467	-14%	55.04	47.28	-14%
25	preventivo B. subtilis	75%	73%	-1.6%	1.0367	0.3533	-66%	41.15	32.46	-21%
26		74%	75%	0.8%	0.5133	0.5167	1%	48.9	57.89	18%
27		76%	71%	-4.2%	0.9567	0.59	-38%	30.78	52.14	69%
11	preventivo B. amyloquefaciens	72%	74%	1.4%	0.4233	0.5333	26%	58.95	59.11	0%
12		74%	84%	10.4%	0.5833	0.4967	-15%	40.98	43.24	6%
41		52%		-52.1%	1.0533	0.4833	-54%	54.2	54.78	1%
19	preventivo B. pumilus	77%	74%	-3.2%	0.49	0.2767	-44%	48.9	48.34	-1%
32		56%		-56.4%	0.8067	0.2467	-69%	47.14	26.18	-44%
38		43%	76%	33.2%	1.0867	0.2733	-75%	60.73	32.65	-46%
29	preventivo B. megaterium	83%	67%	-16.0%	0.3933	0.27	-31%	75.36	47.83	-37%
30		82%	70%	-12.6%	0.5867	0.3167	-46%	47.5	46.85	-1%
31		76%	76%	0.1%	0.6333	0.4433	-30%	26.81	48.34	80%
58	correctivo B. subtilis	61%		-60.9%	0.5033	0.3033	-40%	38.11	47.11	24%
59		77%	70%	-7.2%	0.24	0.6133	156%	27.67	63.74	130%
60		77%	76%	-0.8%	0.3667	0.4133	13%	52.66	43.46	-17%
23	correctivo B. amyloquefaciens	72%	74%	1.7%	0.4767	0.55	15%	44.33	42.54	-4%
24		78%	75%	-3.5%	0.6433	0.5133	-20%	48.11	48.47	1%
43		72%		-72.4%	0.6913	0.5667	-18%	22.34	21.49	-4%
53	correctivo B. pumilus	70%		-70.5%	0.4167	0.5567	34%	53.82	46.73	-13%
54		84%	69%	-15.4%	0.3933	0.4067	3%	62.31	68.32	10%
67		80%		-79.8%	0.4533	0.4133	-9%	56.27	74.38	32%
61	correctivo B. megaterium	81%	80%	-0.8%	0.51	0.4867	-5%	22.49	18.19	-19%
62		64%	87%	22.7%	0.3967	0.4133	4%	66.24	62.35	-6%
64		75%		-75.0%	0.2867	0.4367	52%	28.24	42.95	52%
65	control Fusarium oxysporum	74%	72%	-2.7%	0.5267	0.4933	-6%	47.63	21.34	-55%
66		71%	56%	-14.9%	0.6967	0.3067	-56%	43.97	39.15	-11%
68		82%	79%	-2.9%	0.5233	0.45	-14%	30.97	47.89	55%

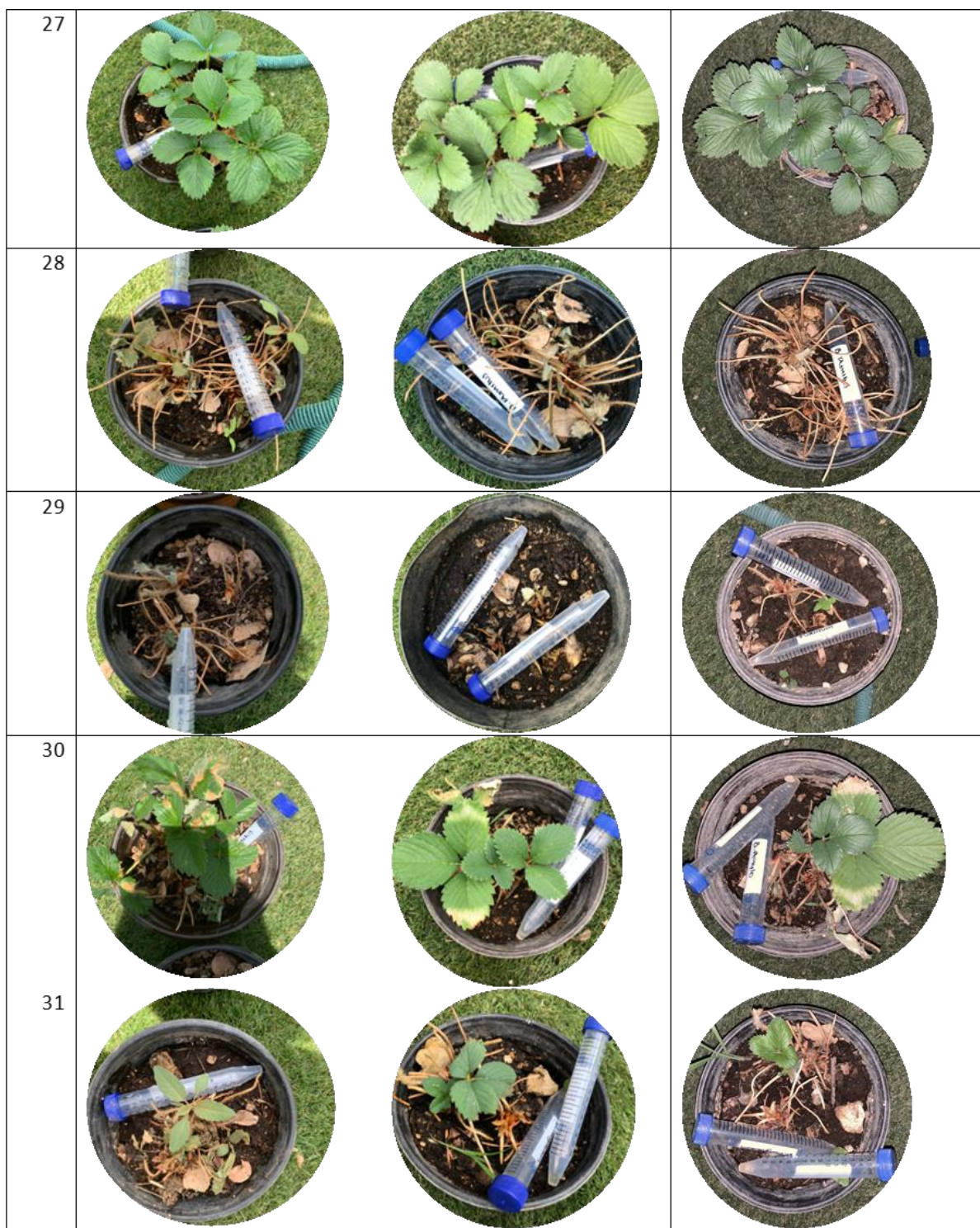
Figura 8. Resultados de peso seco y volumen radicular en distintas pruebas *in vivo*. Se muestran de color rojo las plantas que se secaron por completo.

	t0	t1	tf
1			
			
			
4			
5			

6			
13			
14			
15			
16			

17			
18			
19			
20			
21			

22			
23			
24			
25			
26			



32			
33			
34			
35			
36			

37			
38			
39			
40			
41			

42			
43			
44			
45			
46			



Figura 9. Imágenes tomadas a las plantas participantes en las pruebas en un tiempo 0, pasados 15 días (segundo inóculo) y a los 30 días.

2. Productos

1. Reporte PAP

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Biorefinerías avanzadas - 4D09A
Nombre del producto:	Reporte PAP
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se realizó un reporte del Proyecto de Aplicación profesional detallando el proceso que se llevó a cabo para las pruebas <i>in vivo</i> de cepas con capacidad de biocontrol en plantas de fresa (<i>Fragaria anannassa</i>) así como los resultados obtenidos.
Autores:	Montserrat de la Mora Fernández Aimé Estephanía Pérez Martínez

2. pruebas *in vivo*

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Biorefinerías avanzadas - 4D09A
Nombre del producto:	Pruebas <i>in vivo</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se realizaron pruebas en 70 plantas de fresa (<i>Fragaria anannassa</i>) con 4 distintas cepas de <i>Bacillus sp.</i> contra el hongo <i>Fusarium oxysporum</i>

Autores:	Monserrat de la Mora Fernández Aimé Estephanía Pérez Martínez
----------	--

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización de las realidades

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

Aimé: Lo primero que llamó mi atención al adentrarme en la temática del biocontrol es el abuso de químicos en los suelos que se utilizan actualmente en la agricultura y cómo estos pueden llegar a afectar tanto a corto como largo plazo la salud de los agricultores que respiran y tocan éstos, la salud de los consumidores, así como al bioma en el que se encuentran estos cultivos y los suelos en los que residen. De igual manera mediante la investigación y algunas cuantas conversaciones directas con agricultores de berries nos pudimos dar cuenta de algunas de las plagas que más afectaban a estos cultivos, a la vez que nos pudimos percatar por nuestra propia experiencia de lo difícil que es mantener vivas a estas plantas tan delicadas, aun teniéndolas en condiciones controladas, esto llevado a una escala como lo es la cantidad de estos frutos que se produce cosecha a nivel de estado o a nivel nacional puede llegar a significar una gran pérdida, afectando a los agricultores, a pequeñas y grandes empresas exportadoras, así como comunidades adyacentes que se benefician de esta actividad económica. Por esto es necesario algunas de estas herramientas biológicas que se desarrollan en proyectos como el que se llevó a cabo para facilitar la agricultura sin llegar al abuso de agroquímicos que mencionaba previamente, y aprovechar la biotecnología para encontrar soluciones sustentables y económicas que puedan beneficiar a estos sectores de la población, e incluso fueron alumnos de la prepa ITESO acompañados de su maestra y el profesor de la

materia de Huerto y tuve la oportunidad de comentarles de la importancia de proyectos como el que se realizó.

Monse: Una de las mayores problemáticas que existe en Jalisco ya que es uno de los Estados con mayor producción en distintos cultivos, es el control de plagas. Por ello se han ideado muchos métodos para el control de ellas, pero el uso excesivo de productos químicos ha llegado a afectar, los suelos, agua, aire y nuestra salud, por ello la búsqueda de algún nuevo método que sea más amigable con el ecosistema y con nosotros mismos. Por ello el uso del biocontrol ha tenido mucho auge y puesto se ha demostrado el potencial que puede tener. Ya que a diferencia de los métodos tradicionales este no genera una amenaza, esto puede seguir siendo un debate ya que si puede presentar una alteración en el ecosistema por lo que se puede pensar como un método todavía en desarrollo. También al ser un PAP con varios equipos que trabajábamos en lo mismo pudimos compartir distintas técnicas o información aprendida a lo largo del proyecto, esto hizo que pudieramos comparar nuestros resultados en común. La ayuda de nuestros maestros fue fundamental ya que nos encaminaron en la visión que llevaba el proyecto así como la comunicación con el maestro Erick del huerto que nos extendió un lugar para poder tener las plantas y consejos que nos ayudaron mucho.

Para mi es muy importante el tema de la agricultura ya que es una actividad que se realiza en el país y genera muchos empleos por lo que buscar la manera de beneficiar a los pequeños y medianos productores es sumamente importante, con ayuda de nuevas tecnologías que puedan dar pauta a nuevos caminos para poder ayudar en distintos factores como también un problema latente que es la falta de agua.

3.2 Aprendizajes logrados

Aimé: A lo largo de este proyecto se pudieron lograr bastantes habilidades sociales como el contactar a diversas empresas y agricultores para conseguir proveedores, ya que por la temporada en la que se llevó a cabo este proyecto fue difícil conseguir plantas de fresa en etapa vegetativa y no reproductiva o productora de la planta, así como el reto extra del contacto en tiempos de pandemia por Covid. Se requirió trabajar con más equipos del mismo PAP en el mismo campus de ITESO, así como a distancia en el CUCBA y llegar a acuerdos, así como compartir conocimiento adquirido, comparación de algunos resultados que pudiesen ser de utilidad y

técnicas funcionales a lo largo del experimento, así como colaborar con el profesor encargado de la materia de Huerto y algunos expertos en plantas de fresas. También se logró aprender de jardinería puesto se trabajó directamente en el huerto que se encuentra dentro de las instalaciones de ITESO, se convivió con distintas especies de plantas y se compartió el espacio y la experiencia con algunos compañeros de la materia del huerto.

Montserrat: Las dificultades que se presentaron ayudaron a poder manejar el proyecto y ampliar nuestra capacidad de reacción ante las adversidades, como claro ejemplo está el aclimatamiento de las plantas, puesto se creyó que se habían muerto la mayoría de éstas y se logró adaptarlas al nuevo ambiente en el que se encontraban, como el cambio de sustrato y aprender y encontrar soluciones para satisfacer las necesidades de las plantas ante diversas condiciones de temperatura y sol. Otro reto fueron las vacaciones de semana santa en medio de las pruebas, lo que se reflejó en un segundo choque en el cambio de condiciones y el estar dispuestas a generar y cambiar metodologías ante las trabas que se presentaban a lo largo de la realización del proyecto. Este proyecto nos ayudó mucho a entender las plantas y como trabajar con ellas es difícil ya que hay muchas variables que las afectan el proceso de su crecimiento, por ello es importante el ser meticuloso en la manipulación de estas. Así como también poder transmitir lo dañino que son pesticidas para el control de plagas, por lo que el uso de una metodología más amigable para el ecosistema y el usuario es importante para la preservación de especies, microbiota, entre otras cosas.