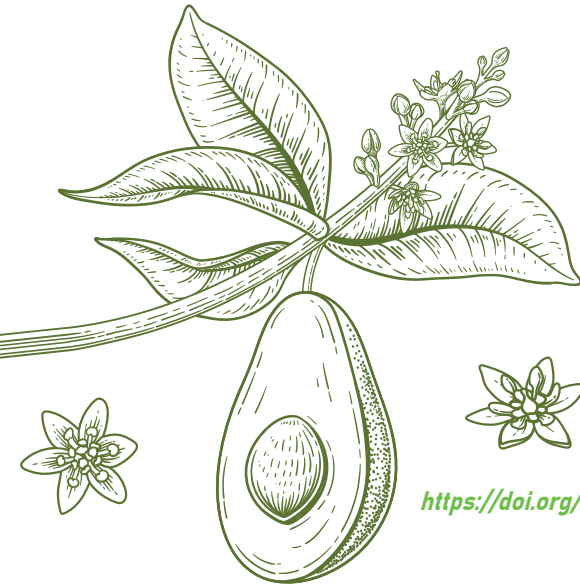


CAPÍTULO 3

Alternativas biotecnológicas para el manejo integrado del cultivo de aguacate



Cristina Calle Henao^{1,2}

Natalia Arbeláez Agudelo¹

Lina Maria Arbeláez Galvis¹

Juan Diego Medina Chavarría¹

Juan Carlos Bedoya Pérez^{1,2}

<https://doi.org/10.26620/uniminuto/978-958-763-788-5.cap3>

Resumen

Colombia posee condiciones agroecológicas favorables para el cultivo de aguacate, un producto con alto potencial de exportación que impulsa la diversificación agrícola, atrae inversión extranjera y genera empleo rural. Sin embargo, plagas y enfermedades afectan su productividad y calidad, lo que históricamente ha llevado al uso intensivo de agroquímicos. Las crecientes restricciones sobre estos productos han generado la necesidad de alternativas sostenibles, como los agentes de control biológico (ACBs). En los últimos años, la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico – UFCB ha desarrollado diferentes investigaciones buscando ofrecer soluciones biotecnológicas en el manejo del cultivo. A través de proyectos enfocados en la poscosecha, el mejoramiento genético, el sistema productivo y la calidad de insumos, el grupo ha identificado microorganismos nativos con potencial biocontrolador,

1 Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

2 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (IUCMA).

formulado prototipos de bioproductos con viabilidad comercial y avanzado en la propagación clonal y caracterización genética del cultivo. Este capítulo es el resultado de años de trabajo, narrando cada etapa del proceso de investigación: desde la bioprospección de microorganismos hasta la validación de bioformulados en condiciones reales. Más allá del aguacate, estas experiencias demuestran la importancia de la investigación y la colaboración entre ciencia y agroindustria para desarrollar bioproductos innovadores que contribuyan a la productividad y sostenibilidad agrícola.

Palabras claves: Aguacate, Agentes de Control Biológico (ACBs), bioprospección, pudrición radicular, enfermedades poscosecha, sostenibilidad agrícola

Abstract

Colombia has favorable agroecological conditions for avocado cultivation, a high-export potential product that drives agricultural diversification, attracts foreign investment, and generates rural employment. However, pests and diseases affect its productivity and quality, historically leading to the intensive use of agrochemicals. Increasing restrictions on these products have created the need for sustainable alternatives, such as biological control agents (BCAs). In recent years, the Plant Health and Biological Control Unit – UFCB has conducted various research efforts aimed at offering biotechnological solutions for avocado crop management. Through projects focused on post-harvest management, genetic improvement, production systems, and input quality, the group has identified native microorganisms with biocontrol potential, formulated prototype bioproducts with commercial viability, and advanced in clonal propagation and genetic characterization of the crop. This chapter is the result of years of research, detailing each stage of the process, from microbial bioprospecting to the validation of bioformulations under real conditions. Beyond avocado, these experiences demonstrate the importance of research and collaboration between science and the agroindustry to develop innovative bioproducts that contribute to agricultural productivity and sustainability.

Keywords: Avocado, Biological Control Agents (BCAs), bioprospecting, root rot, postharvest diseases, agricultural sustainability

Cómo citar este capítulo

Calle Henao, C., Arbeláez Agudelo, N., Arbeláez Galvis, L. M., Medina Chavarría, J. D., & Bedoya Pérez, J. C. (2025). Alternativas biotecnológicas para el manejo integrado del cultivo de aguacate. En N. C. Higuera Mora & R. H. Posada Almanza (Eds.), *Comunidades y diversidad biológica en sistemas agrícolas y agroforestales* (pp. 107–134). Corporación Universitaria Minuto de Dios – UNIMINUTO. <https://doi.org/10.26620/uniminuto/978-958-763-788-5.cap3>

Introducción

El desafío de alimentar a una población en crecimiento sin expandir las áreas cultivadas ni invadir ecosistemas naturales plantea un objetivo crucial en el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por las Naciones Unidas relacionados con Hambre Cero (ODS2), Producción y Consumo Responsables (ODS12) y Vida de Ecosistemas Terrestres (ODS15). La promoción de prácticas agrícolas sostenibles, el apoyo a pequeños agricultores y el desarrollo de tecnologías que mejoren la productividad agrícola son pilares fundamentales para superar este desafío. En este contexto, los sistemas de producción más eficientes y sostenibles son esenciales para garantizar la seguridad alimentaria y avanzar hacia economías más responsables en el uso de recursos (Granada, 2019).

El aguacate, un cultivo de alta relevancia económica y nutricional, ha experimentado un crecimiento exponencial en su producción y exportación, especialmente en países latinoamericanos. Según Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO](2025), en Colombia, por ejemplo, la producción de aguacate presentó un crecimiento del 27% en los últimos 10 años, pasando de 288739.26 toneladas en 2014 a 1085765.75 toneladas en 2023. No obstante, este aumento en la demanda mundial ha expuesto al aguacate a limitaciones significativas en la productividad, atribuibles a factores bióticos y abióticos que afectan tanto el desarrollo de los cultivos como la calidad del fruto en poscosecha (Talavera et al. 2023). Entre los desafíos más críticos se encuentra la pudrición radicular, causada principalmente por *Phytophthora cinnamomi*, un patógeno devastador responsable de pérdidas económicas sustanciales en regiones productoras, y las infecciones poscosecha, que comprometen la calidad de los frutos destinados a exportación (Ramírez & Morales, 2021; Granada, 2019).

Tradicionalmente, el control de estas enfermedades ha dependido del uso de agroquímicos, como fungicidas y compuestos sintéticos, cuya eficacia se ve limitada por el desarrollo de resistencia microbiana y su impacto, tanto ambiental como en la salud humana (Rani et al. 2021). Además, las restricciones internacionales sobre residuos químicos han impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles. Entre estas alternativas, el uso de agentes de control biológico (ACB) ha surgido como una estrategia prometedora. Los ACB, derivados de microorganismos nativos, no solo ofrecen una solución ecológica, sino que también contribuyen al desarrollo

de bioproductos con aplicaciones en el manejo integrado de cultivos (Ayilara et al. 2023; Granada, 2019).

En Colombia, investigaciones recientes han explorado la bioprospección del microbioma de plantas de aguacate para identificar microorganismos con potencial como antagonistas de patógenos, biofertilizantes y promotores del crecimiento. En la UFCB perteneciente a la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) y la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (IUCMA), estas investigaciones han derivado en el establecimiento de una colección de microorganismos nativos registrados, evaluados y escalados como prototipos para su aplicación en sistemas agrícolas. Paralelamente, se han realizado esfuerzos para mejorar la caracterización genética de los árboles de aguacate, desarrollar portainjertos más tolerantes y homogéneos, y estandarizar técnicas de propagación clonal, con el objetivo de abordar integralmente los retos del cultivo en términos de productividad, sanidad y sostenibilidad (Cañas et al. 2022; Cañas & Arango, 2019; Ramírez et al. 2021; Ramírez et al. 2015; Calle et al. 2020; Granada et al. 2020; Granada et al. 2018).

Este capítulo presenta el proceso de investigación y desarrollo de bioinsumos formulados con microorganismos biocontroladores basado en las experiencias de la UFCB. Se abordan etapas clave como la selección y evaluación de microorganismos hasta la formulación y validación del producto en ambientes relevantes (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, 2021). Todo ese proceso ha permitido llevar tecnologías hasta niveles de madurez tecnológica (TRL) de 7-8, como el prototipo de formulación en emulsión aceite-agua (O/W) a partir de la cepa bacteriana *Bacillus velezensis* HOB008-290, que ha demostrado funcionar en la prevención y manejo de enfermedades de la poscosecha del aguacate y operar a escala pre-comercial. Mientras que el prototipo en polvo mojable a base de un extracto metabólico de la cepa bacteriana *Serratia marcescens* ARP5.1 para el control de patógenos fúngicos evidenció requerir mejoras para su funcionamiento técnico y comercial.

Estos avances ejemplifican el camino para el desarrollo de soluciones biotecnológicas innovadoras que contribuyan al manejo sostenible de los sistemas agrícolas, equilibrando productividad y conservación ambiental.

Metodología

Área de estudio

Uno de los muestreos más extensos realizados por el grupo de investigación se llevó a cabo en el marco del proyecto “Desarrollo tecnológico, productivo y comercial del aguacate en el departamento de Antioquia”, en el cual, se recolectaron muestras de suelo rizosférico, raíces, hojas, flores y frutos de 240 árboles aparentemente sanos, distribuidos en ocho huertos de aguacate. Las colectas se realizaron del 2014 al 2017 en tres subregiones del departamento de Antioquia (Colombia): Oriente (El Retiro, Rionegro y El Peñol), Suroeste (Amagá y Jardín) y Noroeste (San Pedro de los Milagros).

Microorganismos y medios de cultivo

Las muestras recolectadas incluyeron suelo rizosférico, raíces, hojas, flores y frutos provenientes de plantas de aguacate. Cada muestra vegetal fue previamente fragmentada en secciones de aproximadamente 1 cm² y lavada con agua estéril para remover residuos superficiales. Posteriormente, tanto las muestras vegetales como las de suelo rizosférico (aproximadamente 1 g por muestra) fueron transferidas a tubos estériles conteniendo 9 mL de solución salina estéril con Tween 80 al 0.5 % (v/v), y sometidas a agitación en vórtex durante 1 minuto para favorecer la liberación de microorganismos epífitos o endofíticos superficiales.

Una vez obtenida la suspensión, se sembró una alícuota de 100 µL directamente sobre placas de Petri con medio TSA (Tryptic Soy Agar, Merck®, Alemania), distribuyéndola homogéneamente con un esparcidor estéril. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 h. Durante este periodo, se observaron las interacciones entre colonias microbianas que crecían en cercanía, y se seleccionaron aquellas colonias que presentaban halos de inhibición alrededor o que mostraban antagonismo evidente frente a otras colonias presentes en la misma placa.

Las colonias seleccionadas fueron posteriormente replicadas en nuevas placas de TSA para obtener cultivos axénicos y continuar con su caracterización.

Los aislamientos de microorganismos fitopatógenos del aguacate (*P. cinnamomi*, *Colletotrichum* spp., *Phomopsis* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Cylindrocladium* sp., entre otros) se obtuvieron a partir de raíces, hojas y brotes

de árboles sintomáticos y asintomáticos ubicados en distintos huertos comerciales de Antioquia (región noroeste de Colombia). Estos aislamientos fueron mantenidos en agar papa-dextrosa (PDA) o en medios específicos a 21 °C.

Ensayos de antagonismo *in vitro*

La selección de aislamientos con actividad antagonista se llevó a cabo mediante ensayos de cultivo dual en placas de Petri, siguiendo la metodología descrita por Granada et al. (2014). Brevemente, las placas de Petri con agar papa-dextrosa (PDA) se dividieron en cuatro cuadrantes, y cada uno fue inoculado a 1 cm del borde con un aislamiento potencialmente antagonista, utilizando un asa de siembra. En el centro de la placa se colocó un disco de PDA de 6 mm de diámetro colonizado con el patógeno a evaluar, previamente cultivado durante ocho días. Como control de crecimiento, se incluyó un tratamiento con el patógeno en ausencia de antagonistas. Tras seis días de incubación a 24 °C, se midió la zona de inhibición alrededor de cada antagonista. El grado de inhibición se cuantificó en una escala de 0 a 3, donde: 0 = sin halo de inhibición, 1 = halo de 0.1 a 1.0 cm, 2 = halo de 1.0 a 2.0 cm y 3 = halo de 2.0 a 4.0 cm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con una réplica adicional en el tiempo para validar los resultados (Ramírez et al. 2015).

Pruebas de eficacia *in vivo* en condiciones de laboratorio

Se evaluó la eficacia de aislamientos bacterianos seleccionados y sus extractos aplicados sobre frutos de aguacate infectados artificialmente o bajo condiciones de infección natural, con el objetivo de controlar los fitopatógenos *C. gloeosporioides* (BR45) y *L. theobromae* (SR14), principales agentes causales de *Body Rot* y *Stem End Rot*, respectivamente. Estas pruebas permitieron no solo confirmar la capacidad biocontroladora de los microorganismos, sino también identificar las concentraciones más efectivas de las mismas, incluso del extracto bacteriano frente a las enfermedades poscosecha, así como establecer las formulaciones más prometedoras. Los tratamientos fueron comparados con productos comerciales comúnmente empleados, como Econoy® y Procloraz®.

Identificación de antagonistas bacterianos

Las bacterias biocontroladoras fueron identificadas mediante PCR de colonia, utilizando los cebadores universales de ARNr 16S (27F y 1492R), según Marasco et al. (2018). Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados por Macrogen Incorporated (Seúl, Corea). Las secuencias forward y reverse fueron recortadas, editadas y alineadas con el software Geneious versión 5.4 (Drummond et al. 2012). Posteriormente, se empleó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank y determinar su identidad.

Proceso de optimización de la producción de antagonistas bacterianos

Algunas de las bacterias con mayor potencial biotecnológico para el control de fitopatógenos en el cultivo de aguacate fueron sometidas a procesos de optimización de su producción mediante fermentación sumergida. Para ello, se implementó una estrategia de dos fases basada en la metodología descrita por Bedoya et al. (2019), orientada a maximizar tanto la concentración celular como la síntesis de metabolitos bioactivos. Se emplearon enfoques experimentales complementarios, incluyendo el diseño “un factor a la vez” (OFAT) para la selección preliminar de variables críticas, seguido de un diseño Box-Behnken que permitió evaluar interacciones entre factores como la fuente y concentración de carbono, nitrógeno y sales minerales. Como medio base se utilizó un medio mínimo compuesto por 64 g L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 2.5 g L^{-1} de NaCl , 5 g L^{-1} de NH_4Cl , 2 mL L^{-1} de MgSO_4 1 M, 0.1 mL L^{-1} de CaCl_2 1 M, 25 mL L^{-1} de glucosa al 20% y 773 mL L^{-1} de agua destilada, que fue ajustado según los requerimientos fisiológicos de cada cepa.

Estas condiciones fueron refinadas particularmente para *S. marcescens* ARP5.1 y *B. velezensis* HOB008-290. En el caso de *S. marcescens* ARP5.1, la estrategia se centró en incrementar la producción de metabolitos bioactivos, mientras que para *B. velezensis* HOB008-290 el objetivo principal fue maximizar la producción de biomasa y endosporas. Para ello, se evaluaron diversas fuentes de carbono (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, glicerol y almidón de yuca) y nitrógeno (extracto de levadura, proteína de soya, urea, peptona, nitrato de amonio, caseína, extracto de malta, nitrato de potasio y sulfato de amonio) (Montoya, 2021). Asimismo, se analizaron variables clave del proceso

fermentativo, como el tiempo de cultivo, la concentración inicial del inóculo, la velocidad de agitación y la temperatura de incubación (Montoya, 2021).

Como resultado de esta optimización, se definieron medios y condiciones de cultivo específicos que permitieron maximizar la producción en fermentaciones a escala de matraz Erlenmeyer (125 mL). Posteriormente, estas condiciones fueron validadas en fermentadores de 14 L (con 7 L efectivos), y en algunos casos se lograron escalamientos exitosos hasta volúmenes de 200 L.

Producción de bacterias por fermentación sumergida para la obtención de metabolitos extracelulares

El aislamiento bacteriano ARP5.1 ha resaltado por su capacidad para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*. Sin embargo, su identificación como *S. marcescens*, un patógeno nosocomial asociado a brotes sanitarios (Harch et al. 2025), planteó la necesidad de explorar su potencial como fuente de metabolitos extracelulares en lugar de su aplicación directa como agente biocontrolador. *S. marcescens* es reconocida por la producción de compuestos bioactivos, como la Prodigiosina (PG), un pigmento rojo con actividad antimicrobiana contra diversas bacterias y hongos (Hamada & Mohamed, 2024). Por ello, se evaluó la actividad biológica de sus extractos frente a fitopatógenos del aguacate y su viabilidad como bioinsumo basado en metabolitos bacterianos.

Para maximizar la producción de compuestos bioactivos, se evaluaron diferentes medios de cultivo bajo condiciones controladas. Tras 48 h de incubación a 28 °C y 170 rpm, se añadieron 20 mL de acetato de etilo a cada matraz de cultivo y se agitaron suavemente durante 1 h para facilitar la extracción líquido-líquido en una proporción 2:1 (v/v) disolvente:medio de cultivo, siguiendo la metodología de Bosmans et al. (2016) con modificaciones. La fase orgánica fue cuidadosamente separada con una pipeta de vidrio, y el procedimiento se repitió para aumentar la eficiencia de la extracción.

A continuación, se incorporó sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de humedad, y la mezcla fue filtrada mediante papel Whatman No. 1 (Merck®, Darmstadt, Alemania). El disolvente fue retirado utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida. El extracto seco obtenido se resuspendió en 1.0 mL de metanol (MeOH) y se filtró con un filtro de jeringa de 0.45 µm. Los extractos fueron almacenados a -20 °C hasta su evaluación. Todos los procedimientos se realizaron por duplicado (Granada, 2019).

La actividad de los extractos se probó frente a *Colletotrichum* sp., *P. cinnamomi* y *Phomopsis* sp. mediante ensayos en microplacas de 96 pozos (Sanmartín et al. 2012; Villamil et al. 2012), midiendo la absorbancia a 595 nm. Se incluyeron controles negativos con agua en lugar de extracto y todos los tratamientos se realizaron por cuadruplicado. Las lecturas se tomaron después de 5 días de incubación a 24°C. Los datos se analizaron mediante ANDEVA con pruebas post-hoc de Tukey utilizando el software en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/anova1u.html>).

Separación, purificación y elucidación estructural de metabolitos

Los metabolitos de *S. marcescens* con actividad inhibidora frente a *P. cinnamomi* fueron aislados mediante un proceso de separación bioguiada. La metodología detallada para la purificación y elucidación estructural de estos compuestos fue descrita por Granada (2019).

Desarrollo y caracterización de bioformulaciones de células bacterianas o sus extractos

Los componentes de la bioformulaciones fueron seleccionados bajo el criterio de que ninguno de ellos fuera una fuente alternativa de carbono o nitrógeno para los fitopatógenos objetivo, con el fin de evitar la estimulación de su crecimiento.

Se desarrolló una emulsión W/O (Water in Oil – agua en aceite) mediante la homogenización de diferentes componentes antibióticos, antifúngicos, espesantes, estabilizadores protectores y dispersantes con un cultivo líquido de la bacteria seleccionada previamente producido durante 48 horas en biorreactor, a una concentración de 10^8 células/mL y 10^9 endosporas/mL.

La homogenización se realizó mediante un método de alta energía con agitación Ultra-Turrax durante 5 minutos. La bioformulaciones desarrolladas fueron almacenadas en botellas de polietileno de alta densidad (HDPE) de 1 L a 27°C.

De igual manera, se probó una formulación en polvo mojable para extractos bacterianos secados con una mezcla de dispersantes y humectantes y acetato de etilo, para formar una primera fase que, posteriormente era mezclada con un aditivo alimentario común que funciona como transportador (carrier) y

sometida a rotaevaporación a 120 mbar hasta que la fase dos se encontraba totalmente secas.

Estabilidad en almacenamiento de las bioformulaciones

La viabilidad de las bacterias en las bioformulaciones almacenadas a 27 °C fue evaluada a los 30, 120 y 180 días posteriores a su preparación. Para ello, se tomaba una alícuota de 1 mL para realizar diluciones seriadas, seguida de siembra en Agar Nutritivo (AN) e incubación a 30°C durante 72 horas. Los experimentos se llevaron a cabo bajo un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones por cada dilución utilizada. La cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) se calculó mediante la siguiente fórmula (Prasad et al. 2020):

$$UFC = \frac{\text{Promedio del número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Peso de la muestra} \times \text{Alícuota tomada}}$$

El porcentaje de pureza microbiológica se analizó en placas con agar nutritivo (AN) y agar papa dextrosa (PDA), identificando el número de morfotipos y sus características macroscópicas y microscópicas, relacionadas tanto con las bacterias formuladas como con posibles bacterias y hongos contaminantes.

Además, se evaluaron propiedades fisicoquímicas como pH y densidad. Para ello, los envases con las bioformulaciones fueron agitados adecuadamente para garantizar la dispersión uniforme de los componentes en el líquido, tras lo cual se registraron los valores de pH y densidad. Cada experimento se realizó con cinco repeticiones.

Finalmente, se confirmó la actividad biológica de las formulaciones frente a los fitopatógenos, midiendo el crecimiento de los hongos en PDA suplementado con 0.1 mL de las formulaciones por cada 100 mL de medio. El diámetro micelial se registró diariamente durante cuatro días. Como control negativo, se evaluó el crecimiento de los fitopatógenos en PDA sin formulación.

Pruebas de citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad

Prueba de proliferación celular en la línea HaCat: MTT

Para evaluar la citotoxicidad de las bioformulaciones, se emplearon células queratinocíticas humanas inmortalizadas HaCat (ATCC® PTA-1499™). Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (FBS), penicilina y estreptomycin, en una atmósfera húmeda con CO₂ a 37 °C (Sarin et al. 2021). La viabilidad celular tras la exposición a la bioformulación se utilizó como indicador de citotoxicidad. Esta se determinó midiendo la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa sobre el sustrato MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro] (Sigma®-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), lo que genera un cambio de color debido a la formación de cristales de formazán.

Evaluación de genotoxicidad mediante electroforesis alcalina de células individuales (*Comet Assay*)

La genotoxicidad de las bioformulaciones se evaluó mediante el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales (*Comet Assay*), una técnica capaz de detectar rupturas de cadena sencilla en el ADN (SSBs), sitios lábiles en condiciones alcalinas, entrecruzamientos ADN-ADN y SSBs asociados a sitios de reparación incompleta (Tice et al. 2000).

Se sembraron 30.000 células por pozo y se trataron con concentraciones subletales de la bioformulaciones durante 24 horas. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno, mientras que los controles negativos fueron solución tampón PBS 1X (libre de calcio y magnesio) y células no tratadas. La viabilidad celular fue evaluada mediante tinción con azul de tripano, asegurando que fuera superior al 85%.

Después de la electroforesis, las células fueron teñidas y analizadas individualmente mediante microscopía de fluorescencia a 40X (Olive y Banáth, 2006). El parámetro de daño utilizado como indicador de daño del ADN de células expuestas a los tratamientos, fue la "longitud del cometa", medida con un micrómetro en 100 células seleccionadas aleatoriamente. Se establecieron cinco categorías o niveles de daño: sin daño (0-12 µm), daño bajo (13-35 µm), daño medio (36-58 µm), daño alto (58-82 µm) y daño total (>100 µm) (Rodríguez et al. 2002).

Prueba de mutagenicidad (*Test de Ames*)

Se emplearon cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) para evaluar la actividad mutagénica de las bioformulaciones. La cepa TA98 permite identificar mutaciones por corrimiento de marco de lectura (frameshift), mientras que la cepa TA100 detecta mutaciones puntuales en diferentes genes del operón de histidina. Estas mutaciones fueron diseñadas para ser sensibles a agentes mutagénicos que actúan mediante diversos mecanismos (Mortelmans y Zeiger, 2000).

El efecto mutagénico se evaluó en presencia y ausencia de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, específicamente oxigenasas del citocromo P450 (CYP), contenidas en la fracción microsomal (S9) de hígado de rata macho (Moltox, Molecular Toxicology, Inc) a una concentración del 10 %. Como controles positivos, se emplearon daunomicina para la cepa TA98 y 4-nitroquinolina (4NQ) para la cepa TA100.

Inicialmente, las cepas TA98 y TA100 se cultivaron individualmente y alícuotas de cada cultivo bacteriano fueron tratadas con concentraciones distintas de las bioformulaciones y S9 o PBS. Posteriormente, se determinó el número de colonias revertantes y se calculó el índice de mutagenicidad (IM) mediante la ecuación:

$$IM = \frac{\text{Número promedio de colonias revertantes por tratamiento}}{\text{Número promedio de colonias revertantes del control negativo}}$$

Las bioformulaciones en estudio se clasificaron según su índice de mutagenicidad en tres categorías: fuertemente mutagénico (IM > 2), débilmente mutagénico (IM entre 1 y 2) y no mutagénico (IM ≤ 1).

Pruebas de eficacia *in situ* en ambientes relevantes

Pruebas de eficacia en cultivos exportadores de aguacate

Para evaluar la capacidad de las formulaciones a base de las bacterias y/o sus extractos para prevenir la aparición de enfermedades en fruto, se realizaron aplicaciones en dos cultivos exportadores seleccionados en etapa de floración y que fueron tratados y monitoreados hasta la cosecha (Predio #1 y Predio #2). Posteriormente, los frutos de los árboles tratados fueron cosechados y

trasladados al laboratorio de UFCB, donde se incubaron a temperatura ambiente hasta una ligera sobremaduración. Se evaluó la incidencia de *Body Rot* (pudrición en pulpa) y *Stem End Rot* (pudrición de pedúnculo) mediante cortes longitudinales en los frutos. Los tratamientos aplicados fueron la emulsión de *B. velezensis* HOB008-290 (Bacilo CIB), producto de control químico comercial, producto de control biológico comercial y agua como control absoluto. Cada tratamiento fue aplicado en por lo menos 5 árboles, y se analizaron por lo menos 20 frutos por tratamiento.

Pruebas de eficacia en condiciones de planta empacadora

Para evaluar la eficacia de las bioformulaciones de *B. velezensis* HOB008-290 y el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 en condiciones similares a las de una planta empacadora, se seleccionaron frutos de aguacate Hass de calidad de exportación, recién cosechados y sin tratamientos poscosecha. Los tratamientos se aplicaron siguiendo un protocolo estandarizado de inmersión durante 2 minutos, seguido de aspersion manual homogénea con 100 mL de la misma solución sobre cada grupo de frutos. Los tratamientos ensayados se detallan en la Tabla 3.1 e incluyeron aplicaciones individuales y combinadas de los bioproductos, así como controles químicos y absolutos.

Tabla 3.1

Tratamientos aplicados en condiciones de planta empacadora

	Tratamiento	Inmersión	Aspersion
T1	Control (Agua)		Control (Agua)
T2		Emulsión <i>B. velezensis</i> (8 mL/L)	Emulsión <i>B. velezensis</i> (8 mL/L)
T3		Emulsión <i>B. velezensis</i> (8 mL/L)	Extracto ARP5.1 (0.8 g/L)
T4		Extracto ARP5.1 (0.8 g/L)	Extracto ARP5.1 (0.8 g/L)
T5	Control (Manejo convencional con Procloraz) (1 ml/L)		Control (Manejo convencional con Sulfato de cobre pentahidratado) (1 ml/L)

Fuente: Elaboración propia

Cada tratamiento se aplicó sobre un lote de al menos 20 frutos distribuidos en dos repeticiones. Tras la aplicación, los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente (22–25 °C) y monitoreados hasta alcanzar una ligera sobremaduración (7–10 días). La eficacia fue determinada con base en la

incidencia porcentual de *Body Rot* (pudrición en pulpa) y *Stem End Rot* (pudrición en pedúnculo), evaluadas mediante cortes longitudinales e inspección visual de síntomas.

Resultados y discusión

Caracterización de los microorganismos aislados

Entre los 667 microorganismos aislados (bacterias y hongos) a partir de las diferentes muestras (suelo rizosférico, raíces, hojas, flores, frutos) de cultivos de aguacate del departamento de Antioquia (Colombia), se cuentan tanto microorganismos patógenos como con potencial benéfico por sus capacidades como biocontroladores, biofertilizantes, bioestimulantes, etc. Algunos de estos microorganismos han sido depositados en la colección de microorganismos inscrita en el Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas (RNC) del Instituto von Humboldt (MicroCIB #223) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2

Microorganismos aislados de cultivos comerciales de aguacate

Origen	Tipo	Actividad	#
Raíz	Oomicete	Patógeno	98
Raíz	Hongo	Patógeno	3
Fruto	Hongo	Patógeno	17
Rizósfera	Bacteria	Benéfico	158
Hoja	Bacteria	Benéfico	1

Fuente: Elaboración propia

Entre los patógenos radiculares identificados en este estudio se encuentran *P. cinnamomi*, *Cylindrocladiella* sp. e *Ilyonectria* sp., mientras que entre los patógenos de fruto se detectaron *L. theobromae*, *Pestalotiopsis* sp., *Diaporthe sojajae* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Por otro lado, los microorganismos con potencial benéfico incluyen especies del género *Bacillus*, como el complejo *B. subtilis* y *B. siamensis*, así como *S. marcescens* y *S. plymuthica*. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Tzec et al. (2020) en cultivos de aguacate de México, donde identificaron bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) de los géneros *Bacillus* y *Serratia*.

Además, estos autores describieron la producción de compuestos bioactivos por cepas de *Stenotrophomonas* sp. y la actividad entomopatógena de una cepa de *Chryseobacterium* sp. contra el trips del aguacate (*Scirtothrips perseae*).

De manera similar, Guevara et al. (2017) identificaron bacterias de la rizosfera de árboles de aguacate en California (EE.UU.) con capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos relevantes para el cultivo, como *Fusarium euwallaceae*, *Graphium* sp. y *P. cinnamomi*. Estas bacterias pertenecían al complejo *B. subtilis*, y además se registró un aislamiento interesante de *B. mycoides*, que inhibió el crecimiento de *P. cinnamomi* hasta en un 25%.

Ensayos *in vitro* de antagonismo

Entre las cepas aisladas en los proyectos de investigación del grupo, *S. marcescens* ARP5.1 y sus extractos han mostrado el mayor potencial para inhibir al oomicete *P. cinnamomi*, principal agente causal del complejo marchitez en el aguacate (Tabla 3.3) (Granada et al. 2018). Por otro lado, *B. velezensis* HOB008-290 ha demostrado un alto potencial para reducir la incidencia de enfermedades del fruto de aguacate en la poscosecha, inhibiendo patógenos como *C. gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. y *L. theobromae* (Montoya, 2021).

Tabla 3.3

Concentración Mínima Inhibitoria *in vitro* del extracto de *S. marcescens* ARP5.1 frente a *C. gloeosporioides* y *P. cinnamomi* después de 7 días de incubación. SD: desviación estándar; Δ OD: diferencia de densidad óptica a 595 nm

<i>C. gloeosporioides</i>			<i>P. cinnamomi</i>		
Concentración del extracto ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Δ OD	SD	Concentración del extracto ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Δ OD	SD
1000.0	0.021	± 0.009	50.0	0.052	± 0.034
500.0	0.043	± 0.041	25.0	0.053	± 0.039
250.0	0.041	± 0.051	12.5	0.046	± 0.042
125.0	0.082	± 0.053	6.3	0.078	± 0.053
62.5	0.123	± 0.111	3.1	0.117	± 0.091
31.1	0.256	± 0.123	1.6	0.351	± 0.123
15.6	0.531	± 0.163	0.8	0.741	± 0.136
Control	1.596	± 0.142	Control	0.864	± 0.125

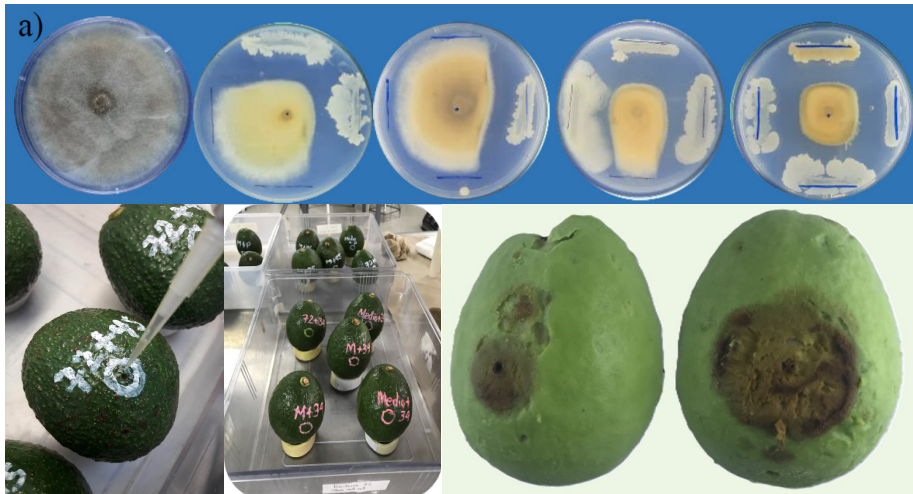
Fuente: Elaboración propia

Pruebas de eficacia *in vivo* en condiciones de laboratorio

En experimentos *in vivo*, cuando los frutos fueron inoculados mediante heridas, *B. velezensis* HOB008-290 logró una protección promedio del 34.4% frente a *C. gloeosporioides* y del 100% frente a *L. theobromae*. En frutos con infección natural, la aplicación de *B. velezensis* HOB008-290 a una concentración de 1×10^8 células/mL redujo el desarrollo promedio de *Body Rot* al 0.37% y previno completamente el desarrollo de *Stem End Rot* (Figura 3.1).

Figura 3.1

Pruebas de antagonismo. a) In vitro: Enfrentamiento de C. gloeosporioides con bacterias aisladas. b) In vivo: Inoculación de C. gloeosporioides en aguacates tratados con bacterias biocontroladoras



Fuente: Elaboración propia

Optimización de la producción de antagonistas bacterianos

Según lo reportaron Granada y colaboradores en 2018, la producción de compuestos bioactivos por *S. marcescens* ARP5.1 ocurrió principalmente, pero no exclusivamente, durante la fase estacionaria del cultivo. Las mejores fuentes de carbono y nitrógeno fueron maltosa y extracto de levadura, en concentraciones del 1% y 0.25%, respectivamente. Después de 20 horas, la fermentación alcanzó su máxima concentración de biomasa (4.8 g L^{-1}) y la

mayor actividad inhibitoria contra el patógeno (*P. cinnamomi*). Además, la actividad inhibitoria se mantuvo constante entre las 20 y 96 horas de fermentación (Tabla 3.4).

Tabla 3.4

Parámetros de fermentación en un biorreactor de tanque agitado para S. marcescens ARP5.1 bajo diferentes condiciones operativas (Granada et al. 2018)

Parámetro	150 rpm / 0.5 vvm	300 rpm / 0.5 vvm	450 rpm / 1.5 vvm	600 rpm / 0.5 vvm	600 rpm / 0.0 vvm
M	0.22	0.16	0.19	0.30	0.05
Td	3.15	4.33	3.67	2.31	13.86
Y _{x/s}	0.84	0.86	0.90	0.84	0.18
%DO _{min}	0.0	0.0	49.9	42.8	0.0
X _{max}	4.8	4.92	5.24	3.63	1.08

Nota: Nomenclatura: μ : tasa de crecimiento celular específica (h^{-1}), t_d : tiempo de duplicación del cultivo celular (h), X_{max} : concentración máxima de biomasa ($g L^{-1}$), $Y_{x/s}$: rendimiento de biomasa (adimensional), %DO_{min}: porcentaje mínimo de oxígeno disuelto ($g O_2 L^{-1}$).

Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, la velocidad de agitación más adecuada para la producción de compuestos bioactivos por *S. marcescens* ARP5.1 fue 450 rpm. En cuanto a la aireación, se encontró que la producción de compuestos activos de interés (Serratamolide A, Prodigiosin y Haterumalide NA) era dependiente del oxígeno, pero no se establecieron diferencias en las actividades inhibitorias entre 0.5, 1.0 y 1.5 vvm (Granada et al. 2018). El trabajo de Granada et al. (2018) representa el primer reporte del efecto del oxígeno disuelto en la producción de metabolitos secundarios en *S. marcescens*, registrando una reducción significativa en la actividad del extracto cuando se utilizaron condiciones de baja o nula aireación en las fermentaciones de *S. marcescens* ARP5.1. Wang et al. (2024) también buscaron optimizar los componentes del medio de cultivo de *S. marcescens* para incrementar la producción de Prodigiosina (PG) mediante metodología de superficie de respuesta. La composición óptima del medio fue sacarosa (16.29 g/L), peptona (11.76 g/L), Tween 80 (2.64 g/L), $MgSO_4$ y $FeSO_4$ (2 g/L) y prolina (1 g/L), con un pH de 7.2–7.4. Estas condiciones permitieron un aumento de 65 veces en la producción de PG, alcanzando una

concentración de 1653.95 ± 32.12 mg/L. Mientras que las condiciones óptimas de extracción fueron una relación solvente/líquido de fermentación de 9.12:1, una temperatura de extracción de 25.35 °C y un tiempo de extracción de 30.33 minutos. Se utilizó metanol al 100 % (pH = 2) como solvente, lo que resultó en una producción final de PG de 2142.75 ± 12.55 mg/L.

Con respecto a la producción de *B. velezensis* HOB008-290, los resultados indicaron que las fuentes de carbono más eficientes fueron la sacarosa y el glicerol, optándose por la sacarosa debido a su menor costo y menor viscosidad, lo que facilita su manipulación en procesos industriales. En cuanto a la fuente de nitrógeno, la caseína presentó el mejor desempeño. Las condiciones óptimas de fermentación, establecidas en 30 °C y 190 rpm durante 48 horas, permitieron alcanzar una alta concentración de endosporas (3×10^{10} esporas/mL), lo que sugiere su viabilidad para la producción a escala industrial (Montoya, 2021).

Desarrollo y caracterización de bioformulaciones de células bacterianas o sus extractos

La bioformulación líquida de *B. velezensis* HOB008-290 se obtuvo como una emulsión homogénea, de consistencia cremosa, sin olor y de color beige. El análisis del tamaño de partícula mostró un diámetro promedio en área de 0.86 μm y en volumen de 1.87 μm . El potencial zeta de -39 mV sugiere un sistema coloidalmente metaestable. Además, el ángulo de contacto de avance de 79° indica una interacción predominantemente hidrofílica con tendencia hidrofóbica, mientras que la tensión superficial de 34 mN/m permitió calcular un trabajo de adhesión de 40.5 mJ/m² con la cáscara de aguacate, utilizando la ecuación de Young-Dupré.

En cuanto a la estabilidad del producto, se evaluaron lotes almacenados por hasta seis meses, manteniéndose parámetros como pH (6.0-7.0), densidad (0.992-1.011 g/mL) y ausencia de contaminantes. La concentración celular y de endosporas osciló entre 2×10^{12} y 2×10^{13} UFC/mL, con una actividad antagonista frente a *C. gloeosporioides* del 90 al 100 % según la dosis aplicada (1-3 mL/L). Estos resultados confirman la estabilidad y efectividad del bioformulado a lo largo del tiempo.

Pruebas de citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad

Prueba de proliferación celular en la línea HaCat: MTT

Con el extracto metabólico de *S. marcescens* ARP5.1, la viabilidad celular disminuyó por debajo del 50% entre 3.05 y 25.000 ppm, pero concentraciones menores a 1.53 ppm no afectaron la estabilidad mitocondrial. En el caso del Procloraz estándar, usado como control, el compuesto redujo la viabilidad celular en concentraciones de 0.019 ppm y superiores a 1.25 ppm, mientras que concentraciones inferiores a 0.0095 ppm no mostraron citotoxicidad. Se observó que el solvente (DMSO) podría influir en la citotoxicidad a concentraciones más altas.

Por otro lado, el extracto metabólico de *B. velezensis* HOB008-290 mostró una disminución en la viabilidad celular a partir de 0.071 g/mL, mientras que concentraciones inferiores a 0.036 g/mL no fueron citotóxicas. En cuanto a la emulsión, solo la concentración más alta (100%) redujo drásticamente la viabilidad, lo que sugiere que la toxicidad podría deberse a la emulsión en sí o a su solvente.

Evaluación de genotoxicidad mediante electroforesis alcalina de células individuales (*Comet Assay*)

Tanto el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 como el estándar de Procloraz causaron daño en el ADN en comparación con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$). Sin embargo, más del 95% de las células tratadas con Procloraz estándar no presentaron daño detectable, mientras que con el extracto de *S. marcescens* ARP5.1, aproximadamente el 75% de las células no mostraron daño y el 25% restante presentó daño leve. Estos resultados sugieren que el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 podría inducir una mayor frecuencia de daño en el ADN en comparación con el Procloraz estándar.

En el caso de *B. velezensis* HOB008-290, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo, lo que indica que ni el extracto bacteriano ni la emulsión causaron daño al ADN en las células HaCat. Además, el 100% de las células tratadas con ambas formulaciones se clasificaron en la categoría “sin daño”.

Prueba de mutagenicidad (*Test de Ames*)

El extracto de *S. marcescens* ARP5.1 no mostró citotoxicidad en ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que el Procloraz estándar presentó citotoxicidad solo a 10 ppm. En ambos casos, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas en la tasa de reversión mutagénica en presencia o ausencia de activación metabólica, lo que indica que los compuestos no presentan potencial mutagénico en las condiciones del ensayo.

Además, el test de Ames mostró que ni el extracto metabólico de *B. velezensis* HOB008-290 ni su formulación presentaron efectos mutagénicos en las cepas *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica, sin diferencias significativas respecto al control negativo.

Lo anterior, indica que el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 no es mutagénico en el test de Ames, pero sí muestra cierto nivel de citotoxicidad y daño en el ADN en células humanas en cultivo. Su seguridad dependerá de la concentración utilizada y del tipo de exposición. Para considerarlo seguro en aplicaciones humanas o ambientales, se necesitarían estudios adicionales sobre su metabolismo, reparación del daño en el ADN y efectos en modelos más complejos. Mientras que tanto el extracto metabólico de *B. velezensis* HOB008-290 como su emulsión son seguros en las concentraciones evaluadas, sin efectos mutagénicos ni daño en el ADN. Solo la concentración más alta de la emulsión mostró citotoxicidad, lo que sugiere que su seguridad depende de la dosis y de los componentes de la formulación.

En comparación con otros bioinsumos del mercado, la emulsión de *B. velezensis* HOB008-290 y el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 presentan perfiles de seguridad diferenciados. La emulsión mostró alta estabilidad y efectividad en el control de *C. gloeosporioides*, sin efectos mutagénicos ni daño en el ADN en células humanas, aunque su citotoxicidad en concentraciones elevadas sugiere que su formulación debe ajustarse para garantizar su inocuidad. Por otro lado, el extracto de *S. marcescens* ARP5.1, aunque no presentó mutagenicidad en el test de Ames, mostró citotoxicidad en concentraciones superiores a 3.05 ppm y causó daño en el ADN en un 25% de las células evaluadas en el ensayo cometa, lo que indica un mayor riesgo genotóxico.

Desde el punto de vista regulatorio, ambos productos deben cumplir con normativas estrictas para su aprobación como bioinsumos agrícolas. La ausencia de mutagenicidad y genotoxicidad en *B. velezensis* HOB008-290 respalda su

potencial para ser registrado bajo regulaciones como las de la EPA (EE.UU.) y la EFSA (Unión Europea), aunque su formulación deberá optimizarse para evitar citotoxicidad en dosis elevadas. En contraste, el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 podría enfrentar mayores restricciones debido a su posible efecto genotóxico, ya que la legislación internacional prioriza la seguridad de los bioinsumos en términos de toxicidad y riesgo ambiental.

Para su posible aplicación en la agroindustria, se requieren estudios adicionales que evalúen el metabolismo de ambos productos en diferentes condiciones, su impacto en organismos no objetivo y la persistencia en el ambiente. Mientras que *B. velezensis* HOB008-290 muestra un perfil más seguro para su desarrollo comercial, el extracto de *S. marcescens* ARP5.1 necesitaría una caracterización más profunda de sus efectos a largo plazo y posibles estrategias de reformulación para reducir su citotoxicidad y genotoxicidad.

Pruebas de eficacia *in situ* en ambientes relevantes

Pruebas de eficacia en cultivos exportadores de aguacate

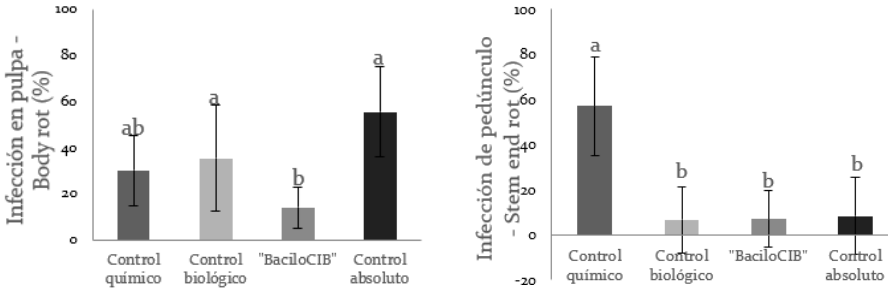
En el predio 1, los resultados mostraron que la bioformulación de *B. velezensis* HOB008-290 logró prevenir la pudrición en pulpa con una eficacia significativamente mayor que los controles químicos y biológicos. Sin embargo, debido a la baja prevalencia de la pudrición en pedúnculo en esta finca, no fue posible determinar su efecto sobre esta enfermedad. Se observó que el tratamiento químico con oxiclورو de cobre podría haber inducido toxicidad en los frutos, generando síntomas similares a los de la infección fúngica (Figura 3.2).

En el predio #2, la bioformulación de *B. velezensis* HOB008-290 nuevamente mostró una alta eficacia en la prevención de infecciones en pulpa, con niveles comparables al control biológico comercial. Además, a diferencia del primer predio, se evidenció un efecto positivo en la reducción de la pudrición peduncular, lo que sugiere que su incidencia pudo haber sido mayor en esta finca (Figura 3.3).

A pesar de la variabilidad observada entre predios, atribuida a diferencias en condiciones climáticas, especies patógenas predominantes y manejo agronómico, los resultados demuestran que el prototipo de formulado a base de *B. velezensis* HOB008-290 tiene un alto potencial como estrategia biológica preventiva contra la antracnosis en aguacate Hass durante la poscosecha.

Figura 3.2

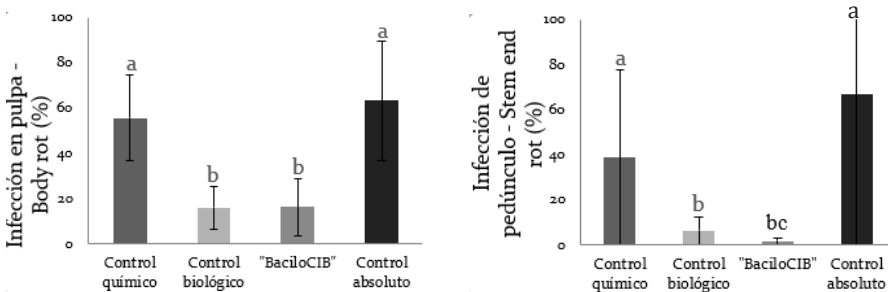
Efecto de los tratamientos para la prevención de Body Rot y Stem End Rot en el predio #1. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), seguida de prueba post-hoc de comparaciones múltiples. Control químico: oxiclóruo de cobre; Control biológico: formulado comercial a base de *B. subtilis*; BaciloCIB: formulación con *B. velezensis* HOB008-290; Control absoluto: sin tratamiento



Fuente: Elaboración propia

Figura 3.3

Efecto de los tratamientos para la prevención de Body Rot y Stem End Rot en el predio #2. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), seguida de prueba post-hoc de comparaciones múltiples. Control químico: oxiclóruo de cobre; Control biológico: formulado comercial a base de *B. subtilis*; BaciloCIB: formulación con *B. velezensis* HOB008-290; Control absoluto: sin tratamiento



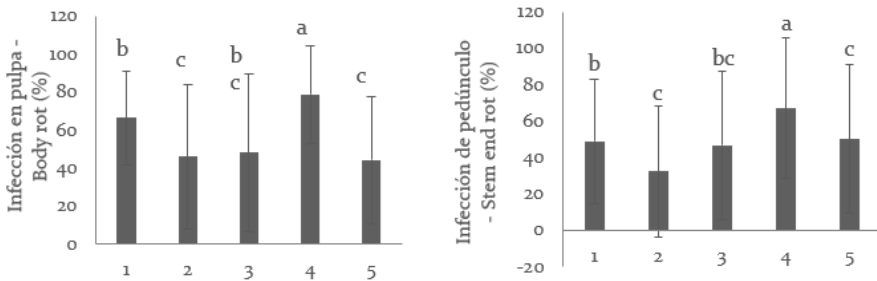
Fuente: Elaboración propia

Pruebas de eficacia en condiciones de planta empacadora

En este experimento, la bioformulación de *B. velezensis* HOB008-290 aplicada en inmersión y aspersión (T2) logró una reducción significativa de *Body Rot*, con un nivel de control comparable al tratamiento químico estándar (T5). Además, fue el tratamiento más efectivo en la disminución de *Stem End Rot*, con una incidencia del 32.24%, lo que indica su potencial en el manejo poscosecha del aguacate (Figura 3.4).

Figura 3.4

*Efecto de los tratamientos para el control de Body Rot y Stem End Rot en la poscosecha. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), seguida de prueba post-hoc de comparaciones múltiples. 1. Agua-Agua; 2. BaciloCIB (8mL/L)-BaciloCIB (8mL/L); 3. Emulsión de *B. velezensis* (8ml/L)-Extracto de *S. marcescens* (0.8 g/L). 4. Extracto de *S. marcescens* (0.8 g/L) Extracto Extracto de *S. marcescens* (0.8 g/L) 5. Procloraz (1ml/L)- Sulfato de cobre pentahidratado (1 ml/L)*



Fuente: Elaboración propia

En general, los resultados obtenidos en esta etapa de desarrollo indican que la bioformulación de *B. velezensis* HOB008-290, aplicada sola o en combinación con extractos biológicos, tiene un alto potencial como estrategia preventiva en campo y para el manejo poscosecha del aguacate, alcanzando niveles de control comparables a los tratamientos químicos convencionales. No obstante, su efectividad puede verse afectada por la interacción con otros productos, lo que hace necesario optimizar su formulación y protocolo de aplicación para su implementación a escala comercial. Además, entre las formulaciones evaluadas, esta presenta el mayor potencial comercial, no solo

a nivel técnico, sino también por estudios de mercado y análisis de costos que se han adelantado, aunque no son objeto del presente documento.

Conclusiones

El desarrollo de bioinsumos eficaces y de alta calidad requiere un proceso de investigación riguroso que abarque desde la identificación de microorganismos con potencial biocontrolador hasta la validación de su efectividad en condiciones reales de campo y poscosecha. En este estudio, la bioformulación a base de *B. velezensis* HOB008-290 demostró ser una alternativa viable para el manejo preventivo y poscosecha del aguacate, alcanzando niveles de control comparables a los tratamientos químicos convencionales. Sin embargo, su desempeño puede verse influenciado por factores como la interacción con otros productos y las condiciones de aplicación, lo que resalta la importancia de optimizar su formulación y protocolo de uso antes de su escalamiento comercial.

Estos resultados evidencian que la bioprospección, el diseño racional de formulaciones y la evaluación *in vitro* e *in vivo* son pasos fundamentales en el desarrollo de bioinsumos que sean no solo efectivos, sino también seguros y competitivos en el mercado. La integración de metodologías avanzadas para caracterización microbiológica, estabilidad de formulaciones y evaluación toxicológica permite garantizar que estos productos cumplan con los estándares de calidad y normativas vigentes, facilitando su aceptación en la agroindustria.

En este sentido, la inversión en investigación y desarrollo es clave para ofrecer soluciones innovadoras que reduzcan la dependencia de agroquímicos, contribuyan a la sostenibilidad agrícola y respondan a las crecientes exigencias del mercado en términos de eficacia, seguridad y viabilidad económica.

Referencias

Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., ... & Babalola, O. O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1040901.

- Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., ... & Andrade, G. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, 653-664.
- Bosmans, L., Bruijn, I., Mot, R., Rediers, H., & Lievens, B. (2016). Agar composition affects *in vitro* screening of biocontrol activity of antagonistic microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 7-9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.004>
- Calle, C., Gonzales, E. P., Arango, R. E., & Saldamando, C. I. (2020). Isolation and identification of *Phytophthora cinnamomi* collected in avocado (*Persea americana*) from Northeast Colombia. *Tropical Plant Pathology*, 45, 402-414.
- Cañas, G. P., & Arango, R. E. (2019). Microsatellites revealed genetic diversity and population structure in Colombian avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm collection and its natural populations. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 11(4), 106-119.
- Cañas, G. P., Sepulveda, S., López, F., Navas, A. A., & Cortés, A. J. (2022). Inheritance of yield components and morphological traits in avocado cv. Hass from “criollo” “elite trees” via half-sib seedling rootstocks. *Frontiers in plant science*, 13, 843099.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones, S., Sturrock, S., Thierer, T. & Wilson, A. (2012) accession date Geneious, v5.4. <http://www.geneious.com>
- Granada, S. D., Ramírez, S., López, L., Peláez, C. A., & Bedoya, J. C. (2018). Screening of a biological control bacterium to fight avocado diseases: from agroecosystem to bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 109-115.
- Granada, S. D. (2019). Metabolitos secundarios microbianos como alternativa de control frente a fitopatógenos del aguacate (*Persea americana* Mill.) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia (UNAL)).
- Granada García, S.D., Rueda Lorza, A., Peláez, C.A., (2014). Antimicrobial activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria isolated from potato (*Solanum phureja*) crops. *Summa Phytopathol*, 40, 212-220. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1953>

- Granada, S. D., López, L., Ramírez, S., Morales, J., Peláez, C., Andrade, G., & Bedoya, J. C. (2020). Bacterial extracts and bioformulates as a promising control of fruit body rot and root rot in avocado cv. Hass. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(3), 748-758.
- Guevara, E., Carrillo, J. D., Ndinga, C. et al. (2018). Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, 563-572. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
- Hamada, M. A., & Mohamed, E. T. (2024). Characterization of *Serratia marcescens* (OK482790) prodigiosin along with *in vitro* and *in silico* validation for its medicinal bioactivities. *BMC Microbiology*, 24, 495. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03634-5>
- Harch, S. A. J., Jenkins, F., Farhat, R., & van Hal, S. J. (2025). Complexities in species identification for *Serratia marcescens* complex for the modern microbiology laboratory. *Microbiology Spectrum*, 13, e01361-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01361-24>.
- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Michoud, G., & Daffonchio, D. (2018). Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*, 6, 1-17.
- Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (2021). Convocatoria para el apoyo a programas y proyectos de I+D+i que contribuyan a resolver los desafíos establecidos en la misión "Bioeconomía para una Colombia potencia viva y diversa hacia una sociedad impulsada por el conocimiento". https://minciencias.gov.co/sites/default/files/upload/convocatoria/anexo_9_-_niveles_de_madurez_tecnologica_-_trl.pdf
- Montoya, M. P. (2021). Evaluación de bacterias antagonistas para el control de enfermedades en poscosecha de aguacate Hass. [Trabajo de pregrado no publicado]. Universidad de Antioquia.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2), 29-60.
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23-29.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2025). *Avocado production*. <https://ourworldindata.org/grapher/avocado-production?tab=table&time=2014..latest&mapSelect=~COL&tableFilter=countries>
- Prasad, R. D., Chandrika, K. S. V. P., & Godbole, V. (2020). A novel chitosan biopolymer based *Trichoderma* delivery system: Storage stability, persistence and bio efficacy against seed and soil borne diseases of oil seed crops. *Microbiological research*, 237, 126487.
- Ramírez, S., Arias, J. D., Bedoya, J. C., Rueda, E. A., Sánchez, Y., & Granada, S. D. (2015). Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens *in vitro*. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 58-63.
- Ramírez, J. G., & Morales, J. G. (2021). Diseases and disorders associated with different stages of crop development and factors that determine the incidence in Hass avocado crops. *Revista Ceres*, 68(1), 71-82.
- Ramírez, S., Calle, C., Arbeláez, L. M., Bedoya, J. C., Hoyos, R. A., & Granada, S. D. (2021). Siderophore containing extract from *Serratia plymuthica* AED38 as an efficient strategy against avocado root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Biocontrol Science and Technology*, 31(3), 284-298.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of cleaner production*, 283, 124657.
- Rodríguez, G., Cancino, L., López, M., Palermo, A., Mudry, M., González, P., & Carballo, M. A. (2002). DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicology Letters*, 132(2), 109–115.
- Sanmartín, P., López X., Pemberthy, M. P., Granada, D. & Rueda, E.A. (2012). Análisis del modo de acción de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Rev. Tumbaga*, 2, 29-49.
- Sarin, J., Vuorenmaa, M., Vallittu, P. K., Grénman, R., Boström, P., Riihilä, P., ... & Pulkkinen, J. (2021). The viability and growth of HaCaT

cells after exposure to bioactive glass S53P4-containing cell culture media. *Otology & Neurotology*, 42(5), e559-e567.

- Talavera, A., Gonzalez, J.J., Carrasco, A., Olmo, L., & Hormaza, J.I. (2023). Avocado: Agricultural Importance and Nutraceutical Properties. In: Kole, C. (eds) *Compendium of Crop Genome Designing for Nutraceuticals*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-3627-2_40-1
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., et al. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-21.
- Tzec, J. A., Desgarenes D., Carrión, G., Monribot, J. L., Guerrero, J. A., Ferrera, O., et al. (2020). Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (*Persea americana* Miller) and their potential use in the biocontrol of *Scirtothrips perseae* (avocado thrips). *PLoS ONE*, 15(4): e0231215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231215>
- Villamil, J. E., Blanco, J. O. & Viteri, S. E. (2012). Evaluación *in vitro* de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6305-6315.
- Wang, X., Cui, Z., Zhang, Z., Zhao, J., Liu, X., Meng, G., ... & Zhang, J. (2024). Two-Step Optimization for Improving Prodigiosin Production Using a Fermentation Medium for *Serratia marcescens* and an Extraction Process. *Fermentation*, 10(2), 85.