

Informe Pasantía Capstone 2023

Estudio de factibilidad de una reformulación en la producción de metabolitos secundarios a partir de una cepa de *Bacillus velezensis* basado en la metodología de superficie de respuesta

Trinidad Toledo Echegaray
Ingeniería Civil en Bioingeniería
19.958.362-K
ttoledo@alumnos.uai.cl

Universidad Adolfo Ibañez
Santiago, Chile

Diciembre 2023

I. Resumen

La industria agrícola debe luchar constantemente para atacar la presencia de fitopatógenos en los cultivos, para ello se utilizan pesticidas sintéticos que han estado provocando daños a los suelos, generando la muerte de microorganismos benéficos y daños en la salud humana, debido al uso incorrecto de ellos. Como nueva alternativa se encuentra el uso de controladores biológicos para reemplazar a estos productos químicos con el fin de desarrollar una agricultura sostenible. En el presente estudio se utiliza una cepa de *Bacillus velezensis* para estudiar el potencial antifúngico que tienen sus metabolitos secundarios, para lo cual se modifican las concentraciones del medio de cultivo YPG a través de la metodología de superficie de respuesta, con el fin de obtener un entorno nutricional eficiente que permita obtener una concentración de lipopéptidos suficiente capaz de inhibir *Fusarium oxysporum*, *Cytospora spp.* y *Phytophthora cinnamomi*. Se obtuvo una reformulación del medio de cultivo que logra superar una inhibición del 40% en placa de los fitopatógenos, logrando además una escalabilidad a 500 ml en matraz y a un costo de producción reducido en aproximadamente un 60%, con miras a una futuro estudio de aplicación *in vivo* en frutas para comprobar su actividad antifúngica, así como pruebas en biorreactores de menor tamaño para estudiar nuevos volúmenes de escalabilidad.

Abstract

The agricultural industry is constantly challenged to combat the presence of phytopathogens in crops, and for this purpose, synthetic pesticides have been extensively used, which have caused damage to soils, the death of beneficial microorganisms, and adverse effects on human health due to their incorrect use. As a new alternative, biological control agents are being explored to replace these chemical products with the purpose of developing sustainable agriculture. In this study, a strain of *Bacillus velezensis* is used to investigate the potential antifungal activity of its secondary metabolites, for which the concentrations of the YPG medium are adjusted using the surface response method to obtain an efficient nutritional environment capable of inhibiting *Fusarium oxysporum*, *Cytospora spp.* and *Phytophthora cinnamomi* by achieving a sufficient concentration of lipopeptides. A reformulated growth medium is developed, which successfully overcomes a 40% inhibition of phytopathogens in petri dishes, achieving scalability to 500 ml in the flask and a reduced production cost by approximately 60%, with the aim of future *in vivo* studies on fruits to test their antifungal activity and tests in smaller bioreactors to study new volumes of scalability.

II. Introducción

La industria agrícola, a continuación del sector minero, representa una de las principales actividades económicas dentro de nuestro país [2], especialmente en la zona centro y sur de este [3, 4] donde cerca del 31% de las empresas nacionales forman parte de este mercado [5]. En cuanto a su contexto productivo, estudios de la ODEPA y cifras de la FAO indican que la producción mundial de hortalizas va en aumento a la vez que su consumo [13]. Esta se centra en la siembra de tomates como el principal cultivo con una producción de 180,8 millones de toneladas para el 2019, seguido de la siembra de cebollas y pepinos [14, 16]. A nivel nacional el enfoque está en los tomates con 763, 7 miles de toneladas para el 2019, choclo, cebollas y lechugas, ocupando casi el 50% de la superficie de siembra de hortalizas [1, 15, 16].

A raíz de esto mismo, las enfermedades por hongos fitopatógenos son una de las principales problemáticas que existen en la producción de este tipo de cultivos que se encuentran expuestas a condiciones ambientales [9] causando marchitamiento, debilidad y pudrición [9,11], lo que se traduce en grandes pérdidas en el campo y finalmente en pérdidas económicas. Un estudio asociado a la revista científica *Molecular Plant Pathology* indica los 10 principales hongos fitopatógenos de plantas [11]. Entre ellos se encuentra *Fusarium oxysporum*, quien cuenta con un amplio espectro de hospederos. Este patógeno se transmite a través del suelo, causando marchitez vascular y muerte en las plantas, a partir de la liberación de enzimas y toxinas que atacan directamente la raíz de la planta [11, 12] alcanzando una pérdida de rendimiento entre el 20-47% en las plantaciones de tomate [16], e incluso pudiendo causar infecciones en humanos inmunocomprometidos [11]. *F. oxysporum* se puede clasificar en más de 100 especies distintas, según el tipo de huésped en donde se esté alojando [12, 35], esto nos permite entender el nivel de adaptación y alcance que tiene el fitopatógeno. Por otro lado, también se encuentra *Botrytis cinerea* otro fitopatógeno importante presente en la postcosecha de varias plantaciones, manifestándose como moho gris en los frutos [20, 22] logrando infectar a más de 1400 especies y causando pérdidas económicas de hasta 100 mil millones de dólares a nivel mundial [21]. De igual manera, *Phytophthora cinnamomi*, con más de 190 especies, es un hongo que se puede transmitir por el suelo o el aire, capaz de afectar tanto a hortalizas como árboles desarrollados [24], además es el responsable de la enfermedad del tizón tardío en las papas [23] alcanzando pérdidas de hasta 2,75 billones anuales a nivel mundial [42] y de atacar múltiples cultivos como el tomate [25]. Para combatir este problema actualmente se utilizan

pesticidas sintéticos, los cuales generan graves consecuencias debido al mal uso de ellos, principalmente por su ineficiencia para disminuir el efecto del fitopatógeno ya que existe una cierta resistencia antimicrobiana a estos agroquímicos [16, 18] lo que ha llevado a un uso excesivo de concentraciones mal inoculadas en las plantaciones tratando de alcanzar el efecto deseado, provocando daños a los suelos, muerte de microorganismos benéficos y daños a la salud humana [10,17,20, 21].

Por otro lado, actualmente Chile se encuentra formando parte de la OCDE, de manera que las políticas públicas apuntan a un desarrollo basado en los ODS [6]. Bajo esta misma línea, el mundo agrícola se vincula con una de las metas específicas del ODS 2, donde se busca generar un sistema de producción de alimentos que sea sustentable y sostenible, que permita mantener el cuidado de los ecosistemas, fortaleciendo la capacidad de adaptación al cambio climático [7]. Por lo tanto, existe una necesidad desde la mirada de los campos de tomar medidas que permitan un desarrollo sustentable para su producción, procurando mantener la calidad de sus productos y protegiendo los recursos naturales [8]. Es por eso que el uso de controladores biológicos son una nueva alternativa con gran potencial para reemplazar a los pesticidas sintéticos con el fin de desarrollar una agricultura sostenible [16,17,18, 20, 21].

A partir de esta necesidad de satisfacer las nuevas miradas sustentables y cumplir con los nuevos objetivos designados por la OCDE es que nace EXACTA Bio Science en el año 2019, una empresa científica enfocada principalmente en la investigación y desarrollo de nuevas y mejores soluciones biológicas para el desarrollo de nuevos productos agrícolas y con miradas a la prestación de servicios de investigación para otras empresas, con el fin de brindar soluciones más ecológicas, innovadoras, seguras y de mayor calidad científica para la agroindustria, con principal enfoque en las líneas productivas de frutales y hortalizas.

La línea de producción de la empresa se basa en el desarrollo de productos sostenibles de protección biológica a partir de microorganismos. Entre ellos se encuentran bioestimulantes y biofungicidas que funcionan en base a tres cepas de *Bacillus velezensis* (llamadas Bc1, Bc2 y Bc3 de aquí en adelante).

Fitosafe, un biofungicida desarrollado por la empresa para inhibir la acción de fitopatógenos específicos, no logró llegar a la etapa de comercialización debido a un problema de vida de anaquel cuando estaba en fase de estudio en la empresa. En este contexto, se identificó que el producto experimentaba una disminución progresiva del recuento de unidades viables con el transcurso del

tiempo debido a la lisis de estas, comprometiendo la efectividad del producto luego de 7 meses. Un análisis detallado reveló que posterior a 7 meses de almacenamiento, la concentración de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) disminuyó en dos unidades logarítmicas, y al octavo mes alcanzó un punto nulo, planteando un desafío sustancial, ya que la falta de durabilidad del producto obstaculiza la continuidad de su línea productiva.

Sin embargo, se observó actividad antifúngica en el producto residual, la cual no puede atribuirse directamente a la presencia de las bacterias. En este contexto, se postula que el efecto de inhibición contra los fitopatógenos perdura gracias a los metabolitos secundarios producidos por las bacterias del género *Bacillus*.

Existen estudios que indican el potencial antifúngico que tienen algunas cepas de *Bacillus* mediante la liberación de metabolitos secundarios [17,18]. Se ha visto que *Bacillus velezensis* es capaz de secretar componentes con efecto antibiótico, tales como los lipopéptidos (LPs), dentro de los cuales se pueden encontrar tres familias importantes: iturina, fengicina y surfactina, a los cuales se les atribuye esta capacidad antagonista [17,32,33]. Kalai-Grami afirma que la aplicación de iturina A como control biológico, tiene los mismos efectos que antibióticos químicos [26]. Las diferencias estructurales que existen en estos LPs conducen a distintos mecanismos de acción por parte de ellos, principalmente la destrucción de la membrana y la inhibición de funciones intracelulares. [50]

El presente estudio tiene como propósito principal desarrollar un procedimiento eficiente para la obtención de una cantidad significativa de lipopéptidos secretados por cepas de *Bacillus velezensis* capaces de generar un efecto inhibitorio contra patógenos agrícolas de interés contribuyendo no solo al avance de la investigación en el campo de biofungicidas, sino que también contribuir con más aplicaciones prácticas en el control biológico de fitopatógenos en cultivos agrícolas que desarrolla la compañía.

III. Objetivos

El objetivo general de este proyecto corresponde a:

Estudio de factibilidad durante un período de cinco meses de una reformulación de la producción de lipopéptidos a partir de una cepa de *Bacillus velezensis* a través de cambios nutricionales evaluados mediante la metodología de superficie de respuesta, con el propósito de obtener un filtrado libre de células enriquecidos en lipopéptidos con el potencial de inhibir hongos fitopatógenos relevantes para el desarrollo futuro de productos en la empresa.

Los objetivos específicos son:

1. Realizar búsqueda del estado del arte sobre la producción de lipopéptidos y sus parámetros de cultivo.
2. Generar un protocolo de evaluación de lipopéptidos basados en el porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*.
3. Determinar variables y cantidades nutricionales óptimas de cultivo de *Bacillus velezensis* para la producción de lipopéptidos analizados mediante la metodología de superficie respuesta.
4. Validación técnica y financiera de una nueva formulación en la producción de lipopéptidos con la finalidad de determinar la factibilidad de una nueva formulación de FitoSafe.

IV. Metodologías

Para lograr el desarrollo adecuado del proyecto, es importante seguir una serie de pasos que permitan alcanzar el objetivo. Para esto se divide el procedimiento en cinco etapas principales (Figura 1):

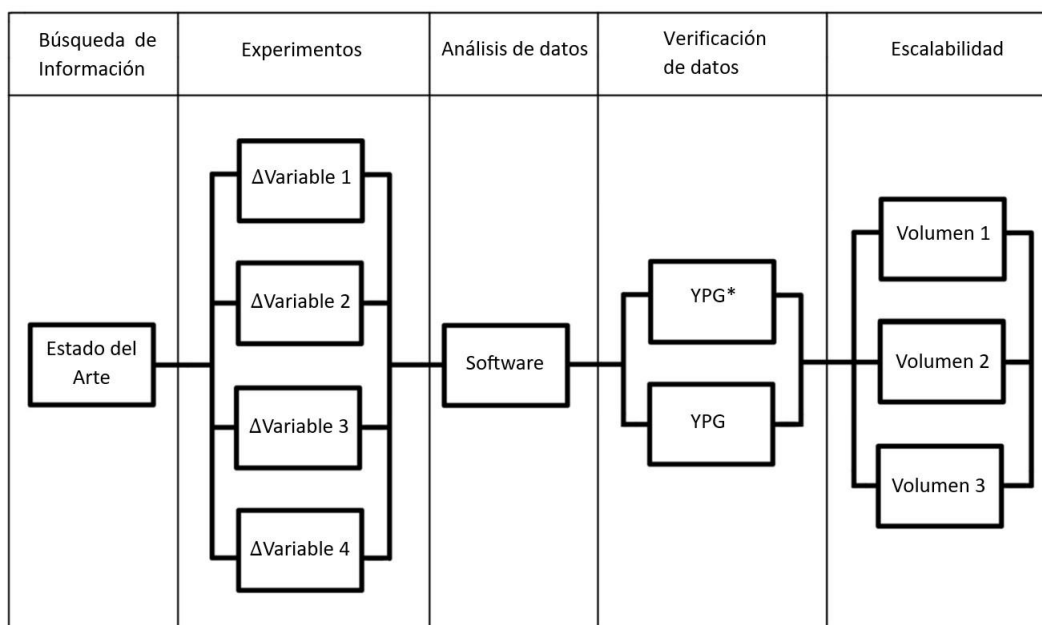


Figura 1. Diagrama de flujos de procesos. Fuente propia.

1. Búsqueda del Estado del Arte:

Obtener información sobre el proceso de producción de lipopéptidos y sus parámetros de cultivo.

2. Experimentos:

A partir de Bc1, el medio de cultivo YPG (*yeast extract*, *peptone* y *glucose* por sus siglas en inglés) y el protocolo de fermentación con el que se trabaja actualmente en el laboratorio, se modifican 4 variables nutricionales de manera independiente, seleccionadas a partir de la información obtenida de bibliografía, para evaluar si hay cambios en el crecimiento de la bacteria, así como mayor inhibición en los patógenos seleccionados. Todo esto por cuadruplicado.

El mecanismo de prueba será de la siguiente manera:

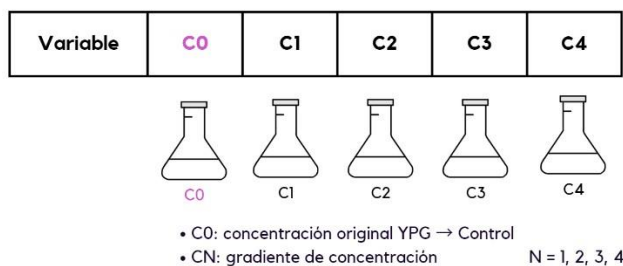


Figura 2. Ilustración de los gradientes nutricionales. Fuente propia.

Se tienen cinco matraces distintos por cada variable. Existirá un matraz control (C0) que tendrá las concentraciones originales de YPG donde no existirá ninguna modificación, y otros 4 matraces, correspondientes a C1, C2, C3 y C4 los cuales presentan distintas concentraciones de la variable a estudiar (ejemplo: C1 con 3 gr de la variable nutricional, C2 con 4 gr de la variable nutricional, y así sucesivamente). Cada matraz se va a inocular con una cantidad determinada de la bacteria, obtenido del cultivo madre de la cepa Bc1 en YPG, y se evalúa el crecimiento y comportamiento de la bacteria cuando esta se expone a variaciones en el medio de cultivo durante un periodo determinado.

3. Análisis resultados experimentales:

Utilización de un software para el análisis de datos obtenidos en los experimentos, que utiliza la metodología de superficie de respuesta (RSM por sus siglas en inglés) para combinar variables independientes de manera simultánea, logrando construir un modelo matemático que simula el comportamiento de una sobre otra, obteniendo como respuesta la combinación óptima entre ellas. [43, 44]. Esto permite que, en lugar de realizar las pruebas individuales con las múltiples combinaciones posibles, la plataforma lo realice de manera automatizada con el fin de reducir tiempo y recursos. El objetivo de este paso es obtener una reformulación del medio de cultivo (se mencionará como YPG* de aquí en adelante).

4. Verificación de datos:

Tomar los resultados entregados por el software, es decir, los valores de YPG*, y probarlos experimentalmente para corroborar la precisión de la interfaz, utilizando el mismo protocolo de fermentación.

Para esto se busca cumplir que:

$$\%Inhibición\ según\ el\ software \cong \%Inhibición\ experimental$$

5. Escalabilidad:

En caso de obtenerse buenos resultados, se ponen a prueba cantidades superiores de volumen a las estudiadas para medir reproducibilidad de los resultados en la medida que aumentamos el volumen donde crece la bacteria, es decir, identificar si se mantiene el comportamiento de inhibición.

V. **Medidas de desempeño**

Para medir el éxito del proyecto, se deben cumplir los siguientes puntos asociados a los objetivos específicos:

1. Factibilidad técnica:

1.1 Se debe lograr un efecto mayor o igual al 40% de inhibición del sobrenadante frente al fitopatógeno en placa, es decir:

$$Inhibición_{YPG*} \geq 40\%$$

Donde la inhibición se calcula como:

$$\% Inhibición = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \cdot 100\%$$

Siendo R_1 radio alcanzado por el hongo hacia el extremo de la placa control, y R_2 radio hacia el punto donde se haya alcanzado la inhibición.

1.2 Considerando que en un futuro se busca incorporar este estudio científico en la formulación de un producto para su comercialización, es importante estudiar el comportamiento de este a medida que aumenta el volumen de producción. Para medir escalabilidad se busca que:

$$\% \text{ Inhibición}_{V1} \approx \% \text{ Inhibición}_{V2} \approx \% \text{ Inhibición}_{V3}$$

Siendo $V1$, $V2$ y $V3$ distintas cantidades de volumen, donde $V1 < V2 < V3$.

2. Factibilidad financiera:

2.1 El desarrollo de la producción de LPs debe ser rentable para la empresa. Para este caso, se evaluará el margen de ganancias que podría generar a la empresa al incorporarse como un complemento para la reformulación de un producto ya existente y actualmente comercializado por la empresa. Si el desarrollo del proyecto aumenta el margen de ganancia, entonces se considera como una opción rentable.

VI. Estado del Arte

La literatura plantea mecanismos de estudios muy similares para analizar la producción de lipopéptidos, así como el cultivo de la bacteria para su óptimo crecimiento. Un factor importante por considerar es que, si bien muchos estudios se basan en la misma especie de bacteria, los resultados pueden variar según la cepa que se tenga de ellos, ya que varía la biosíntesis de los lipopéptidos y sus isoformas [34]. De igual manera, estos permiten tener una noción de su comportamiento.

Bacillus spp. cuenta con tres mecanismos principales de defensa contra patógenos de suelo para proteger a las plantas: secreción de enzimas hidrolíticas, biosíntesis de metabolitos secundarios e inducción de la planta a un sistema de resistencia (ISR) [34, 35]. Sin embargo, la producción de metabolitos, en específico los lipopéptidos, son los más eficientes para combatir al hongo [35].

Existen variados métodos de cuantificación de lipopéptidos en la literatura. Entre ellos se encuentra la precipitación ácida, un mecanismo basado en la utilización de HCl para reducir el pH de la solución (~ 2) para disminuir la solubilidad al neutralizar las cargas negativas resultando en la precipitación de los compuestos [38, 39]. Se caracteriza por ser una medida bastante utilizada al ser económica y efectiva para cuantificar lipopéptidos, pero su principal desventaja es que no es un método selectivo ya que otros compuestos, además de los lipopéptidos, pueden precipitar, logrando niveles de pureza menores al 60% [38]. Por otro lado, se encuentra la ultrafiltración, que permite la separación de

lipopéptidos a través de membranas de filtración según su capacidad para formar micelas, donde el tamaño del poro define su clasificación; para surfactinas e iturinas se pueden utilizar membranas de 10-100 kDa [38, 40]. Si bien es un método que alcanza hasta un 95% de pureza en la extracción de compuestos, los costos de los equipos son muy altos [38] lo que no justifica su adquisición. Otro de los métodos más utilizados en la investigación científica corresponde a la cromatografía líquida, conocida como HPLC. Esta permite separar mezclas mediante una fase móvil y estacionaria, para identificar, cuantificar y purificar compuestos, que destaca por su alta eficiencia en sus resultados [38, 40]. Sin embargo, es otro equipo muy costoso que no justifica la inversión solo para una prueba experimental. Una buena y económica alternativa para confirmar la presencia de biosurfactantes en el sobrenadante libre de células, es el porcentaje de emulsificación [19, 20]; Al-Mutar, D.M.K. et al. (2023) utilizan esta técnica donde ponen a prueba distintos componentes hidrofóbicos para realizar la emulsificación, del cual se obtuvo que el aceite mineral mostró la mejor actividad de respuesta [35]. Sin embargo, la cantidad de emulsificación obtenida no siempre se relaciona de manera directa con la actividad antifúngica de estos [19].

Velandia et al. (2021) realizó un estudio de la fermentación de *Bacillus velezensis* de 72 horas en medio LB, PZN y Landy, donde se midió O.D. (densidad óptica por siglas en inglés), un análisis de espectrofotometría que mide la turbidez del medio que indica el crecimiento bacteriano, a las 24, 48 y 72 horas; se extrajeron muestras de sobrenadante, el cual fue filtrado con filtros pirinola de 0.22 μm y se puso a prueba contra el patógeno *Fusarium oxysporum*. En este estudio se observó la síntesis de lipopéptidos y su actividad antifúngica a partir de variaciones en las condiciones de cultivo. En cuanto a los resultados se observó que, en todos los medios de cultivo, el mayor crecimiento bacteriano se obtuvo al cultivar a 30°C, alcanzando la fase estacionaria a las 24 horas en esta temperatura. La máxima inhibición se obtuvo en el medio PZN alcanzando un 55% contra *F. oxysporum*. De igual manera, se concluyó que las fuentes de carbono y de nitrógeno pueden afectar en el tipo de lipopéptidos que se forman, así como en la actividad antifúngica de estos [34]. En otro escrito, Al-Mutar, D.M.K. et al. (2023) también cultivan su cepa de *Bacillus* en medio LB, pero esta vez a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ a 200 rpm por 72 hrs. Luego el medio fue centrifugado a 12,000 rpm a 4°C por 20 minutos para extraer el sobrenadante. A diferencia de Velandia, estos investigadores utilizan el método de precipitación ácida con HCl para extraer los lipopéptidos purificados. La actividad antifúngica del sobrenadante libre de células contra *Fusarium spp.* alcanzó una inhibición del 89,81%

[35]. En un caso contrario, Zhang, H., et al., (2022) utiliza un procedimiento fermentativo de 9 días de duración a 200 rpm a 28°C, donde el medio de cultivo utilizado contiene más variantes nutricionales incluyendo sales como $FeSO_4$ y $MgSO_4$. En este caso, se buscaba obtener una concentración pura de Iturina A, para lo cual se agregan 3 ml de metanol a la solución, pasa por un vortex durante 10 minutos, luego se centrifuga a 10,000 rpm por 15 minutos para posteriormente extraer el sobrenadante y analizarlo mediante cromatografía HPLC. En este caso se pone a prueba contra el patógeno *Verticillium*, donde alcanzó una inhibición máxima de 92,99% en la medida que aumentó la concentración de Iturina A [37]. Sin embargo, otros estudios entregan resultados opuestos, indicando que la presencia de hierro disminuye la síntesis de lipopéptidos de *Bacillus velezensis* [41].

Estos son algunos ejemplos de toda la información recopilada de los procedimientos experimentales, de los cuales algunos investigadores pudieron concluir que la modificación del medio de cultivo es una de las estrategias que permite mejorar la síntesis de lipopéptidos [41, 29].

Gracias a la tecnología de hoy existen plataformas digitales que permiten simular datos y escenarios para diseñar experimentos, ahorrando tiempo y recursos. Es por eso que la metodología RSM es un mecanismo utilizado para resolver problemas científicos y experimentales, con aplicaciones en áreas de ingeniería, química y agricultura [43,44]. Actualmente existe Design-Experiment, un software que trabaja con esta modalidad, donde incluso un estudio del 2019 utilizó esta interfaz para optimizar las condiciones de fermentación de microalgas para la producción de bioetanol mediante RSM [36]. En este experimento, el software entregó una combinación óptima de los componentes de la fermentación, así como una producción final de bioetanol correspondiente a 18,57 g/L. Se comprobaron experimentalmente los valores entregados por la plataforma digital por triplicado, obteniendo resultados reales de 18,54 g/L; 18,56 g/L y 18,58 g/L. Luego de realizar los análisis estadísticos correspondientes, Samar A. El-Mekkawi et al. (2019), concluyen que el modelo puede predecir con precisión los resultados de un experimento diseñado en su interfaz [36].

Por otro lado, la escalabilidad es un factor importante para cualquier producción, tal como dice Enuh, B (2021): “Aunque los medios se pueden optimizar en condiciones de laboratorio, todavía existe la necesidad de garantizar una distribución adecuada y un crecimiento uniforme en fermentaciones a gran escala.” [29], siendo esto una proyección importante en los estudios científicos para alcanzar

producciones en una industria, con el fin de mejorar la rentabilidad del proceso y aumentar la cantidad final obtenida de LPs, ya que los altos costos de producción limitan las aplicaciones de estos metabolitos en la industria [50].

VII. Solución escogida

Dado que la producción de lipopéptidos es el mecanismo más eficiente que tiene *Bacillus spp.* contra patógenos [35], se considera esta ruta para establecer una solución. Para determinar los parámetros óptimos del cultivo de lipopéptidos se modifican las concentraciones de los componentes del medio de cultivo donde crece Bc1, ya que es una medida que permite un mayor control de estudio y una mayor seguridad para una futura escalabilidad, además de que *“una relación carbono/nitrógeno no óptima es un parámetro crítico que disminuye la síntesis de lipopéptidos”* [41] haciendo estos dos componentes críticos en el medio [34] por lo que es interesante confirmar si las concentraciones utilizadas actualmente en la empresa son las adecuadas y más eficientes.

El medio de cultivo es escogido a partir de los resultados de un estudio interno de la empresa, donde se inoculó Bc1 en distintos medios para ver en cuál de ellos crecía mejor. Estos resultados arrojaron al cultivo YPG como el mejor entorno nutritivo para el crecimiento bacteriano, alcanzando al menos un 80% de inhibición contra *F.oxysporum*, a diferencia de los otros (Anexo 1). Por lo que las siguientes pruebas se realizarán con estas condiciones nutricionales.

Considerando que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden afectar el crecimiento de *Bacillus* [34], se decide estudiar el comportamiento de la bacteria cuando esta se enfrenta a un gradiente de glucosa, peptona y extracto de levadura (E.L.) de manera individual. Por último, la cuarta variable a estudiar corresponde al sulfato de hierro ($FeSO_4$) debido a la diferencia de resultados que existían sobre los efectos de la presencia de esta sal en el medio. Las fermentaciones de *Bacillus* serán en un periodo de 48 horas a 150 rpm a 35°C.

Para el análisis de datos en software se escoge Design-Experiment para determinar el comportamiento entre variables.

VIII. Plan de implementación

Para implementar la solución, desde un stock de Bc1 se toma una muestra para distribuir en una placa de YPG la bacteria de interés mediante método de siembra de estría y se lleva a la estufa a 35°C por 48 horas. Pasado el tiempo, se toma una colonia aislada y se lleva a un matraz de 100 ml con 50 ml de YPG, previamente esterilizado por el autoclave, y se lleva al shaker a 150 rpm O/N. Durante el transcurso de esos días, se preparan 500 ml de una solución madre (Figura 3) que contiene las concentraciones iniciales de YPG de aquellas variables que no se están evaluando, es decir, si en esta fermentación se va a experimentar con un gradiente de glucosa, la solución madre presenta las concentraciones estándar de E.L. y peptona, pero no contiene glucosa. Luego se divide en 5 matraces iguales con 100 ml de la solución madre en cada uno, a los cuales se les agrega una concentración específica de la variable en estudio, siendo $M < N < O < P$ el orden de las concentraciones, y el matraz restante contiene las cantidades originales de YPG (control). Finalmente, se dividen en matraces más pequeños con 50 ml de medio cada uno, para tener duplicados de los gradientes, y se llevan al autoclave.

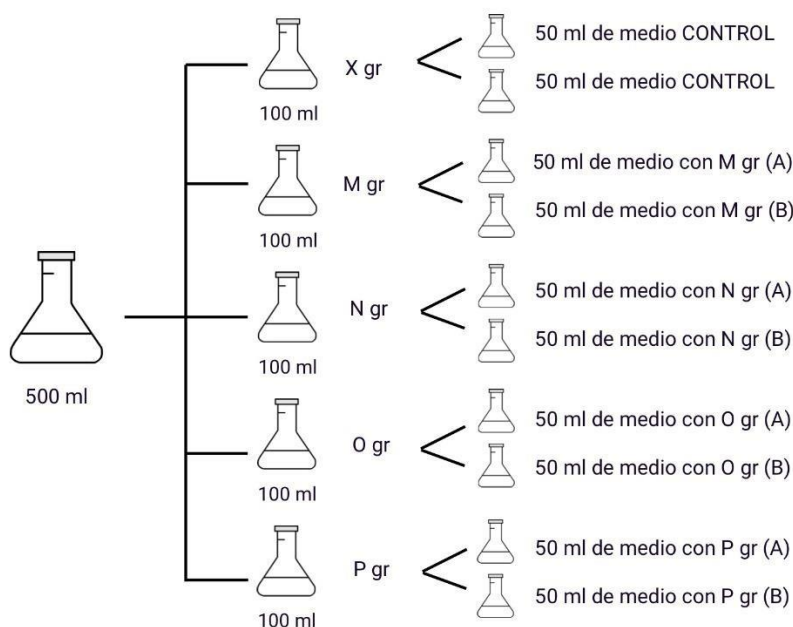


Figura 3. Ilustración de la preparación de matraces para el gradiente en estudio. Fuente propia.

Una vez listos los matraces, se inoculan 500 μ l de Bc1 y se llevan al shaker a 150 rpm a 35°C por 48 horas.

Se extraen muestras representativas a las 16, 24, 40 y 48 horas de inicio del experimento para evaluar el comportamiento en las distintas etapas de crecimiento. En cada punto se van a extraer 2 ml de cada matraz, de los cuales 200 μ l son para medir densidad óptica (OD_{600}) y 1,5 ml para ser centrifugado a 10,000 rpm por 8 minutos. Luego se filtra la muestra con filtros de 0,22 μ m para extraer el sobrenadante, para ser utilizado en el enfrentamiento en placa con hongos.

Para el enfrentamiento con hongos, se utilizan placas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa (PDA) donde se ubica un bocado del fitopatógeno, con un crecimiento previo de 7 días, al centro (verde) y se inoculan 50 μ l de sobrenadante filtrado en cada bocado, ubicado a 2 cm de distancia del hongo (Figura 4) y se lleva a la estufa a 26°C por 5 días. Por cada placa habrá una repetición de cada línea experimental (A y B).

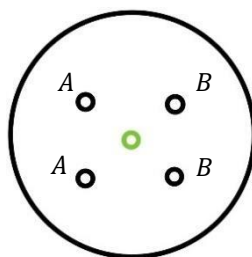


Figura 4. Representación de enfrentamiento en placa de PDA. Fuente propia.

Una vez finalizados los estudios experimentales de los gradientes nutricionales, los datos son ingresados al software Design-Experiment para obtener YPG*. Una vez que la interfaz entregue los resultados correspondientes, se ponen a prueba de manera experimental dichas concentraciones nuevas para medir la precisión del programa y corroborar su funcionalidad, todo esto repitiendo el proceso anterior de la toma de muestras a las 16, 24, 40 y 48 horas, en matraces con 50 ml de medio y por triplicado.

Finalmente, en caso de obtener resultados positivos de las pruebas anteriores, se prueba escalabilidad, midiendo el comportamiento de inhibición en matraces con 100 ml y 500 ml (Figura 5), donde se mantendrá la proporción de inóculo de semilla de Bc1 en 1:100. Todo esto por triplicado.

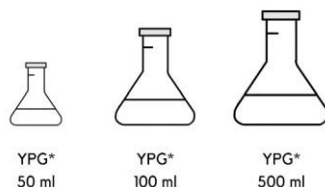


Figura 5. Ilustración de escala de volumen de matraces. Fuente propia.

IX. Matriz de riesgo y mitigaciones

Para este experimento se pueden encontrar los siguientes riesgos:

Evento	Probabilidad	Impacto	Mitigación
Falla de equipos (autoclave, shaker, campana)	Baja	Alto	Mantenciones al día y chequeos periódicos
Falta de insumos (puntas, filtros, medios nutricionales, etc.)	Media	Medio - Alto	Revisión de stock con tiempo
Contaminación de muestras	Media	Alto	Mantener los controles en las etapas para descartar posibilidades y procurar hacer buenos sellados de matraces y placas
Disponibilidad de equipos de trabajo	Media	Medio	Calendarización de actividades

Tabla 1. Matriz de riesgo. Fuente propia.

Una falla en cualquiera de los equipos que forman parte del estudio genera una pausa instantánea en el desarrollo del experimento, para evitar ese escenario las mantenciones deben estar al día y hacer chequeos periódicos tanto de la máquina como del sistema eléctrico para evitar cortes de energía. En cuanto a los insumos, sin considerar la maquinaria, estos no son difíciles de conseguir en caso de que se acaben, pero se busca evitar llegar a ese escenario que impida el avance del trabajo; para eso es importante hacer revisiones previas a los inicios de las fermentaciones para asegurarse de contar con el stock necesario. Por otro lado, considerando que es una empresa pequeña, se tienen

cantidades únicas de cada equipo, por lo que los trabajos en simultáneo que se realizan en el laboratorio incluye que se compartan cosas como las estufas, *shaker* o la campana de flujo laminar; por lo que es importante tomar medidas necesarias para evitar la contaminación y también disponer del tiempo suficiente para compartir equipos y que cada proyecto se pueda desarrollar de manera correcta.

X. Resultados

Durante el desarrollo del estudio hubo una contaminación del *stock* del hongo *Botrytis cinerea* por lo que se procedió a hacer las pruebas con el patógeno *Cytospora spp.* en su lugar.

1. Gradientes nutricionales

A partir de las curvas de fermentación que se hicieron para evaluar cada variable por sí sola, se midieron curvas de OD_{600} y porcentajes de inhibición. Para la primera (Gráfico 1), se obtuvo un comportamiento similar de crecimiento para los gradientes excepto el hierro que mostró crecimientos relativamente menores a la curva de YPG.

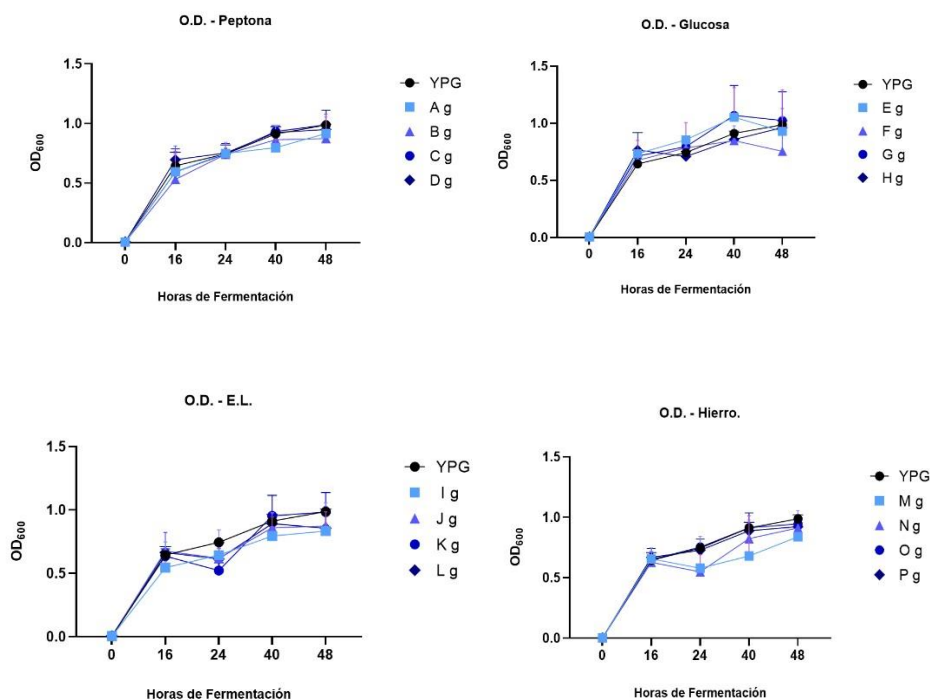


Gráfico 1. Curvas de densidad óptica por variable. Fuente propia.

En cuanto a las inhibiciones, los resultados más interesantes se mostraron a las 48 horas para *Cytospora spp.* (Imagen 1) y *Fusarium oxysporum* en todas las variables excepto para hierro, ya que su presencia en el medio no permitió obtener efectos de inhibición sobre los hongos. Además, el E.L. fue la variable que presentó una inhibición notoria desde las 16 horas y a su menor concentración de prueba. Por otro lado, *Phytophthora cinnamomi* no presentó inhibiciones bajo ningún gradiente nutricional y tampoco con el medio control (Anexo 3).

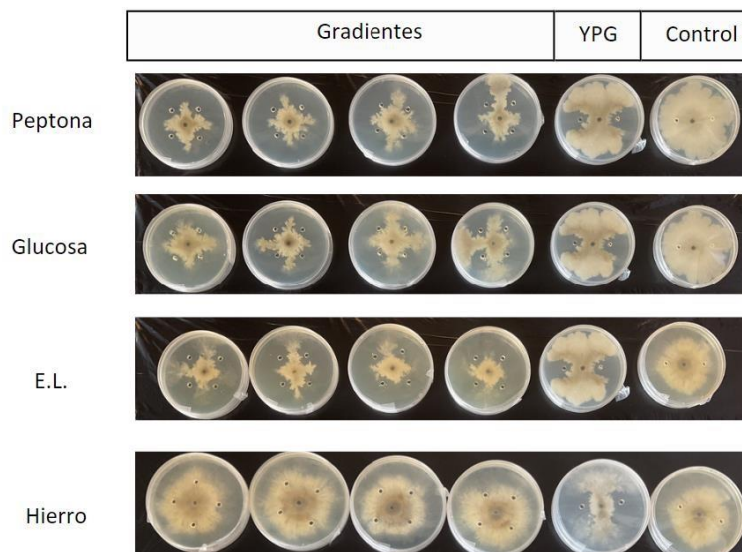


Imagen 1. Inhibición en placa de gradientes nutricionales en *Cytospora spp* a las 48 horas. Las concentraciones de los gradientes aumentan de izquierda a derecha. Fuente propia.

2. Pruebas experimentales Software

A partir de los datos obtenidos en placa, se opta por no incluir $FeSO_4$ en la formulación de YPG* ya que no potencia los niveles de inhibición. Es por esto que se introducen los resultados de las otras 3 variables con sus respectivas concentraciones e inhibiciones a la interfaz de Design-Experiment; la cual entregó la nueva formulación del medio de cultivo, es decir, YPG*. Se llevaron a cabo pruebas experimentales en 50 ml de medio para corroborar las predicciones y compararlas con YPG bajo las mismas condiciones, obteniéndose inhibiciones en los tres hongos (Imagen 2 y 3).

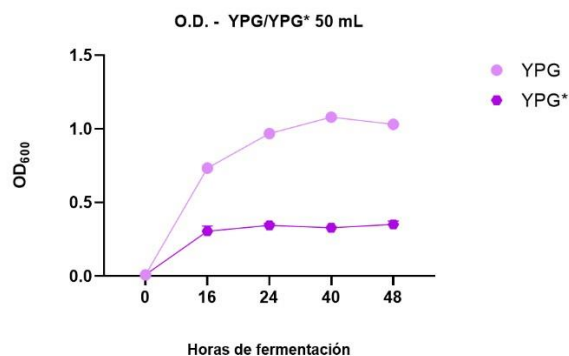


Imagen 2. Densidad óptica de YPG e YPG*. Fuente propia.

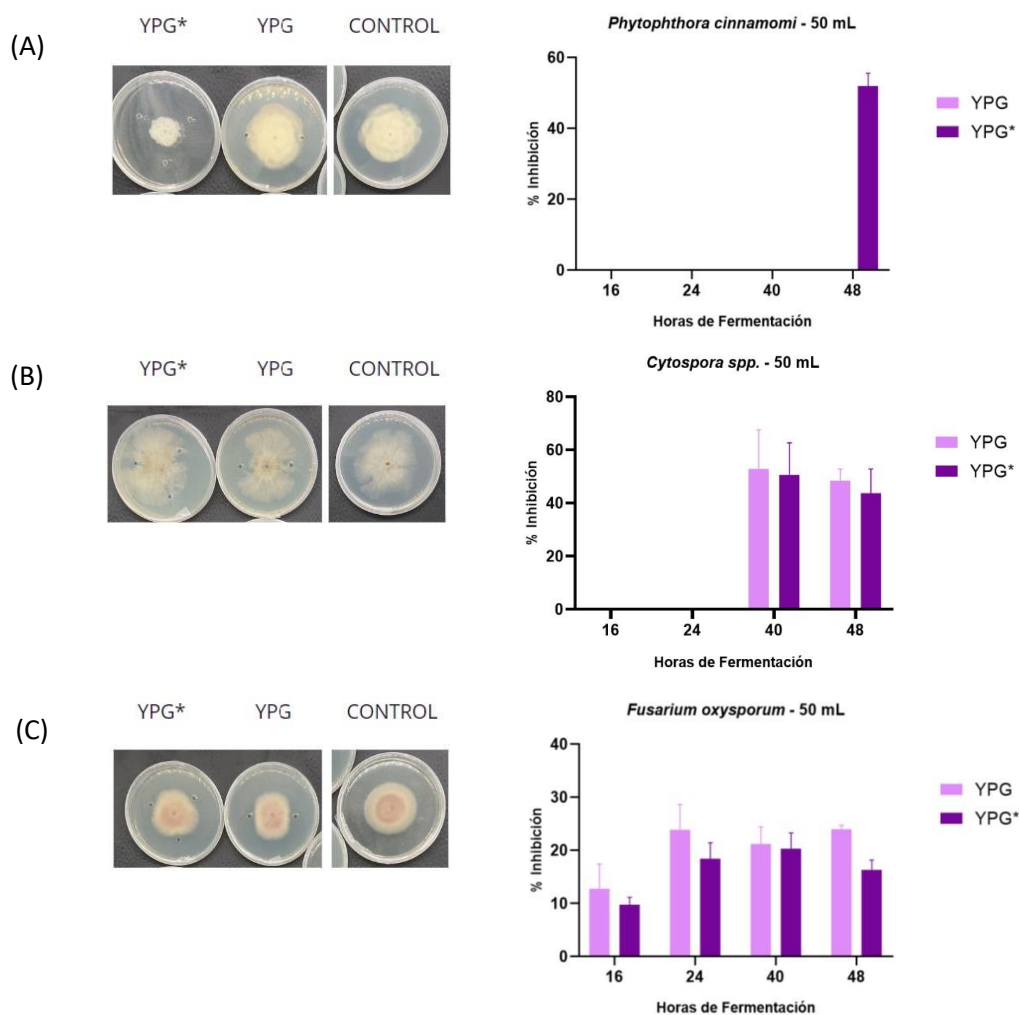


Imagen 3. Pruebas experimentales de las predicciones del software en 50 ml de medio. Imágenes de los resultados a las 48 horas. (A) *Phytophthora cinnamomi*, (B) *Cytospora spp.* (C) *Fusarium oxysporum*. Fuente propia.

3. Escalabilidad

Se procedió a estudiar la escalabilidad de la fermentación poniéndola a prueba en matraces con 100 ml (M100) y 500 ml (M500) de medio. Las curvas de OD_{600} mantienen el comportamiento, a excepción de M500* (matraz de 500 ml con YPG*) que alcanza un mayor nivel de O.D.

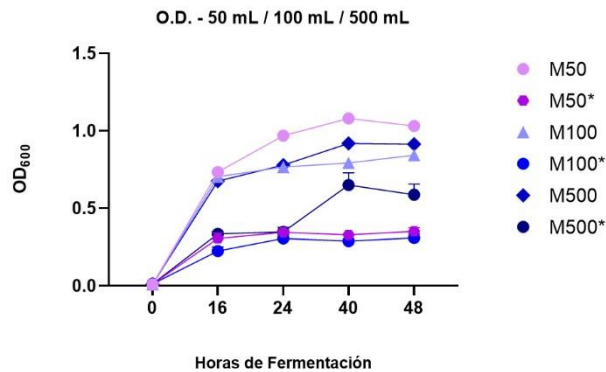


Gráfico 2. O.D. de los distintos volúmenes de prueba en matraces. Fuente propia.

Por otro lado, las inhibiciones obtenidas por estos matraces (Anexo 4) son bastante parejas a medida que aumenta al volumen en donde se hiciera crecer la bacteria (Imagen 3).

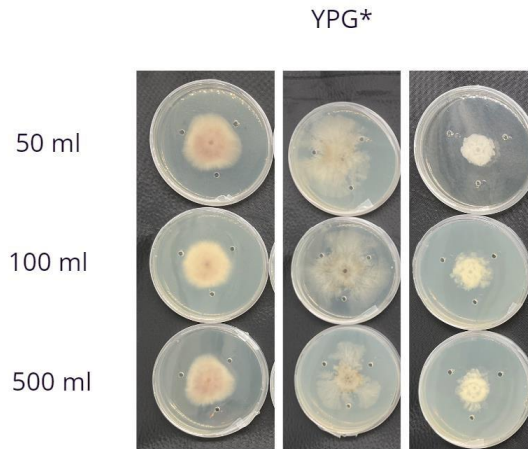


Imagen 3. Pruebas de escalabilidad de YPG* a las 48 horas. Fuente propia.

XI. Evaluación Económica

En primer lugar, dado que la presencia de $FeSO_4$ en el medio no mostró efectos de inhibición no se incorpora como nuevo ingrediente, por lo que no aumenta los costos del medio de cultivo. Además, no se invirtió en la compra del software ya que se utilizó la prueba gratuita de 15 días que contiene las mismas funciones y permitió obtener un resultado útil para la empresa.

Por otro lado, tanto FitoSafe como la producción de LPs se encuentran en fase de estudio científico, por lo que no se cuenta con un análisis financiero resuelto en su totalidad sobre lo que corresponde a su producción y posterior comercialización. Sin embargo, existe un bioestimulante formulado a partir de cepas de *Bacillus velezensis* que actualmente se ha comercializado y se busca reformular su contenido mediante la adición de LPs. Dicho esto, se hace un análisis financiero en base a estos datos (Anexo 2).

Actualmente el costo de producción para un litro de YPG tiene un valor de CLP \$3.253 y tras los resultados del software se logró un YPG* con un precio de CLP \$1.329, es decir, una reducción de aproximadamente un 60% en los costos del medio de cultivo. Si consideramos que para una producción de 3000 L del bioestimulante con un precio de USD \$18 por litro se produce un margen de ganancia del 53% para la empresa, la incorporación de LPs al contenido para la generación de un nuevo producto podría aumentar el margen a un 56% en un escenario pesimista, donde se mantenga el mismo precio de venta; y si este último aumenta en un 15% considerando que se está entregando un mejor producto, el margen de ganancias podría aumentar hasta un 79% según la proporción que se decida tener de bioestimulante y LPs en el producto final.

XII. Conclusiones

En cuanto a la formulación, luego de una reunión con un experto en el software, esta se podría perfeccionar al incluir los resultados de O.D. asociados a cada inhibición y concentración del medio, entregando una solución más precisa y quizás con mayor inhibición. Sin embargo, la empresa está conforme con los resultados obtenidos ya que, a pesar de una baja cantidad de biomasa generada, hubo efectos de inhibición que se encuentran dentro del rango deseado y a un costo de producción

bastante reducido, incluso alcanzando efectos sobre hongos como *Phytophthora cinnamomi* que no había presentado resultados de inhibición en los estudios previos.

Respecto a la factibilidad técnica, por los resultados obtenidos, se puede decir que la nueva formulación del medio de cultivo logra resultados positivos en cuanto a la inhibición de fitopatógenos, a pesar de que existan mejores resultados en algunos hongos, se puede evidenciar actividad antifúngica en cada una de ellas por lo que se alcanza una inhibición mayor al 40% en dos de los tres hongos y la empresa queda conforme con esos resultados. De igual manera, existe un efecto uniforme en cuanto a la escalabilidad de su volumen, ya que se evidencian altos porcentajes de inhibición en la mayoría de los hongos (mayores al 40%) a las 48 horas de fermentación, lo que indica que existe evidencia para continuar con pruebas de escalabilidad de 1L o 2L en reactor, en un comienzo, y estudiar los efectos de los metabolitos generados para seguir formando proyecciones de esta producción. Por otro lado, es una propuesta viablemente económica ya que independiente el escenario que se decida evaluar, aumenta el margen de ganancia convirtiéndolo en una propuesta rentable para la empresa, por lo que se puede establecer que se cumple la factibilidad técnica y económica de la nueva formulación del medio de cultivo para la producción de lipopéptidos. Es por esto que la empresa decide continuar con la nueva formulación del medio YPG para futuras aplicaciones, estudios y desarrollo de la línea de producción de los LPs.

Como principales proyecciones del proyecto se encuentran las pruebas *in vivo* de los LPs, para evidenciar de manera real el efecto que estos tienen sobre la fruta y el control sobre patógenos presentes en ellas; así como también seguir realizando pruebas de escalabilidad para pasar de producción en matraces a biorreactores de menor tamaño, para establecer los parámetros necesarios de cultivo con el fin de alcanzar grandes producciones. Por otro lado, se espera enviar la muestra de sobrenadante filtrado para analizar los componentes que participan de ella, así como las cantidades presentes de los lipopéptidos para una futura comercialización de los LPs.

XIII. Bibliografía:

1. Ministerio de Agricultura. (2019). AGRICULTURA CHILENA Panorama de la Agricultura Chilena. En *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias* (ODEPA). <https://www.odepa.gob.cl/wpcontent/uploads/2019/09/panorama2019Final.pdf>
2. Ministerio de Agricultura. (2017). AGRICULTURA CHILENA Reflexiones y Desafíos al 2030. En *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias* (ODEPA). https://www.odepa.gob.cl/wpcontent/uploads/2018/01/ReflexDesaf_2030-1.pdf
3. *Política y economía Chile* - *Santandertrade.com*. (s. f.). <https://santandertrade.com/es/portal/analizar-mercados/chile/politica-yeconomia#:~:text=Chile%20es%20uno%20de%20los,pesca%2C%20viticultura%20y%20frut a>
4. Gumucio, A., Amunátegui, R., & ODEPA. (s.f.). Aporte del Sector a la Economía de Chile al 2030. En *Primera Sección * Reflexiones y Desafíos al 2030: Perspectiva Institucional de ODEPA*. <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/01/economia4parte.pdf>
5. Financiero, D. (2023, 26 mayo). Las opciones que tiene Chile para lograr un sector agrícola más resiliente al cambio climático. *Diario Financiero*. <https://www.df.cl/economia-y-politica/pais/las-opciones-que-tiene-chile-para-lograr-un-sector-agricola-mas>
6. Subsecretario de Relaciones Económicas Internacionales 2020. (2020). *Gobierno y OCDE firman acuerdo para el proceso constitucional de Chile*. SUBREI.GOB. <https://www.subrei.gob.cl/sala-de-prensa/noticias/detalle-noticias/2020/12/03/gobiernoy-ocde-firman-acuerdo-para-el-proceso-constitucional-de-chile>
7. *Chile Agenda 2030, Ministerio de Desarrollo Social y Familia*. (s. f.-b). <https://www.chileagenda2030.gob.cl/indicadores/indicador2>
8. ODEPA Ministerio de Agricultura. (2019). Panorama de la Agricultura Chilena. En *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias*. <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/09/panorama2019Final.pdf>
9. Jiménez-Reyes, M. F., Carrasco, H., Olea, A. F., & Silva-Moreno, E. (2019). NATURAL COMPOUNDS: a SUSTAINABLE ALTERNATIVE TO THE PHYTOPATHOGENS CONTROL. *Journal of The Chilean Chemical Society*, 64(2), 4459-4465. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072019000204459>

10. Ma, M., Taylor, P. W. J., Chen, D., Vaghefi, N., & He, J. (2023). Major soilborne pathogens of field processing tomatoes and management strategies. *Microorganisms*, 11(2), 263. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020263>
11. Dean, R. A., Van Kan, et al., (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
12. Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., & Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicityrelated transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 22(7), 882895. <https://doi.org/10.1111/mpp.13068>
13. Muñoz, M. & ODEPA. (2021). Tomate: una especie de exportación. En *Departamento de Política Sectorial y Análisis de Mercado*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – Odepa. Ministerio de Agricultura. <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71089/ArtTomate202109.pdf>
14. Statista. (2023, 10 julio). *Ranking de las hortalizas más producidas a nivel mundial en 2021*. <https://es.statista.com/estadisticas/1308589/ranking-de-las-hortalizas-mas-producidas-anivel-mundial/>
15. Villagrán, M. M. (2023). Boletín de hortalizas, enero 2023. ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-dehortalizas-enero-2023>
16. Aravena, R., Besoain, X., et al., (2021). Antifungal nanoformulation for biocontrol of tomato root and crown rot caused by fusarium oxysporum F. sp. radicle-lycopersici. *Antibiotics*, 10(9), 1132. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091132>
17. Wang, K., Wang, Z., & Xu, W. (2022). Induced oxidative equilibrium damage and reduced toxin synthesis in *Fusarium oxysporum* F. sp. *niveum* by secondary metabolites from *Bacillus velezensis* WB. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac080>
18. Al-Mutar, D. M. K., Noman, M., Alzawar, N. S. A., Qasim, H. H., Li, D., & Song, F. (2023). The extracellular lipopeptides and volatile organic compounds of *Bacillus subtilis* DHA41 display Broad-Spectrum antifungal activity against Soil-Borne phytopathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 9(8), 797. <https://doi.org/10.3390/jof9080797>
19. Navajas, D., & Romero-Hernández, A. (2021). Evaluación de un surfactante de origen natural como dispersante en derrames de hidrocarburos en mares. *Dyna-colombia*, 88(218), 230-238. <https://doi.org/10.15446/dyna.v88n218.93114>

20. Ying, W., Liu, X., et al., (2020). Antifungal effects of hinokitiol on development of botrytis cinerea in vitro and in vivo. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111038. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111038>
21. Chaouachi, M., Marzouk, T., et al., (2021). Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of Botrytis cinerea. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111389. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>
22. De Simone, N., Pace, B., Grieco, F., Chimienti, M., Tyibilika, V., Santoro, V., Capozzi, V., Colelli, G., Spano, G., & Russo, P. (2020). Botrytis cinerea and Table Grapes: A review of the main Physical, Chemical, and Bio-Based Control Treatments in Post-Harvest. *Foods*, 9(9), 1138. <https://doi.org/10.3390/foods9091138>
23. Alfiky, A., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E., & Weisskopf, L. (2022). Disease inhibiting effect of strain *Bacillus subtilis* EG21 and its metabolites against potato pathogens *Phytophthora infestans* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 112(10), 2099-2109. <https://doi.org/10.1094/phyto-12-21-0530-r>
24. Kasteel, M., Ketelaar, T., & Govers, F. (2023). Fatal attraction: How phytophthora zoospores find their host. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 148-149, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2023.01.014>
25. La Spada, F., Stracquadanio, C., Riolo, M., Pane, A., & Cacciola, S. O. (2020). Trichoderma Counteracts the Challenge of Phytophthora nicotianae Infections on Tomato by Modulating Plant Defense Mechanisms and the Expression of Crinkler, Necrosis-Inducing Phytophthora Protein 1, and Cellulose-Binding Elicitor Lectin Pathogenic Effectors. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583539>
26. Tang, Z., Cao, X., & Zhang, H. (2022). Production of Iturin A by *Bacillus velezensis* ND and its biological control characteristics. *Journal of Basic Microbiology*, 63(2), 179-189. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200473>
27. Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2009). Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method. *Journal of Microbiological Methods*, 76(1), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.09.010>
28. Barakat, K. M., Hassan, S. W., & Darwesh, O. M. (2017). Biosurfactant production by haloalkaliphilic bacillus strains isolated from Red Sea, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(3), 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.09.001>

29. Enuh, B. M., Çelik, P. A., Çabuk, A., & Banat, I. M. (2021). Biosurfactants: opportunities for the development of a sustainable future. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 56, 101514. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101514>
30. Palacios, F. (2021). *Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de Bacillus subtilis durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao* [Trabajo de titulación]. Universidad de las Fuerzas Armadas Ecuador.
31. Kieseewalter, H. T., Lozano-Andrade, C. N., Wibowo, M., Strube, M. L., Maróti, G., Snyder, D., Jørgensen, T. S., Larsen, T. O., Cooper, V. S., Weber, T., & Kovács, Á. T. (2021). Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi. *MSystems*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00770-20>
32. Tran, C., Cock, I. E., Chen, X., & Feng, Y. (2022). Antimicrobial bacillus: Metabolites and their mode of action. *Antibiotics*, 11(1), 88. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>
33. Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaid-Ullah, M., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from bacillus species exhibiting antifungal activity. *PLOS ONE*, 13(6), e0198107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107>
34. Velandia, C. A. M., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. (2021). Biosynthesis of cyclic lipopeptides by *Bacillus velezensis* BS006 and its antagonistic activity are modulated by the temperature and culture media conditions. *Current Microbiology*, 78(9), 3505-3515. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02612-8>
35. Al-Mutar, D. M. K., Noman, M., Alzawar, N. S. A., Qasim, H. H., Li, D., & Song, F. (2023). The extracellular lipopeptides and volatile organic compounds of *Bacillus subtilis* DHA41 display Broad-Spectrum antifungal activity against Soil-Borne phytopathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 9(8), 797. <https://doi.org/10.3390/jof9080797>
36. El-Mekkawi, S. A., Abdo, S. M., Samhan, F. A., & Ali, G. H. (2019). Optimization of some fermentation conditions for bioethanol production from microalgae using response surface method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0205-8>
37. Tang, Z., Cao, X., & Zhang, H. (2022). Production of Iturin A by *Bacillus velezensis* ND and its biological control characteristics. *Journal of Basic Microbiology*, 63(2), 179-189. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200473>

38. Valenzuela, V., & Gálvez, G. et al., (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2).
39. Campos, E. C. (2022). *Producción y evaluación de un biosurfactante para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. <https://doi.org/10.24275/uama.6738.9061>
40. Santos, I. (2022). *Identificación de péptidos antimicrobianos producidos por Bacillus con capacidad de inhibir el crecimiento de aislados clínicos de Staphylococcus aureus* [Tesis]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
41. Ley-López, N., Heredia, J. B., Martín-Hernández, C. S., Ibarra-Rodríguez, J. R., AnguloEscalante, M. Á., & García-Estrada, R. S. (2022). Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(3), 181-191. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.03.002>
42. López, C., Peñuelas, C., Arteaga, T., & Martínez, Á. (2013). Análisis del costo de remoción de fungicidas utilizados en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(4). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000400007#:~:text=El%20tiz%C3%B3n%20tard%C3%ADo%20\(Phytophthora%20infestans,d%C3%B3lares%20anuales%20\(Salazar%20et%20al.](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000400007#:~:text=El%20tiz%C3%B3n%20tard%C3%ADo%20(Phytophthora%20infestans,d%C3%B3lares%20anuales%20(Salazar%20et%20al.)
43. Walkiria, C., & Ruiz-González, A. (2018). La Modelación Matemático-Estadística en la Metodología de Superficie de Respuesta. Aplicaciones agrícolas. *Revista Ingeniería Agrícola*, 8(4). <https://ojs.edicionescervantes.com/index.php/IAgric/article/view/1036/1552>
44. Yaguas, O. J. (2017). Metodología de superficie de respuesta para la optimización de una producción agrícola. *Revista ingeniería industrial*, 16(2), 205-222. <https://doi.org/10.22320/s07179103/2017.13>
45. Rosales-López, C. (2019). Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial. *Tecnología en Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4626>
46. Guez, J., Vassaux, A., Larroche, C., Jacques, P., & Coutte, F. (2021). New continuous process for the production of lipopeptide biosurfactants in foam overflowing bioreactor. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.678469>

47. Syafirah, N., & Syuhada, N., et al. (2021). Production of lipopeptide biosurfactant in batch and fed-batch *Streptomyces* sp. PBD-410L cultures growing on palm oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44. https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-021-02543-5#auth-Nor_Syafirah-Zambry-Aff1
48. Noja Izzeddin, A., & Luis Medina, T. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15(3). https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382011000300005
49. Farías, T. (2023). *Caracterización de aislados de Cytospora spp. asociados a enfermedades de la madera de árboles frutales* [Memoria de Título]. Universidad de Talca.
50. Zhang, B., et al. (2022). Natural antimicrobial lipopeptides secreted by *Bacillus* spp. and their application in food preservation, a critical review. *Trends in Food Science and Technology*, 127, 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.009>

XIV. Anexos:

- Resultados estudio interno de EXACTA Bioscience para estudiar el comportamiento antifúngico contra *Fusarium Oxysporum* donde se muestran los porcentajes de inhibición.

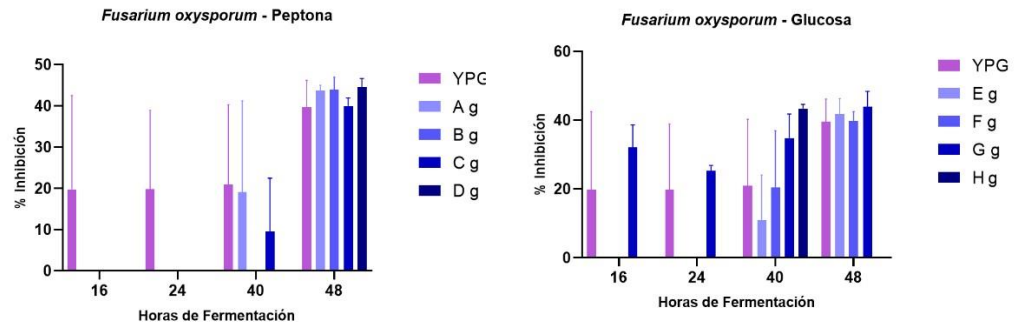
LB (5% NaCl)	50% - 60%
LB (10% NaCl)	
Tripticasa de soya (TSB)	
Caldo Nutritivo (NB)	
Y.E. + Melaza	
Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)	
Medio Mínimo M9 + Glucosa (1%)	0%
YPG	80%

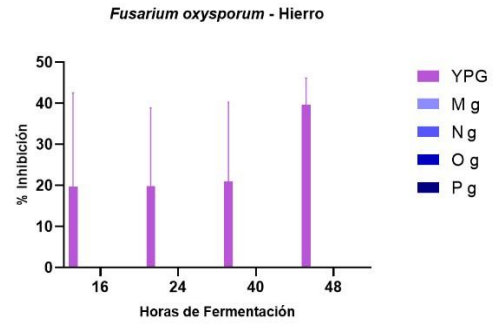
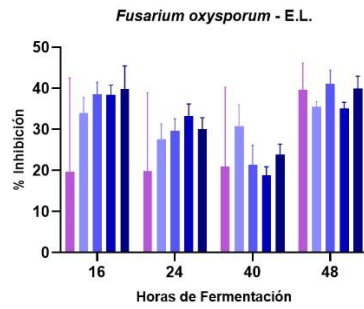
2. Evaluación económica:

Producto Actual En el Mercado - Bioestimulante basado en 3 cepas de bacterias (evaluación por mes)									
		Bioestimulante	LPs (YPG)	LPs (YPG*)	Escenario pesimista		Escenario realista		
					Bioestimulante mejorado (50/50)*	Bioestimulante mejorado (80/20)**	Bioestimulante mejorado (50/50)*	Bioestimulante mejorado (80/20)**	
Cantidad de producción		3000 L	3000 L	3000 L	3000 L	3000 L	3000 L	3000 L	
Costo directos de producción (fijos)	Equipos, mano de obra, arriendos/servicios básicos	\$ 3.517	\$ 3.517	\$ 3.517	\$ 3.517	\$ 3.517	\$ 3.517	\$ 3.517	
Costos directos de producción (variables)	Costo Ingredientes (por litro)	\$ 1.722	\$ 3.253	\$ 1.329	\$ 1.526	\$ 1.643	\$ 1.526	\$ 1.643	
Costos indirectos de producción (fijos)		\$ 5.000	\$ 5.000	\$ 5.000	\$ 5.000	\$ 5.000	\$ 5.000	\$ 5.000	
Costo total de producción (CLP)		\$ 10.239	\$ 11.770	\$ 9.846	\$ 10.043	\$ 10.160	\$ 10.043	\$ 10.160	
Costo total de producción (USD)		\$ 11,77	\$ 13,53	\$ 11,32	\$ 11,54	\$ 11,68	\$ 11,54	\$ 11,68	
Precio de venta (USD)		\$ 18	\$ 18	\$ 18	\$ 18	\$ 18	\$ 21	\$ 21	
Margen		53%	33%	59%	56%	54%	79%	77%	
					* Formulación con 50% bioestimulante y 50% LPs				
					** Formulación con 80% bioestimulante y 20% LPs				

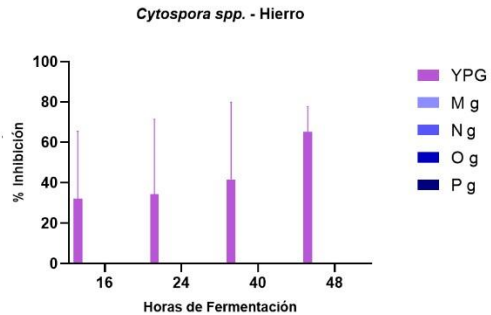
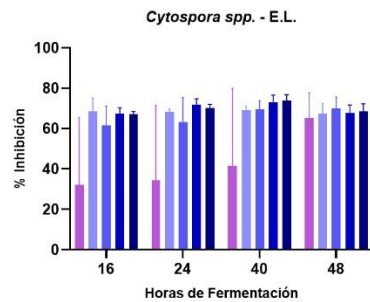
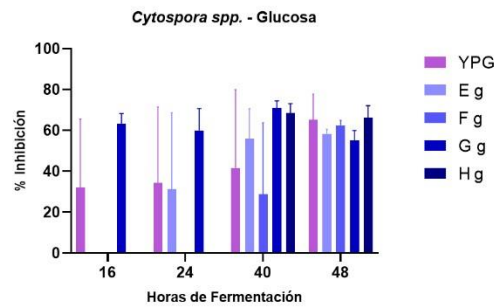
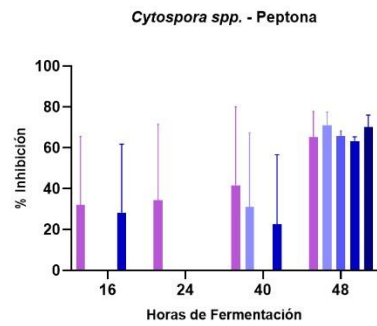
3. Inhibiciones de gradientes de concentración por hongo:

3.1 *Fusarium oxysporum*

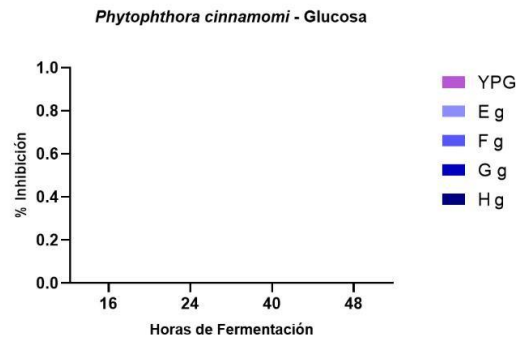
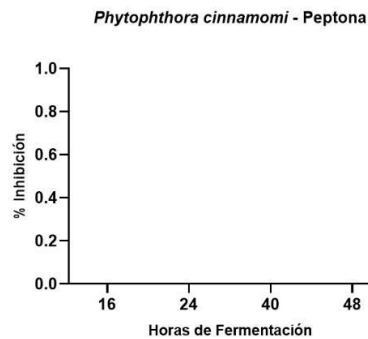


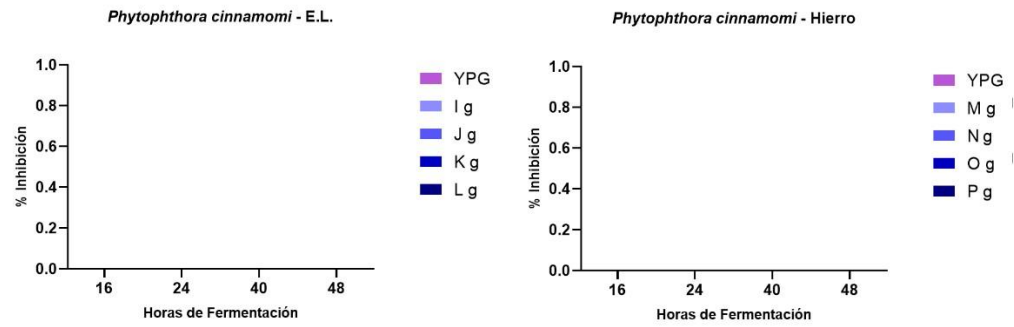


3.2 *Cytospora* spp.



3.3 *Phytophthora cinnamomi*





4. Escalabilidad de matraces con medio YPG e YPG*, con sus respectivos porcentajes de inhibición por hongo.

