

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* nativas de suelos de
la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro
*Tetranychus urticae***

Ana Cristina Narváez Casanova

Antonio León, Ph.D., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Ingeniera en Agroempresas

Quito, mayo 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* nativas de suelos de la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro *Tetranychus urticae*

Ana Cristina Narváez Casanova

Antonio León, Ph.D.
Director de la tesis

Mario Caviedes C, Ms. Dr.
Coordinador de Ingeniería
en Agroempresas

Carlos Ruales, MSc.
Miembro del Comité de Tesis

Eduardo Uzcátegui, Ph.D.
Miembro de Comité de Tesis

Ximena Córdova, Ph.D
Decana de la Escuela de Ingeniería
Colegio Politécnico

Quito, Mayo 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Ana Cristina Narváez

C. I.: 0401503297

Fecha: Mayo, 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a las empresas agrícolas que me permitieron tomar las muestras de suelo de sus cultivos. A las florícolas Agritab-Farms, Ponte-Tresa y Attar Roses y a la empresa de cítricos Citrus Apianda. También agradezco a Antonio León, por el conocimiento y tiempo dedicado a esta investigación y por el apoyo brindado. Agradezco también al personal del laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos de la USFQ, por la asesoría y la paciencia. Gracias compañeros del laboratorio por hacer este camino más ameno. Gracias Cristhian Moreno por la ayuda incondicional, la paciencia y asesoría. Finalmente agradezco a mis padres y hermano por toda la paciencia y acompañamiento durante este proceso.

RESUMEN

En la presente investigación se planteo aislar cepas de *Bacillus* nativas de suelos y compost de la provincia de Pichincha, y comprobar el efecto acaricida de estos aislados hacia *Tetranychus urticae*. Este estudio es la primero de este tipo en el Ecuador

Se realizaron conteos bacterianos de las ocho muestras recolectadas. Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias significativas en los conteos ($F=3,8$; $p < 0,05$; $gl=7$). En total se obtuvieron 166 aislados que se clasificaron en 15 grupos morfológicos. En general se encontró una gran variación en la diversidad de las bacterias presente en cada muestra y en cada ambiente. Además, se evaluó la acción acaricida, el efecto en la oviposición y el efecto sobre las ninfas de 22 de las bacterias aisladas, incluyendo un control positivo y uno negativo en total se evaluaron 24 tratamientos, con 5 repeticiones por tratamiento. Se evaluaron los datos a las 120 y 168 horas después de la aplicación de los cultivos bacterianos.

De los 22 aislados evaluadas en la capacidad acaricida, las cepas P1.14(B), I1.23(A), C2.4(E) y I1.5(K), mostraron mayor número de individuos muertos, a las 120 horas y estas fueron escogidas como cepas con alto potencial acaricida. Se concluyó que las cepas P1.23(E), C2.4(E), y I1.23(A) tuvieron efecto negativo en la oviposición de las hembras tratadas a las 120 horas. Las cepas C2.4(E) y P1.23(E) mostraron efecto sobre las ninfas a las 168 horas.

La bacteria control BtC y el aislado C2.4(E) se identificaron por medio de secuenciación como *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* lo que se correlaciona con las observaciones por microscopia. El secuenciamiento del aislado I1.5(K) dio como resultado la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, pero esto no concordó con las características fenotípicas de dicho aislados. El aislado P1.14(A) corresponde a *Bacillus subtilis* lo que concuerda con las características fenotípicas de este aislado observado a un aumento de 100x.

ABSTRACT

The goal of this research was isolate native *Bacillus* strains from soils and compost in the province of Pichincha in Ecuador, and to test for acaricidal effect of these isolates against *Tetranychus urticae*. This kind of study is pioneer in Ecuador.

Bacterial counts were conducted for the 8 samples collected. The statistical analysis showed significant differences in bacterial counts ($F=3,8$; $p < 0,05$; $gl=7$). In total 166 isolates were obtained and they were classified into 15 morphological groups. In general there was great variation in the diversity of bacteria present in each sample and each environment.

The variables evaluated were acaricide effect, inhibition of oviposition and the larvicidad action of 22 bacterial isolates. In addition to the positive control BtC and the negative control that was T3 pure medium. A total of 24 treatments were evaluated. Five replicates per treatment were done. Data at 120 and 168 hours after application of the bacterial cultures was evaluated. Of the 22 strains tested on the acaricide effect at 120 hour, isolates P1.14(B), I1.23(A), C2.4(E) and I1.5(K), showed the largest number of dead individuals, these were chosen as strains with high acaricide potential. It was concluded that P1.23 (E), C2.4(E), and I1.23(A) isolates had a negative effect on oviposition of females treated at 120 hours. The C2.4(E) and P1.23(E) strains had an effect in inhibiting nymph's infestation at 168 hours.

The positive control bacteria BtC and C2.4(E) isolate were identified by molecular sequencing as *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*, which correlates with the microscopic observations of these isolates. The sequencing of the isolate I1.5(K) resulted as the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, but this was not consistent with the phenotypic characteristics of this isolated. The isolated P1.14(A) proved to be *Bacillus subtilis* that matches with the phenotypical characteristics observed at 100x magnification.

Índice de Contenido

Agradecimientos	5
Resumen	6
Abstract	7
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas	10
Índice de Figuras	10
Índice de Gráficos.....	11
Índice de Anexos	12
1. Introducción	13
1.1 Antecedentes.....	13
1.2 Justificación.....	17
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. Hipótesis	19
4. Marco Teórico.....	19
4.1 El ácaro <i>Tetranychus urticae</i>	19
4.2 Bacterias del género <i>Bacillus</i>	23
5. Materiales y Métodos	28
5.1 Muestreo	28
5.2 Conteos y Aislamientos	29
5.3 Clasificación en grupos morfológicos	29
5.4 Bioensayos	31
5.4.1 Reproducción de <i>Tetranychus urticae</i>	31
5.4.2 Fermentación de las bacterias.....	31
5.4.3 Aplicación de los tratamientos	31
5.4.4 Bioensayo preliminar.....	32
5.4.5 Bioensayos con aislados bacterianos.....	33
5.4.6 Análisis estadístico	34
5.5 Identificación molecular.....	34
6. Resultados.....	36
6.1 Conteos bacterianos de las muestras de suelos provenientes de 8 localidades	36
6.2 Clasificación de grupos morfológicos	38
6.3 Bioensayos	41
6.3.1 Bioensayos preliminares del efecto de los medios de cultivo en la mortalidad del ácaro <i>T. urticae</i>	41
6.3.2 Bioensayos con aislados bacterianos.....	43
6.3.2.1 Evaluación del efecto acaricida	44
6.3.2.2 Análisis de la oviposición de hembras de <i>T. urticae</i>	46
6.3.2.3 Evaluación del efecto sobre larvas y ninfas	47

6.4 Caracterización Molecular	49
6.4.1 Visualización en geles de agarosa	49
6.4.2 Secuenciamiento	50
7. Discusión.....	53
8. Conclusiones	59
9. Recomendaciones	60
10. Referencias	62
11. Anexos.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1: Listado de los 10 artrópodos más resistentes, con base en el número de ingredientes activos únicos para los que se ha reportado resistencia y el número de casos notificados	16
Tabla 2: Cepas de <i>Bacillus</i> usadas en el manejo de plagas y enfermedades	24
Tabla 3: Reactivos usados para una reacción de PCR de 50 μ l.....	34
Tabla 4: Programa de PCR.....	35
Tabla 5: Clasificación de grupos morfológicos.....	38
Tabla 6: Número de aislados de cada grupo morfológico presentes en cada muestra de suelo analizada.....	40
Tabla 7: Aislados bacterianos escogidos para realizar los bioensayos.....	43
Tabla 8: Resultados del análisis de las secuencias en BLAST.....	53

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de una hembra adulta de <i>Tetranychus urticae</i>	20
Figura 2: Esquema ciclo de vida de <i>Tetranychus urticae</i>	21
Figura 3: Mapa de Pichincha con los sitios de muestreo.....	28
Figura 4: Formula para calcular UFC/ml	29
Figura 5: esquema de posición y forma de la endoespora en bacterias de <i>Bacillus</i>	30
Figura 6: Esquema del protocolo de aplicación de los tratamientos	32
Figura 7: Evaluación y conteo bacteriano de las cajas petri en las que se sembró las diluciones seriadas de las 8 muestras de suelo.	36
Figura 8: Bacterias representativas de cada grupo morfológico.....	39
Figura 9: Evaluación del estado de huevos y ninfas en el medio puro, y los tratamientos de BtC en medio T3 y BtC en medio LB a las 168 horas.....	42
Figura 10: Productos de PCR de las muestras de BtC, P1.14(B), C2.4(E), I1.5(K) y I1.23(A) usando los primers 16SR y 16SF	50
Figura 11: cromatograma en dirección delantera de la secuencia de el aislado C2.4(E) que presento buena calidad.....	51
Figura 12: cromatograma en reverso de la secuencia de el aislado C2.4(E) que presento mala calidad.....	52

Índice de Gráficos

Gráfico 1: tiempo de desarrollo de huevo a adulto dependiendo de la temperatura	21
Gráfico 2: Evaluación de los conteos de UFC/g de las 8 muestras de suelo	37
Gráfico 3: Evaluación del efecto acaricida de BtC en T3 y BtC en LB a las 72, 120 y 168 horas.....	41
Gráfico 4: Evaluación de la acción acaricida de la aplicación de los aislados bacterianos a las 120 horas	44
Gráfico 5: Evaluación de la acción acaricida de la aplicación de los aislados bacterianos a las 168 horas	45
Gráfico 6: Evaluación del efecto en la oviposición a las 120 horas	46
Gráfico 7: Evaluación del efecto en la oviposición a las 168 horas	47
Gráfico 8: Evaluación del efecto sobre larvas y ninfas a las 120 horas	48
Gráfico 9: Evaluación del efecto sobre larvas y ninfas 168 horas	49

Índice de Anexos

Anexo 1: Medios de cultivo usados en esta investigación	67
Anexo 2: Protocolo para realizar tinción Gram	68
Anexo 3: Protocolo para realizar a tinción de endoespora	68
Anexo 4: medición de la concentración de ADN de las muestras que se enviaron a secuenciar	69
Anexo 5: ADEVA evaluación de conteos bacterianos de las 8 muestras de suelo analizadas.....	69
Anexo 6: Fotografías de la tinción Gram y tinción de endoespora de la bacteria control BtC.....	69
Anexo 7: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Compost 1 “Ponte-Tresa”	70
Anexo 8: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Compost 2 “Agritab-Farm”.....	71
Anexo 9: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Páramo 1 “Paluguillo”.....	74
Anexo 10: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Páramo 2 “Cayambe”.....	79
Anexo 11: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Invernadero 1 “Ponte-Tresa”	80
Anexo 12: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Invernadero 2 “Machachi”	83
Anexo 13: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Cultivo 1 “Mora”	84
Anexo 14: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Cultivo 2 “Naranja”	87
Anexo 15: ADEVAs evaluación de efecto acaricida de la bacteria control BtC en medio Lb y BtC en medio T3, a las 72, 120 y 168 horas	89
Anexo 16: ADEVAs evaluación de efecto acaricida de los cultivos bacterianos a las 120 y 168 horas	90
Anexo 17: ADEVAs evaluación del efecto en la oviposición de los huevos cultivos bacterianos a las 120 y 168 horas	90
Anexo 18: ADEVAs evaluación del efecto larvicida de los cultivos bacterianos a las 120 y 168 horas	91
Anexo 19: Cromatograma en delantero de la bacteria control BtC	91
Anexo 20: Cromatograma en reversa de la bacteria control BtC	92
Anexo 21: Cromatograma en delantero del aislado P1.14(B)	92
Anexo 22: Cromatograma en reversa del aislado P1.14(B)	93
Anexo 23: Cromatograma en delantero del aislado I1.5(K).....	93
Anexo 24: Cromatograma en reversa del aislado I1.5(K).....	94

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Los biopesticidas son productos que contienen un microorganismo como ingrediente activo o son compuestos que se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Entre ellos están los enemigos naturales de la plaga, organismos entomopatógenos, pesticidas derivados de las plantas y hormonas de insectos (Attathom, 2002). Pueden estar constituidos por una parte o la totalidad de la sustancia extraída, dicha sustancia o compuesto puede estar concentrada o adicionada a sustancias coadyuvantes (Fernandez y Juncosa, 2002).

El 30 % de todos los biopesticidas son producidos en base a bacterias. De estos la mayoría son formulados en base del género *Bacillus*, y la especie más usada es *Bacillus thuringiensis*, que representa el 70% de las ventas de todos los biopesticidas a base de bacterias (Cawoy y otros, 2011)

Las bacterias del género *Bacillus* son Gram positivas, producen endoesporas y crecen en presencia de O₂. Las endoesporas son generadas por las células vegetativas en respuesta a un factor ambiental limitante de la división celular, generalmente por escases de alimento (Todar, 2012). Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables las endoesporas germinan y producen células vegetativas. Las endoesporas son células muy durables, y en su estado de dormancia pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo, son resistentes a altas temperaturas, radiación, aplicación de ácidos y desinfectantes, entre otros. Debido a la resistencia de las endoesporas estas bacterias son organismos cosmopolitas y se encuentran en la mayoría de ambientes, pero se acepta como su hábitat natural el suelo (Todar, 2012).

La primera referencia de un aislamiento de *Bacillus* data de 1901, cuando el científico japonés Shigetane Ishiwata, aisló una bacteria de larvas de gusanos de seda que habían muerto, a esta bacteria la llamó *Bacillus sotto*. Después, en el año 1911 el científico alemán Ernst Berliner aisló una cepa parecida de larvas muertas de polilla mediterránea de la harina, Berliner observó mediante tinciones unos cuerpos paraesporales adyacentes a la endoespora (Ibrahim y otros, 2010). Veinticinco años después se

descubre que estos cuerpos paraesporales son los responsables de la toxicidad de los *Bacillus* y los llaman cristales paraesporales. Finalmente en el año 1955 Thomas Angus, Philip Fitz-James y Hannay, descubren que los cristales tóxicos son formados por proteínas (Federici y otros, 2006, Ibrahim y otros, 2010). Estas proteínas se cristalizan formando grandes inclusiones paraesporales poliédricas que conforman hasta un 30% del peso seco celular. Cuando el insecto plaga susceptible a la toxina ingiere las inclusiones paraesporales estas se disuelven y las proteínas se rompen liberando las toxinas (Federici y otros, 2006).

El 92% de las bacterias presentes en el suelo corresponde a *Bacillus*, las bacterias de este género han demostrado ser útiles para el biocontrol de plagas y enfermedades (Vardhan y otros, 2013). Varias especies y cepas de *Bacillus* son comercializados como biopesticidas, Tres especies han sido producidas en masa y comercializadas: *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* y *Paenibacillus popilliae*, anteriormente conocida como *Bacillus popilliae* (Molina y otros, 2010). La especie más conocida y usada del género *Bacillus* es *Bacillus thuringiensis*, las toxinas producidas por esta bacteria tienen un bajo rango de acción, por lo tanto no afectan a poblaciones benéficas (Molina y otros, 2010). *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), fue usado por primera vez para control de plagas en 1920, luego en el año 1938 sale al mercado en Francia la primera formulación a base de esporas de *Bt* para controlar polilla de la harina. A principios de la década de los 80 se inicia la producción comercial de *Bt*. En el año 1976 se asilan las subespecies *Bt israelensis* y *Bt tenebrionis*, lo que lleva al descubrimiento de nuevos usos y la apertura de nuevos mercados para estos biopesticidas (Özcan, 2008). Otras especies de *Bacillus* como *B. subtilis*, son usadas en el control de enfermedades (Cawoy y otros, 2011).

Algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen una β -exotoxina, llamada thuringiensina, que se ha demostrado tiene actividad insecticida en contra de *Tetranychus urticae* (Royalty y otros, 1990). En el Ecuador no se han realizado estudios en los que se haga aislamientos de *Bacillus* a partir de muestras de suelo, la presente investigación es la primera de este tipo en el país. En las investigación en aislamientos de bacterias del género *Bacillus* que se han hecho en el Ecuador se han realizado los aislamientos a partir de ácaros (Larrea, 2014, Valencia, 2014). Gracias a estudios realizados en otros países se sabe que el suelo es una buena fuente para aislar bacterias

del género *Bacillus* (Carrera, 2009, Dias y otros, 1999, Ruíz de Escudero y otros, 2004, Vardhan y otros, 2013). Estos aislados pueden ser útiles para controlar plagas y enfermedades, y ser usadas en la industria. En la presente investigación se planteó aislar cepas de *Bacillus* nativas de la provincia de Pichincha, y comprobar el efecto acaricida de estos aislados hacia *Tetranychus urticae*.

El ácaro *Tetranychus urticae* es una plaga muy común tanto en invernaderos como en cultivos al aire libre, uno de los mayores problemas que presenta esta plaga es que su población puede aumentar rápidamente durante periodos secos y de altas temperaturas, además es difícil hacer una detección temprana y los costos asociados a la aplicación de acaricidas suelen ser altos (Hossain y otros, 2006).

El proceso de alimentación de este ácaro produce alteraciones en los procesos fisiológicos de las plantas como la fotosíntesis y la respiración, y por lo tanto afectan el crecimiento, la floración y la fructificación en las plantas que infestan (Forero y otros, 2008). Se sabe que densidades entre 10 y 50 ácaros por hoja de rosa, causan una reducción del largo del tallo de la flor entre 17% y 26%, cuando se comparan con plantas que no tienen presencia de ácaros fitófagos (Forero y otros, 2008).

El ácaro *Tetranychus urticae* es considerado actualmente una de las plagas más importantes en cultivos bajo invernadero (Forero y otros, 2008). Su control se realiza casi exclusivamente con agroquímicos; sin embargo, el mayor problema al que se enfrenta el control químico, es su rápida habilidad para desarrollar resistencia después de pocas generaciones (Cerna y otros, 2009, Flores y otros, 2011). Además los insecticidas reducen el número de enemigos naturales del ácaro lo que permite que la plaga se desarrolle más rápidamente (Hossain y otros, 2006). Idealmente un pesticida debería ser letal solo para la plaga objetivo, pero este no es el caso y muchas veces tiene efectos tóxicos en otros organismos, incluido el ser humano. Además de matar otros insectos los pesticidas con alto rango de acción pueden ser tóxicos para peces y aves (Aktar y otros, 2009)

Según el estudio de Van Leeuwen y otros (2010) *T. urticae* es el artrópodo que presenta mayor resistencia a pesticidas, basado en el número de ingredientes activos únicos para los que se ha reportado resistencia (92) (Tabla 1). El manejo integrado de ácaros frena

la creación de resistencia y reduce los costos asociados al control de la plaga (Hoy y Ouyang, 1987). Actualmente hay nuevos acaricidas en el mercado pero tiene un alto costo asociado a su uso y a las restricciones de aplicación para prevenir el desarrollo de resistencia de la plaga (Hossain y otros, 2006).

Tabla 1: Listado de los 10 artrópodos más resistentes, con base en el número de ingredientes activos únicos para los que se ha reportado resistencia y el número de casos notificados.

Especie	Tipo de plaga	# de ingredientes activos	# de casos
<i>Tetranychus urticae</i>	cultivo	92	367
<i>Plutella xylostella</i>	cultivo	81	437
<i>Myzus persicae</i>	cultivo	73	320
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	cultivo	51	188
<i>Musca domestica</i>	urbana	47	195
<i>Blattella germanica</i>	urbana	43	213
<i>Boophilus microplus</i>	ganado	43	252
<i>Helicoverpa armigera</i>	cultivo	42	608
<i>Bemisia tabaci</i>	cultivo	42	281
<i>Panonychus ulmi</i>	cultivo	42	181

Fuente: (Van Leeuwen y otros, 2010).

Las plagas y enfermedades en las plantas causan considerables pérdidas de cultivos, y es por esto que inclusive hoy en día, los agricultores dependen principalmente de pesticidas químicos para su control. Los pesticidas químicos son efectivos, baratos y relativamente fáciles de usar, pero se sabe que el uso y abuso de los mismos ha causado muchos problemas. Entre ellos están, la contaminación de suelos y reservorios subterráneos de agua, la acumulación de químicos indeseables en la cadena alimenticia, la generación de cepas o variedades con resistencia a los pesticidas y problemas en la salud de los agricultores (Cawoy y otros, 2011).

El significativo aumento del uso de pesticidas químicos ha creado preocupación debido a las consecuencias adversas que pueden tener en la salud humana y el ambiente, esto es particularmente importante en países donde el conocimiento del agricultor sobre el manejo de pesticidas es inadecuado (Özcan, 2008). Encuestas realizadas en el Ecuador demostraron la ausencia de protección personal de los agricultores al momento de las aplicaciones de pesticidas y la falta de conocimiento en cuanto a los síntomas de envenenamiento (Crissma y otros, 1994).

1.2 Justificación

Los biopesticidas poseen muchas ventajas por sobre los controles fitosanitarios convencionales. Debido a la multiplicidad de mecanismos de acción que poseen, los biopesticidas compiten por nutrientes y espacio con el patógeno, presentan antagonismo directo e inducen inmunización de la planta (Cawoy y otros, 2011). También son biodegradables y no se bioacumulan (Özcan, 2008). Comparados con organismos genéticamente modificados (GMOs), los biopesticidas tiene una mayor aceptación por parte de los consumidores. A pesar de ello la venta de biopesticidas representó solamente un porcentaje de 2.5% en el mercado mundial de los pesticidas (año 2005), Pero el interés en estos productos ha aumentado con un crecimiento anual del 15% (Cawoy y otros, 2011).

La búsqueda de mejores prácticas agrícolas y la implementación de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), también aporta al incremento de uso de biopesticidas, ya que estos están legalmente aceptados dentro de agricultura orgánica.

Contrario a los pesticidas químicos convencionales los biopesticidas son relativamente fáciles de producir a una escala apropiada con tecnología que está al alcance de países en vías de desarrollo (Attathom, 2002). Un conocimiento avanzado en biotecnología y biología molecular ayudará en un futuro a alcanzar la producción de biopesticidas más eficientes y económicamente asequibles para una agricultura moderna (Alvarez y del Valle, 2012) Según estudios realizados por Sachidanadham y otros (1997) *Bacillus thuringiensis* es el insecticida microbiano más barato en términos de producción. Las bacterias del género *Bacillus* tienen aptitud para ser tratadas industrialmente para la producción masiva y la aplicación en el campo como insecticida microbiológico (García, 2011). La capacidad de *Bacillus* de producir endoesporas hace que sea factible transformar los cultivos bacterianos después de la fermentación a productos de fácil utilización en el campo como formulaciones de polvo mojable, además la vida en percha de biopesticidas a base de bacterias esporulantes es más larga y requiere menos precauciones en el almacenaje. Las bacterias de este género no requieren de suplementos nutricionales específicos por lo que son relativamente fáciles de producir industrialmente (Cawoy y otros, 2011). Aún así, es necesario hacer investigación para optimizar el medio de fermentación de estas bacterias (Özcan, 2008).

La detección de nuevos aislamientos de *Bacillus* ha llevado al descubrimiento de cepas con actividad tóxica contra una amplia gama de órdenes de insectos. Además de la mortalidad directa que generan, la toxinas de *Bacillus* también tiene otros efectos como la reducción en la fecundación de las hembras tratadas, inhibición de la alimentación, deformidad en el aparato bucal y desaparición de apéndices en individuos en fase de crecimiento (Royalty y otros, 1990). En general *Bacillus* es una de las alternativas más prometedoras para reducir el uso de pesticidas químicos (Berón y Salerno, 2006).

A pesar de los esfuerzos realizados, es necesario buscar más aislados tóxicos para poder controlar más plagas y proveer alternativas para superar el problema de la resistencia en insectos, hacia compuestos químicos y con respecto a la expresión de genes de *B. thuringiensis* que codifican proteínas insecticidas en plantas transgénicas.(Alvarez y del Valle, 2012). Se sabe que hay diferencias en la diversidad genética de las cepas de *Bacillus* dependiendo de las regiones de donde fueron aisladas (Berón y Salerno, 2006, Centinkaya, 2002). Por esta razón muchos centros de investigación se han concentrado en el aislamiento de especies nativas de *B. thuringiensis*, creando colecciones de estas bacterias en todo el mundo (Uribe y otros, 2003). Este estudio tiene como objetivo unirse a esos esfuerzos y realizar aislamientos de nuevas cepas de *Bacillus* nativas de la provincia de Pichincha en el Ecuador. Para el control de plagas de importancia económica en el país, haciendo frente al problema de la resistencia de estas plagas a ciertos pesticidas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Aislar, identificar y comprobar la eficacia de cepas de *Bacillus* nativas de la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro *Tetranychus urticae*.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar *Bacillus* de muestras de suelo de 8 ambientes: 2 invernaderos rosas, 2 páramos andinos, 2 suelos cultivados fuera de invernadero y 2 compost.

- Evaluar diferencias poblacionales de *Bacillus* mediante conteos de muestras provenientes de dichos ambientes.
- Separar en grupos morfológicos los aislados bacterianos mediante tinción Gram y tinción de endoespora.
- Escoger un cultivo bacteriano representativo de cada grupo morfológico de 4 de las 8 muestras de suelos analizadas
- Realizar bioensayos con las cepas escogidas para evaluar la efectividad de las cepas sobre la mortalidad de hembras adultas y población relativa de huevos y ninfas.
- Caracterizar molecularmente la región 16S ADNr de las cepas que presenten un efecto antagónico contra el ácaro plaga, con la finalidad de identificar las especies encontradas.

3. Hipótesis

Las cepas de *Bacillus* obtenidas e identificadas pueden emplearse eficazmente para el control del ácaro *Tetranychus urticae*

4. Marco Teórico

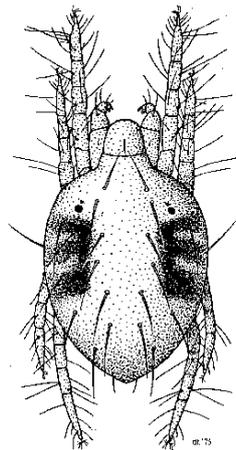
4.1 El ácaro *Tetranychus urticae*

Los ácaros en general son pequeños artrópodos pertenecientes a la clase Arachnida y al subphylum Chelicerata. Los ácaros se diferencian de los insectos en que no poseen antenas, mandíbulas ni maxilares. Al igual que las arañas tiene 4 pares de patas en etapa adulta pero a diferencia de las mismas solo tienen 6 pares de patas cuando son larvas. *Tetranychus urticae* pertenece al grupo conocido como ácaros araña, porque elaboran telarañas. Estos ácaros corresponden a la familia Tetranychidae y al orden Prostigmata (Zhang, 2003).

T. urticae es una de las plagas más importantes en cultivos a nivel mundial, esto debido a que es la especie más polífaga dentro de la familia Tetranychidae. Cuenta con cerca de 800 especies de plantas hospederas, entre las que están verduras, frutas, maíz, algodón y una amplia gama de plantas ornamentales (Van Leeuwen y otros, 2010).

T. urticae generalmente pone sus huevos en grupos en el envés de la hoja, estos son esféricos, translucidos y de color pálido (Figura 2). A medida que se desarrollan toman una coloración más amarillenta. Al eclosionar, salen del huevo larvas de 6 pares de patas cortas y con cuerpo ovoide. Al desarrollarse las ninfas tienen 8 pares de patas y presentan las manchas dorsales características de esta especie. Las hembras adultas miden entre 400-500 μm y los machos son más pequeños y tienen el idiosoma terminado en punta. Las hembras en su forma de verano tienen una coloración entre amarilla y verde con las dos manchas laterales en el dorso, pero se ponen más oscuras tomando un color entre anaranjado y rojo en la forma de hibernación. El color de estos ácaros puede depender de la planta hospedera y de otros factores (Zhang, 2003).

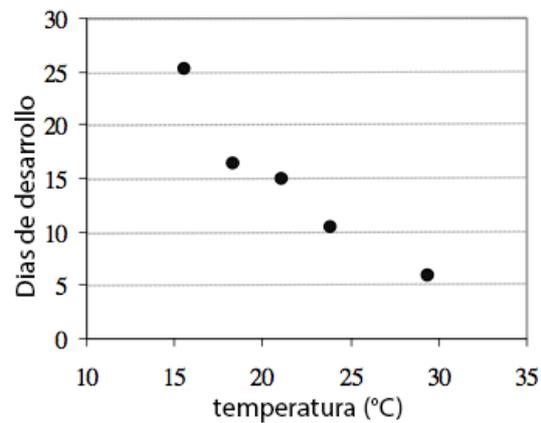
Figura 1: Esquema de una hembra adulta de *T. urticae*



Fuente: (Zhang, 2003)

La especie *T. urticae* puede desarrollarse en temperaturas entre 12 a 40°C. La temperatura es un factor decisivo en el tiempo de desarrollo de huevo a adulto; a mayor temperatura el tiempo disminuye. A una temperatura óptima entre 30 y 32°C solo le toma a un huevo una semana para crecer hasta ser un adulto, los machos se desarrollan un poco más rápido que las hembras (Zhang, 2003).

Gráfico 1: tiempo de desarrollo de huevo a adulto dependiendo de la temperatura



Fuente: (Zhang, 2003)

Las hembras pueden empezar a poner huevos a los dos días de ser adultas, una hembra promedio puede poner 10 huevos al día y producir más de 100 huevos durante 2 semanas, las tasas de ovoposición varían dependiendo de la planta huésped y de la temperatura (Zhang, 2003). Las hembras son el resultado de un huevo fecundado es decir son diploides, los machos son resultado de huevos sin fertilizar, es decir son haploides (Macke y otros, 2011).

Figura 2: Esquema ciclo de vida de *Tetranychus urticae*

T. urticae por lo general se alimenta de los cloroplastos en el envés de la hoja, lo que genera manchas características de color blanco y amarillo en el haz de la hoja, dichas manchas pueden tornarse cafés si la infestación continua. A medida que los ácaros se mueven en la planta, se pueden ver telarañas en las hojas y alrededor de los tallos. Daños graves pueden llevar a que las hojas se caigan, que la planta se cubra de telaraña y finalmente muera prematuramente (Zhang, 2003).

Aunque el control biológico de *T. urticae* ha demostrado su eficacia en muchos cultivos en invernaderos, el uso de insecticidas y acaricidas químicos es la principal forma de control en cultivos extensivos. Un gran número de compuestos con una estructura química diferente y modo de acción se han utilizado, incluyendo insecticidas neurotóxicos, como organofosforados y piretroides, también se usan acaricidas específicos como los inhibidores del transporte mitocondrial de electrones o METI 's por su siglas en ingles y compuestos orgánicos de estaño. Recientemente también se han desarrollado compuestos como cetoenoles. Desafortunadamente, *T. urticae* tiene capacidad de desarrollar resistencia rápidamente. Esto se debe a su alta fecundidad y ciclo de vida muy corto que resulta en muchas generaciones por año, sobre todo en condiciones más cálidas (Van Leeuwen y otros, 2010).

Los insecticidas organofosforados fueron los primeros en ser usado para el control de *T. urticae*. Hay estudios que afirman que el ácaro desarrolló resistencia a estos pesticidas desde sus primeros usos en la década de los 50. Desde entonces *T. urticae* ha desarrollado resistencia a más de 30 insecticidas organofosforados y carbamatos en 40 países. *T. urticae* presenta altos niveles de resistencia a los piretroides, se han reportado en poblaciones de todo el mundo niveles de resistencia sobre 2.000 veces la aplicación normal (Van Leeuwen y otros, 2010).

Actualmente el control biológico con ácaros depredadores de la familia Phytoseiidae es usado ampliamente. Las especies más comunes son: *Phytoseiulus persimilis*, *Phytoseiulus micropilis*, *Neoseiulus californicus*, *Neoseiulus fallacis*, *Neoseiulus longispinosus* y *Galemdromus occidentalis*. También se usa la mosca *Feltiella acarisuga* y crisoperlas. (Zhang, 2003). En Ecuador se encuentran productos comerciales en base a *Macrolophus pygmaeus*, *Neoseiulus californicus* (anteriormente conocido como *Amblyseius californicus*), *Neoseiulus cucumeris* (anteriormente

conocido como *Amblyseius cucumeris*), *Feltiella acarisuga*, *Phytoseiulus persimilis* (Koppert, 2012). Así mismo, hongos entomopatógenos pueden usarse como biocontroladores. Dos especies se destacan: *Entomophthora thaxteriana* y *E. adjarica*. Estos hongos pueden controlar eficientemente las poblaciones de *T. urticae* solo si se puede mantener la humedad cerca de la saturación dentro del lugar de aplicación (Zhang, 2003). En cuanto al uso de bacterias como biocontroladores de este ácaro se sabe que algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen una β -exotoxina, llamada thuringiensina, que se ha demostrado tiene actividad insecticida en contra de *Tetranychus urticae* (Royalty y otros, 1990).

4.2 Bacterias del género *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* son gram-positivas, aerobias estrictas y anaerobias facultativas, poseen una morfología parecida a un bastón, tiene la característica particular de formar endoesporas bajo condiciones de estrés, esto les permite ser relativamente fáciles de cultivar y las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico. Algunas especies son agentes naturales de control biológico y han sido utilizadas como base de varios insecticidas biológicos comerciales. Las especies más usadas son: *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus laterosporus*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus lentimorbis*, y *Paenibacillus popilliae*. Sin embargo, *B. thuringiensis* es la especie más usada en programas a gran escala y de la que se tiene más conocimiento científico (García, 2011).

Bacillus thuringiensis es una bacteria que produce cantidades masivas de una o mas proteínas que cristalizan intracelularmente durante la fase de esporulación. Estas proteínas son tóxicas especialmente para larvas de insectos de los órdenes Lepidoptera, Díptera y Coleóptera. También se han descubierto recientemente aislados que presentan toxicidad hacia insectos de los órdenes: Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga también contra nemátodos, ácaros y protozoos (Attathom, 2002). Las 2 variedades de *B. thuringiensis* más usadas comercialmente son *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) que presenta toxicidad a una amplia gama de especies de lepidópteros, y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), que se usa para el control de mosquitos y larvas de mosca (Nester y otros, 2002).

Tabla 2: Cepas de *Bacillus* usadas en el manejo de plagas y enfermedades

PLAGAS		
Especie	Subespecie	plaga objetivo
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Kurstaki</i>	lepidopteros
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	larvas de mosquito
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	mosca negra
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	mosca de los hongos
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Aizawai</i>	larvas de lepidopteros
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Tenebrionis</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Tenebrionis</i>	<i>Xanthogaleruca luteola</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Japonensis</i>	escarabajos
ENFERMEDADES		
Especie	Subespecie	enfermedad que controla
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	<i>Rhizoctonia</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>		Hongos
<i>Bacillus pumilus</i>		<i>Rhizoctonia</i>
<i>Bacillus pumilus</i>		<i>Fusarium</i>
<i>Bacillus pumilus</i>		Hongos

Fuentes: (Cranshaw, 2009, EPA, 2014, Yul y otros, 2007).

Durante el ciclo de vida de *B. thuringiensis* se presentan dos fases principales, el crecimiento vegetativo y la fase de esporulación. En el crecimiento vegetativo las bacterias se duplican por bipartición y en la fase de esporulación se desarrolla la endoespora y los cristales proteicos insecticidas. Esta fase consta de 7 estadios los cuales se inician cuando hay limitación de nutrientes y termina con el estadio de lisis en donde la células se rompen liberando así la endoespora, exoespora y cristales (García, 2011).

Los cristales proteicos insecticidas, están constituidos fundamentalmente de proteínas llamadas δ -endotoxinas, son producidos durante la fase de esporulación del crecimiento de *Bacillus*. Los niveles de síntesis de cristales proteicos son controlados por una variedad de mecanismos (Centinkaya, 2002). El conteo de esporas no se correlaciona directamente con la toxicidad (WHO, 1999). El grupo de las δ -endotoxinas está compuesto por dos grupos de proteínas: las proteínas Cry (del inglés “Crystal”) y las proteínas Cyt (del inglés “Cytolytic”). Cada δ -endotoxina tiene un espectro de actividad insecticida característico, con un rango de acción limitado a pocas especies, generalmente de un mismo orden. El rango de actividad insecticida de cada cepa de *B. thuringiensis* depende de las diferentes δ -endotoxinas que este genera (Bernhard y otros, 1997). La morfología de los cristales puede ser muy diversa y normalmente se la

relaciona con el tipo de endotoxina que lo componen. Se han reportado cristales romboides, bipiramidales, heterogéneos, esféricos, irregulares y cúbicos (García, 2011).

Los insecticidas en base a *B. thuringiensis* no funcionan por contacto, si no que deben ser ingeridos por la plaga objetivo para ser efectivos (Nester y otros, 2002, Van Rie, 2000). La acción primaria de las proteínas insecticidas es romper las células epiteliales del intestino medio de la plaga objetivo. Una vez digeridos, los cristales tóxicos son solubilizados en el ambiente alcalino del lumen del intestino y activados por las proteasas del huésped (Alvarez y del Valle, 2012). El resultado de este proceso es la muerte del insecto por inanición y/o septicemia (García, 2011).

Durante la fase de crecimiento activo algunas cepas de *B. thuringiensis* producen compuestos extracelulares que pueden contribuir a la virulencia de la bacteria. Esos compuestos incluyen fosfolipasas, β -exotoxinas, proteasas, quitinasas, proteínas insecticidas vegetativas, y compuestos antibióticos con actividad anti fúngica (Centinkaya, 2002). Se cree que todos estos factores ayudan a la bacteria en la invasión del insecto (García, 2011).

La β -exotoxina producida por varias cepas de *B. thuringiensis*, también conocida como thuringiensina, es una toxina termoestables y soluble en agua. La β -exotoxina es un nucleótido compuesto de adenina, ribosa, glucosa y ácido allarico fosforilado (Taborsky, 1992). Es un análogo nucleótido de ADN a la cual se le atribuye acción insecticida sobre Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemípteros, además de ácaros, nemátodos, protozoarios y platelmintos (García, 2011). Su toxicidad se debe a que inhibe la ARN polimerasa generando el bloqueo de la mitosis celular (Royalty y otros, 1990).

En el estudio realizado por Hall y colaboradores preparaciones compuestas por *B. thuringiensis* y sus toxinas fueron ensayadas en laboratorio en contra de ácaros fitófagos, se determino que las esporas y el cristal paraesporal eran inocuos para *Tetranychus urticae*, en cambio se encontró que el derivado soluble en agua y estable al calor conocido como β -exotoxina es altamente efectivo para el control de este ácaro (Hall y otros, 1971).

Una desventaja de la β -exotoxina de *B. thuringiensis* es el intervalo de tiempo entre la aplicación del tratamiento y el inicio de la mortandad, se han reportado períodos de espera para lepidópteros de 6 días en bioensayos con *Spodoptera exigua* y de 7 días para *Heliothis virescens*. Una actividad lenta se ha registrado también en bioensayos con ácaros (Royalty y otros, 1990).

Las condiciones de la fermentación y la optimización de los medios de cultivo para cada especie es necesaria ya que cada cepa puede tener diferentes necesidades nutricionales para alcanzar una producción óptima. Por ejemplo la optimización de la fermentación de *B. thuringiensis* no se hace solamente para alcanzar altas densidades de población si no también para alcanzar altas concentraciones de cristales proteínicos y por lo tanto alcanzar alta toxicidad (Özcan, 2008). En el pasado se pensaba que lo importante era alcanzar un alto porcentaje de esporulación, pero estudios recientes han demostrado que una alta tasa de esporulación no esta necesariamente correlacionada con la producción de cristales y toxicidad (Rampersad y Ammons, 2005).

El crecimiento de *Bacillus* ocurre en un rango de pH de 5.5 a 8.5. Por lo general el pH inicial es de 6.8 a 7.2, luego decrece a 5.8 ya que se va liberando acetato, y luego sube entre 7.5 y 8, cuando el acetato se consume. Se puede usar este pH para saber que la fermentación ha finalizado (Özcan, 2008). En la fermentación de *Bacillus* tener una fuente de carbono es muy importante, pero hay que tener cuidado con dicha fuente ya que algunos tipos de azúcar como: glucosa, fructosa, ribosa, melaza, almidón, dextrina, harina de trigo e inulina pueden producir acidez dentro del medio lo que lleva a la represión de ciertos genes que actúan en la formación de toxinas (Özcan, 2008). Estudios realizados demuestran que concentraciones de glucosa iguales o mayores a 10g/L inhiben la producción de toxinas, también se ha demostrado que el exceso de glucosa puede prolongar el crecimiento vegetativo y así mismo minimizar la producción de toxina. Se ha visto que algunas fuentes de carbono como: sacarosa, lactosa e inulina soportan muy bien la producción de toxinas específicas contra lepidópteros, lo que lleva a pensar que el tipo de fuente de carbono genera mayor o menor producción de toxinas específicas (Özcan, 2008).

En cuanto a las fuentes de nitrógeno, se ha demostrado que la mayoría de variedades de *Bacillus* son incapaces de utilizar solo fuentes inorgánicas de nitrógeno, por lo que se

recomienda utilizar también fuentes orgánicas. Como mínimo debe estar presente un aminoácido dentro del medio, que puede ser: glutamato, aspartato, valina, leucina, serina o teonina. Se debe tener cuidado con la cisteína y cistina ya que se ha visto que inhiben el crecimiento, esporulación y toxicidad. Algunos estudios sugieren que el agotamiento del nitrógeno dentro del medio desencadena la esporulación de estas bacterias y por tanto la expresión de su toxicidad. Otro componente importante para la producción de cristales proteicos es el ion potasio K^+ , en el estudio de Wakisaka y otros (1982) se ve que la producción de cristales aumentó en presencia de sales de potasio, pero en cambio no se observó el mismo efecto con sales de sodio. Otros estudios sugieren que la presencia de fosfato inorgánico dentro del medio aumenta el mRNA de las toxinas Cry, y es considerado esencial en la expresión proteica y en el crecimiento celular (Özcan, 2008).

Los genes que codifican proteínas insecticidas en *B. thuringiensis* son conocidos como genes cry. Se han clasificado 30 grupos diferentes de estos genes según las secuencias de proteínas que codifican. La manipulación genética de estos genes puede generar productos biopesticidas más eficaces y rentables. Entre las desventajas de aplicaciones en spray de *B. thuringiensis* en el campo están que tiene una baja persistencia, es poco estable, y puede ser lavado por las lluvias y degradado por la luz UV (Nester y otros, 2002). Esto se está mejorando con una técnica llamada “cell cap technology” en la que los genes que generan toxicidad en *B. thuringiensis* se clonan en una bacteria colonizadora de plantas como *Pseudomonas fluorescens*, dejando las proteínas insecticidas encapsuladas lo que aumenta la persistencia en el campo de dichas toxinas. Estas formulaciones proporcionan bioinsecticidas más estables (Attathom, 2002).

Desarrollos recientes han hecho posible la construcción de cepas recombinantes de *B. thuringiensis* mejorando así el espectro de la actividad insecticida. Actualmente productos en base a *B. thuringiensis* genéticamente modificados ya están disponibles comercialmente. También se han introducido genes de Bt en plantas, confiriendo a estas resistencias a plagas, en cultivos de cereales, vegetales de hoja, forrajes y árboles (Attathom, 2002).

5. Materiales y Métodos

5.1 Muestreo

El muestreo de suelo se realizó en 8 ambientes: 2 invernaderos rosas, 2 páramos andinos, 2 suelos cultivados fuera de invernadero y 2 compost. Se tomó 15 submuestras para cada muestra. Las submuestras se obtuvieron de los 5 a 10 cm de profundidad, después de quitar la capa superior de vegetación de ser necesario (Dias y otros, 1999). Todas las submuestras fueron extraídas con un barreno de 17 cm de diámetro.

La muestra 1 de compost se la tomó de la finca florícola Ponte-Tresa, ubicada en Cayambe. La muestra 2 de compost se tomó en finca florícola Agritab-Farms ubicada en Tabacundo. Las muestras de páramo fueron colectadas en Paluguillo cerca de Papallacta y en Cayambe cerca de la comunidad de Cariacu. Las muestras de invernadero se recolectaron en la florícola Ponte-Tresa y en un invernadero de la finca florícola Attar Roses en Machachi. Las muestras de cultivos se los tomó en un cultivo de moras en Guápulo y en la finca productora de cítricos de la compañía Citrus Apianda en Tumbaco.

Figura 3: Mapa de Pichincha con los sitios de muestreo



5.2 Conteos y aislamientos

Se usó el protocolo de aislamiento ya preestablecido por Travers y otros (1987), con un ligero cambio en el tratamiento térmico, el mismo que se usó en el estudio de Molina y otros (2010). Se colocó 0,5 g de la muestra de suelo en 10 ml del medio Luria broth acetato de sodio 0,25 M (Anexo 1), se incubó por 4 horas a 250 rpm y a 30 °C, se obtuvieron muestras de 1,5 ml de la solución y se aplicó el tratamiento de calor en baño maría a 80 °C por 3 min, se realizaron diluciones seriadas de 1 a 7 de esta solución, se sembraron por triplicado 100 µl de cada disolución y de la solución pura en cajas petri con Luria agar o L agar, se incubaron las cajas petri por 24 horas a 30 °C. Finalmente se realizaron los conteos de colonias de cada caja, para el análisis estadístico se consideraron las cajas que tuvieran entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias o UFC, los conteos que sobrepasaron las 300 UFC se anotaron como incontables. Para calcular las unidades formadoras de colonia por ml de solución se usó la siguiente fórmula.

Figura 4: Fórmula para calcular UFC/ml

$$\text{UFC/ml} = \frac{\# \text{ de colonias en la placa} \times \text{FDD}}{\text{Volumen sembrado}}$$

donde FDD es el factor decimal de dilución, que es igual a 10 elevado al número de la dilución, es decir si se usa la dilución 3 o 10^3 el FDD sería 1000.

Para transformar este cálculo a UFC/g se dividió cada resultado para 0,05 que es la cantidad de gramos de suelo en los 100 µl de cultivo sembrados en caja.

5.3 Clasificación en grupos morfológicos

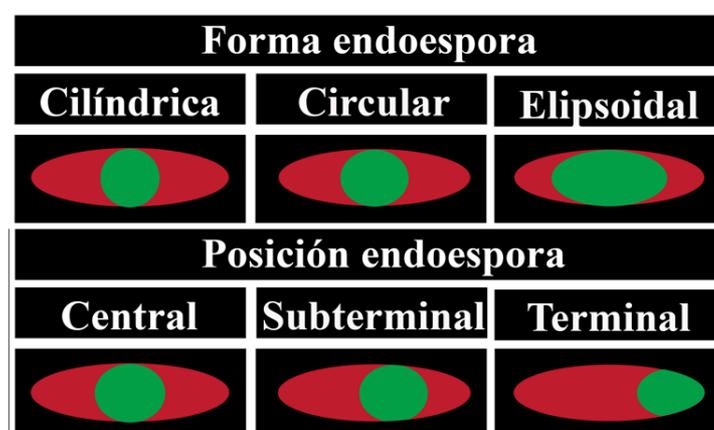
Para realizar los aislamientos se escogió las cajas con 10 a 30 colonias bien distribuidas, cada colonia se resembró por estriado en cajas petri con medio T3 agar (Anexo 1) (Molina y otros, 2010). Para su conservación en refrigeración se resembró cada colonia en tubos de ensayo con medio T3 líquido (Anexo 1) y se los mantuvo a 4 °C. Para la conservación a largo plazo se incubaron los aislados escogidos hasta que la medición de absorbancia del espectrofotómetro a 600nm sea igual 0.5. Luego se tomó 100 µl del

cultivo y se lo diluyó 50 veces añadiendo 4.9 ml de glicerol al 20% (v/v); se tomó 200 μ l del cultivo diluido y se los guardó en tubos eppendorf a -80°C (Özcan, 2008).

A las bacterias aisladas se les dio un código para su mejor clasificación, este código esta formado por una letra que representa de donde fue obtenida la muestra. Siendo: “C” de compost, “P” de páramo, “I” de invernadero, y “Q” de cultivo. Seguido por el número 1 o 2 que representa el número de muestra, seguido de un punto y un número del 1 al 29 que es el número que se asignó al momento de hacer el aislamiento. Al final se agregó en paréntesis una letra, que representa el grupo morfológico al que corresponde.

Se sembró en T3 agar cada aislado bacteriano que se mantuvo en refrigeración y se incubaron las cajas petri por 72 horas a 30 °C (Reinoso y otros, 2006). Se hicieron tinciones Gram (Anexo 2) y tinción de endoespora con verde de malaquita (Anexo 3) a cada uno de los cultivos bacterianos; se observó al microscopio con el lente de inmersión de 100X (Centinkaya, 2002). Se clasificaron los aislados como hermanos clonales, cuando presentaban la misma morfología y provenían de la misma muestra (Rampersad y Ammons, 2005). A los aislados se los clasificó en grupos morfológicos, para dicha clasificación se tomó en cuenta: tamaño de las bacterias, forma y posición de la endoespora, y si la bacteria se deforma cuando hay esporulación. Se hizo una tabla de los grupos morfológicos de cada muestra con sus características y número de aislados que se encuentran en cada grupo.

Figura 5: Esquema de posición y forma de la endoespora en bacterias de *Bacillus*



5.4 Bioensayos

5.4.1 Reproducción de *Tetranychus urticae*

Para la reproducción de los ácaros que se usaron en el ensayo, se mantuvieron en macetas 3 plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum*) las cuales fueron infestadas a diferentes tiempos. Los ácaros para realizar la primera infestación se obtuvieron de la florícola “Rosen Tantau” ubicada en la vía Pintag km 6, las otras plantas fueron infestadas con las generaciones posteriores de la primera infestación.

5.4.2 Fermentación de las bacterias

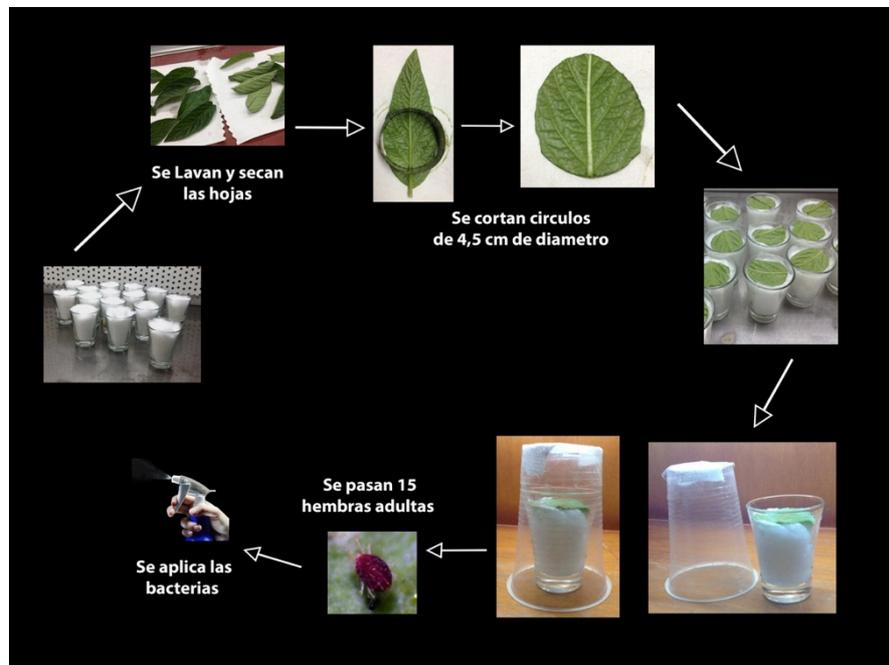
Siguiendo el método de García (2011), con algunas modificaciones, las cepas aisladas y escogidas fueron cultivadas aeróbicamente en medio líquido T3 a 30 °C en un incubador orbital a 240 rpm por 72 horas. La relación entre el volumen del matraz Erlenmeyer y el volumen del cultivo para el crecimiento de las bacterias debe ser de 5:1; ya que los Erlenmeyer en los que se cultivó eran de 100 ml, se puso 20 ml de medio T3 en cada uno. Luego de la fermentación los cultivos fueron activados durante mínimo 96 horas a 4 °C (García, 2011).

5.4.3 Aplicación de los tratamientos

Basado en el protocolo de Knight y otros (1990), con algunas modificaciones, se tomaron hojas de plantas sanas de pepino dulce, *Solanum muricatum*, a las que se les realizó un lavado con agua corriente, se dejaron secar al ambiente y se cortaron círculos de hoja de 4,5 cm de diámetro, se colocaron los discos de hoja con el envés hacia arriba sobre algodón con agua destilada estéril dentro de vasos de vidrio de 2 onzas, todo el material fue previamente esterilizado. El material de vidrio en autoclave por 1 hora a 15 psi, y el material de plástico con exposición a luz UV por al menos 40 minutos. Cada vaso de vidrio se cubrió con un vaso plástico de 10 onzas hacia abajo con una pequeña ventana en la base cubierta con gasa para permitir la evaporación del agua. Se trasladaron 15 hembras adultas a cada uno de los disco de hoja, desde hojas infectadas de *Solanum muricatum*. Se aplicó el tratamiento con sprays de gota fina, se realizó dos

descargas del spray para cada tratamiento, con un volumen aproximado de descarga de 0,25 ml.

Figura 6: Esquema del protocolo de aplicación de los tratamientos



5.4.4 Bioensayo preliminar

Se realizó un bioensayo previo para determinar qué medio de cultivo se iba a utilizar en el ensayo con todos los tratamientos. Se evaluaron dos medios de cultivo líquido, un medio general para bacterias Luria Broth o LB y un medio mínimo de esporulación de *Bacillus* conocido como T3 (Anexo 1) (Molina y otros, 2010). Para evaluar estos medio se usó una bacteria con eficacia comprobada contra *T. urticae* como control positivo, de ahora en adelante para propósitos del estudio se le llamara a esta bacteria BtC. Como control negativo se usó el medio T3 puro.

Para este bioensayo se hicieron 4 repeticiones. Se tomó datos a las 72, 120 y 168 horas después de la aplicación, y se reaplicó los tratamientos a las 72 horas. Para cada día se contó y registró los individuos vivos, muertos y desaparecidos. Los ácaros que no se movieron al pincharlos suavemente con un pincel fueron contados como muertos (Royalty y otros, 1990). Solo se tomaron en cuenta los individuos muertos de cada día para realizar los análisis estadísticos.

5.4.5 Bioensayos con aislados bacterianos

Se escogió un aislado bacteriano de cada grupo morfológico (Itoua-Apoyolo y otros, 1995) de 4 de las 8 muestras de suelo que se recolectaron. Se escogió la muestra que dentro del mismo tipo de suelo mostró mayor cantidad de grupos morfológicos. Los escogidos fueron: 1)compost 2 “Agritab-Farms”, 2)Páramo 1 “Paluguillo”, 3)Invernadero 1 “Ponte-Tresa” y 4)Cultivo 1 “Naranja”. Se escogió un aislado representativo de cada grupo morfológico de cada muestra de suelo seleccionada. Con estos aislados se realizaron los bioensayos.

La toma de datos y la reapiación se hizo igual que el bioensayo previo, adicionalmente se tomó datos de la población relativa de huevos y ninfas, en una escala del 1 al 5 en la que:

1= no hay huevos /ninfas

2= hay muy pocos

3= hay pocos

4= hay una población normal

5= hay muchos

Solo se tomaron en cuenta los individuos muertos y la población relativa de ninfas y huevos a las 120 y 168 horas para realizar los análisis estadísticos.

Para poder hacer comparaciones entre los datos de mortalidad obtenidos, en esta investigación e investigaciones anteriores, se corrigieron los datos obtenidos con la fórmula de Abbot, que mide el efecto directo del tratamiento sin tomar en cuenta el efecto de la muerte de los ácaros ocasionada por factores incontrolables dentro del bioensayo (CDC).

Formula de Abbot:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\text{Mortalidad del tratamiento (\%)} - \text{Mortalidad del control (\%)}}{100 - \text{Mortalidad del control (\%)}} \times 100$$

5.4.6 Análisis estadístico

Los datos finales se analizaron mediante el programa estadístico SPSS® haciendo una comparación de medias con ADEVA de un factor, y un análisis posterior de Tukey al 95% de confiabilidad, para apreciar las diferencias entre rangos estadísticos.

5.5 Identificación Molecular

Las cepas aisladas que mostraron toxicidad contra *T. urticae* fueron escogidas para la identificación molecular. Estas se sembraron en medio T3 líquido en agitación a 240 rpm y a 30 °C por una noche, luego se midió la densidad óptica a 560 nm, se ajustó mediante diluciones a una absorbancia entre 0,200 y 0,300 nm. En lugar de ADN para realizar la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se utilizó directamente el cultivo celular líquido ajustado, siguiendo la técnica de cell PCR (Brito, 2014, Lee y otros, 2004). La identidad de las cepas se confirmó por amplificación de la secuencia parcial de el gen 16s ADNr. Para la amplificación se usaron los primers universales 16SF(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 16SR (3'-GCCATTGTAGCACGTGTGCA-5'). Se hicieron muestras de 50 µl para realizar la PCR, los reactivos utilizados se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Reactivos usados para una reacción de PCR de 50 µl

REACTIVOS	CANTIDAD	CONCENTRACION
Cultivo celular	2 µl	200 a 300 nm
Buffer	5 µl	10 X
Cloruro de Mg	4 µl	50 mM
dNTPs	1,5 µl	10 mM
Tag	1 µl	5 U/µl
Primer 16SF	2 µl	10 mM
Primer 16SR	2 µl	10 mM
Agua PCR	32,5 µl	

Fuente: (Laboratorio Biotecnología Agrícola y Alimentos USFQ, 2015)

Una vez listos los tubos con las muestras se llevaron al termociclador para hacer la PCR, que constó de 30 ciclos. En la tabla 4 se detalla el programa que se usó.

Tabla 4: Programa de PCR

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización previa	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	94 °C	1 minuto
Hibridación	55 °C	2 minutos
Extensión	72 °C	5 minutos
Extensión Final	72 °C	10 minutos

} 30 ciclos

Fuente: (Laboratorio Biotecnología Agrícola y Alimentos USFQ, 2015)

Después se visualizó los productos de la PCR en geles de agarosa al 1% sometido a electroforesis por 40 minutos a 80 mV. Para hacer el gel de agarosa se disolvió 0,6 gramos de agarosa en 60 ml de TAE 1X, a este se le agregó 2 µl de SYBR® safe y finalmente se le dejó solidificar al gel y se cargaron las muestras en los pocillos.

Las muestras que presentaron una sola banda definida de 1500 bp se purificaron mediante el kit de Purelink de Invitrogen. Luego se realizó la medición de la concentración de las muestras usando el NanoDrop, para poder enviar la muestra a secuenciarla concentración debe ser mayor a 20 ng/µl.

Las muestras se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen en Corea, una vez obtenidas las secuencias se analizaron los cromatogramas. Los que tenían buena calidad, con picos definidos y poco ruido se analizaron por medio de la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” o BLAST, en la pagina web del “National Center for Biotechnological information” o NCBI comparándolas contra la base de datos GenBank (Alvarez y del Valle, 2012).

La herramienta BLAST compara las secuencia obtenida con las secuencias registradas en sus bases de datos por medio de un algoritmo optimizado. La secuencia obtenida se compara usando una matriz de sustitución, esta matriz genera una puntuación basada en la significación estadística de la similitud existente entre la secuencia obtenida y las secuencias existentes en la base de datos. En base a esta similitud se genera el puntaje total y el valor del error (Fassler, 2011).

6. Resultados

6.1 Conteos bacterianos de las muestras de suelo provenientes de 8 localidades

Los conteos se realizaron por triplicado y solo se tomaron en cuenta las cajas que tuvieran entre 30 a 300 UFC en caja (ver materiales y métodos). En la figura 7 se ven las cajas Petri con los conteos de las UFC, con un círculo rojo están marcadas las cajas con las disoluciones que se tomaron en cuenta para hacer el conteo (entre 30 y 300 UFC) y el análisis posterior.

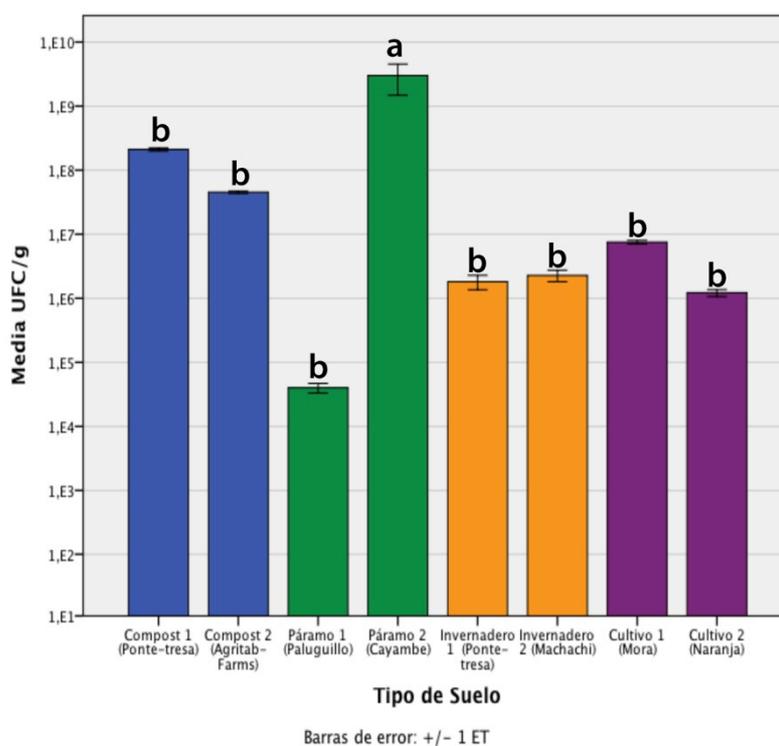
Figura 7: Evaluación y conteo bacteriano de las cajas petri en las que se sembró las diluciones seriadas de las 8 muestras de suelo.

	Compost 1 Ponte-Tresa	Compost 2 Agritab Farms	Páramo 1 Paluguillo	Páramo 2 Cayambe	Invernadero 1 Ponte-Tresa	Invernadero 2 Machachi	Cultivo 1 Mora	Cultivo 2 Naranja
Solución Pura	Incontables	Incontables	200,33	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-1}	Incontables	Incontables	29,67	Incontables	Incontables	114	Incontables	Incontables
10^{-2}	Incontables	Incontables	2,33	Incontables	91	19	Incontables	61
10^{-3}	Incontables	226,67	0	Incontables	10,33	2	Incontables	5
10^{-4}	105,33	22	0	Incontables	1,67	0	37,77	2
10^{-5}	6	0,33	0	105,33	0	0	1	0

En la figura 7 observamos en las columnas a las muestras de suelo y en las filas a las diluciones seriadas. Aquí podemos ver que la muestra Páramo 2 “Cayambe” es la que mayor cantidad de bacterias presenta, ya que se tomó en cuenta la disolución 10^{-4} para el cálculo de UFCs, y que la muestra que menos cantidad de bacterias presenta es Páramo 1 “Paluguillo”, ya que se tomó en cuenta la solución pura para hacer los conteos bacterianos.

Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias significativas en los conteos bacterianos entre las muestras ($F=3,8$; $p < 0,05$; $gl=7$) (Anexo 5). En orden ascendente se obtuvieron conteos bacterianos de $4,01 \times 10^4$ para la muestra Páramo 1 “Paluguillo”, $1,22 \times 10^6$ para Cultivo 2 “Naranja”, $1,82 \times 10^6$ para Invernadero 1 “Ponte-tresa”, $2,28 \times 10^6$ para Invernadero 2 “Machachi”, $7,53 \times 10^6$ para Cultivo 1 “Mora”, $4,53 \times 10^7$ para Compost 2 “Agritab-Farmas”, $2,11 \times 10^8$ Compost 1 “Ponte-Tresa”, y por ultimo la muestra que tuvo el conteo más alto fue Páramo 2 “Cayambe” con $3,00 \times 10^9$ UFC/g.

Gráfico 2: Evaluación de los conteos de UFC/g de las 8 muestras de suelo



En el gráfico 2 se puede ver que los conteos de la muestra de suelo de Páramo 2 “Cayambe” fueron diferentes estadísticamente al resto de muestras, esta tuvo un conteo de $3,00 \times 10^9$ UFC/g. El resto de muestras se encuentran en el mismo rango por lo que se concluye que estas no tienen diferencias significativas. Los conteos bacterianos por gramo de muestra de este grupo van desde $4,01 \times 10^4$ UFC/g. correspondiente a la muestra de Páramo 1 “Cayambe” y el conteo correspondiente a Compost 1 “Ponte-Tresa” que fue de $2,11 \times 10^8$ UFC/g.

6.2 Clasificación de grupos morfológicos

La clasificación en grupos morfológicos se realizó por el método microscópico con el lente de inmersión de 100X. Se tomó en cuenta parámetros, como: el tamaño de las bacterias, tinción Gram, la forma y posición de la endoespora, deformación celular por esporulación, y presencia o ausencia de cristal bipiramidal. Para poder observar mejor se tomaron fotos de cada una de las bacterias (Anexos 6 a 14). Se realizó una tabla general con los grupos morfológicos obtenidos (Tabla 5). Esta clasificación generó 15 grupos morfológicos de los 166 aislados obtenidos del total de muestras analizadas.

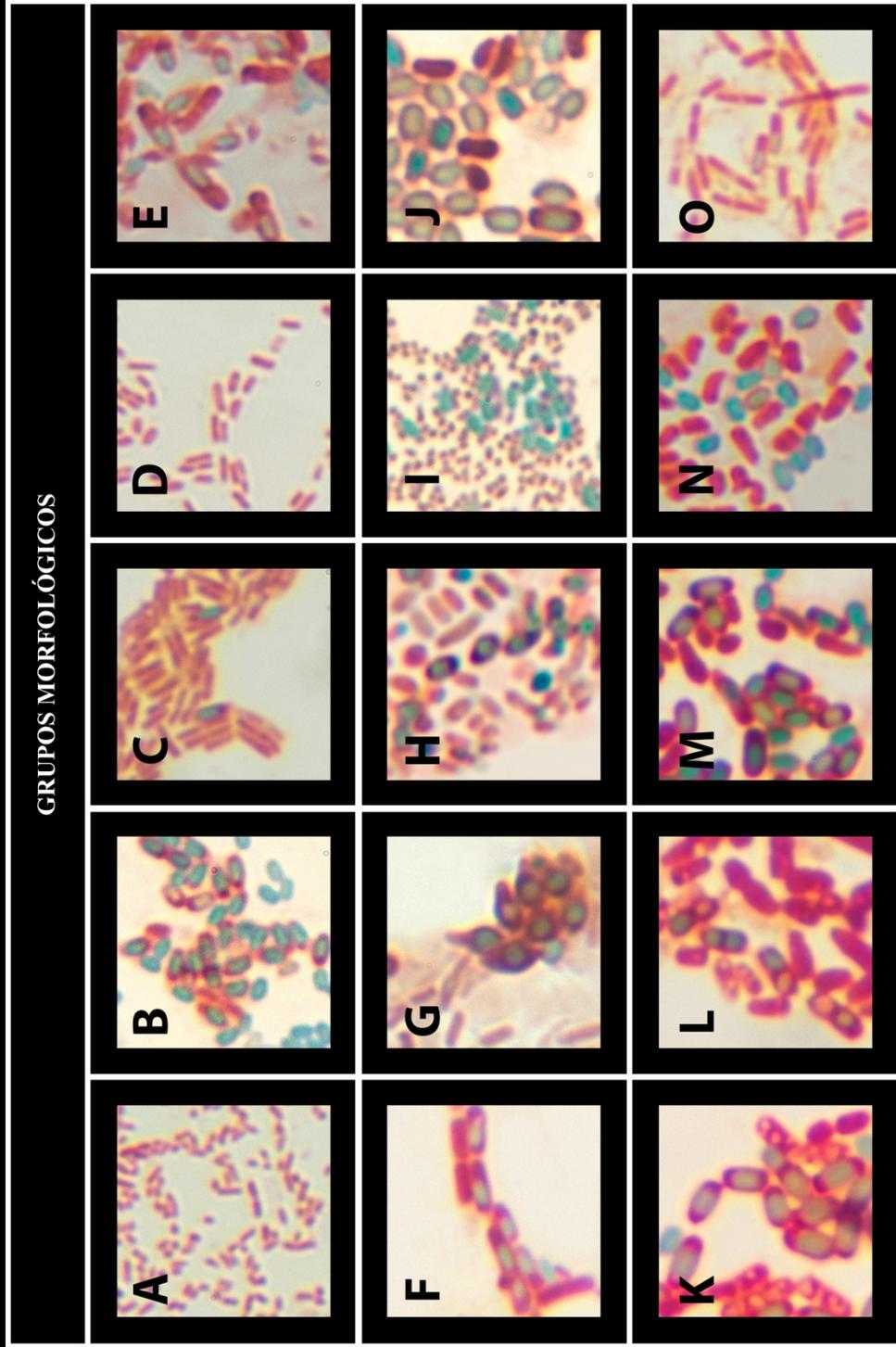
Tabla 5: Clasificación de grupos morfológicos

GRUPOS MORFOLÓGICOS	GRAM	FORMA ESPORA	POSICION ESPORA	DEFORMACION	PRESENCIA DE CRISTAL BIPIRAMIDAL
A	-	xxx	xxx	xxx	no
B	+	elipsoidal	central	no	no
C	+	elipsoidal	subterminal	no	no
D	-	xxxx	xxx	xxx	no
E	+	elipsoidal	subterminal	no	si
F	+	elipsoidal	subterminal	no	no
G	+	cilindrica	subterminal	si	no
H	+	circular	central	si	no
I	-	elipsoidal	xxxx	xxxx	no
J	+	elipsoidal	central	no	no
K	+	elipsoidal	central	no	no
L	+	circular (x2)	central	no	no
M	+	elipsoidal	central	no	no
N	+	elipsoidal	central	no	no
O	+	elipsoidal	subterminal	no	no

En la tabla 5 se puede observar las características de cada grupo morfológico obtenido, solo el grupo E mostró cristales bipiramidales observables al microscopio.

La figura 8 muestra una bacteria representativa de cada grupo morfológico

Figura 8: Bacterias representativas de cada grupo morfológico



Escala: 200x

Tabla 6: Número de aislados de cada grupo morfológico presentes en cada muestra de suelo analizada

GRUPOS MORFOLÓGICOS	COMPOST 1 PONTE-TRESA	COMPOST 2 AGRITAB-FARMS	PÁRAMO 1 PALUGUILLO	PÁRAMO 2 CAYAMBE	INVERNADERO 1 PONTE-TRESA	INVERNADERO 2 MACHACHI	CULTIVO 1 MORA	CULTIVO 2 NARANJA	# DE AISLADOS POR GRUPO MORFOLOGICO	
	NÚMERO DE AISLADOS									
A	1	16	5	10	1		1	3	37	
B	13	5	8	11	14	12	8	11	82	
C	1					2			3	
D		3							3	
E		1	1			1	2		5	
F		1							1	
G			10						10	
H			3						3	
I			2	7			1		10	
J					2				2	
K					2		1		3	
L							1		1	
M							2	1	3	
N								2	2	
O								1	1	
# DE AISLADOS POR MUESTRA	15	26	29	28	19	15	16	18	TOTAL AISLADOS	166
# DE GRUPOS MORFOLOGICOS POR MUESTRA	3	5	6	3	4	3	7	5		

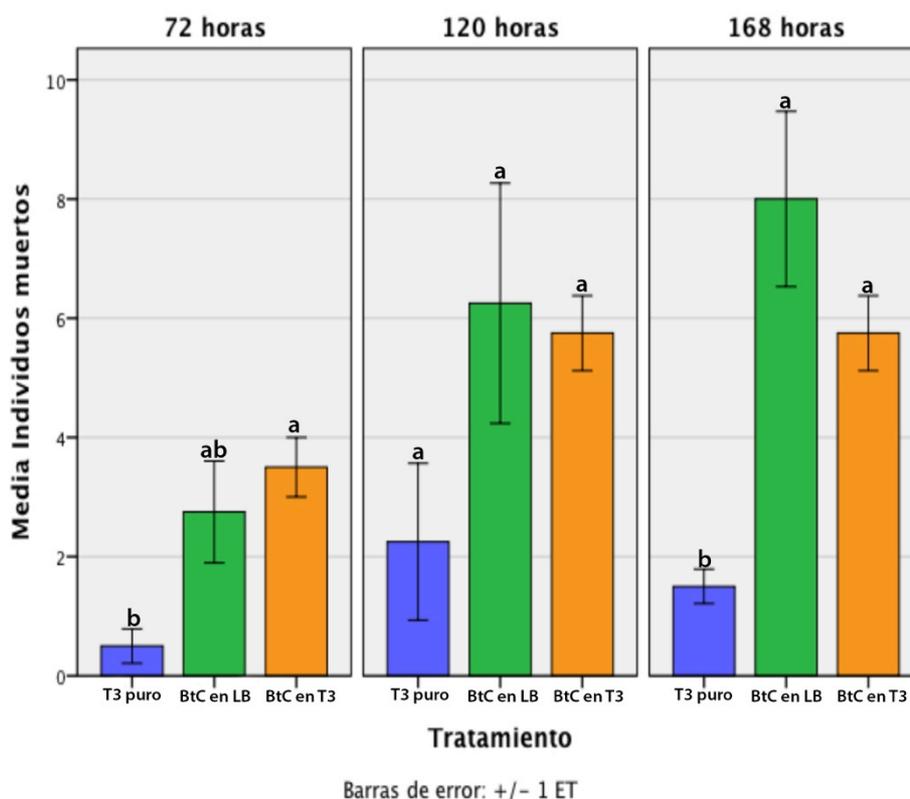
Existe una gran variación en la diversidad de las bacterias presente en cada muestra y por tanto presente en cada ambiente (Tabla 6). Así mismo, se puede ver que el grupo morfológico B está presente en todas las muestras de suelo, y que es el que más aislados presentó. El grupo que le sigue en abundancia es el grupo A, que estuvo presente en 7 de las 8 muestras de suelo analizadas, y presentó 37 aislados bacterianos. Hay grupos morfológicos que solo están presente en una muestra de suelo, por lo que se puede pensar que las características propias de dicho suelo hacen posible la vida de esa bacteria en ese ambiente.

6.3 Bioensayos

6.3.1 Bioensayos preliminares del efecto de los medios de cultivo en la mortalidad del ácaro *T. urticae*

Se realizaron bioensayos preliminares para evaluar el efecto acaricida de la bacteria control fermentada en dos medios de cultivo. Estos medios fueron T3 líquido y Luria Broth (Anexo 1). Como control negativo se usó el medio T3 puro sin bacteria, y como tratamientos se usó la bacteria control BtC en medio T3 y en medio LB. Lo que generó un total de 3 tratamientos. Se tomaron datos a las 72, 120 y 168 horas y se realizó una reaplicación de los tratamientos a las 72 horas. Se realizaron análisis de varianza (ADEVA) para cada día de los conteos de individuos muertos (Anexo 15).

Gráfico 3: Evaluación del efecto acaricida de BtC en T3 y BtC en LB a las 72, 120 y 168 horas.



La tendencia general tanto de los tratamientos como el control negativo es que los individuos vayan muriendo, de una población inicial de 15 hembras adultas de *T. urticae*.

Los análisis estadísticos muestran que a las 72 horas si hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($F=6,88$; $p < 0,05$; $gl=2$) (Anexo 15). Pero después vemos que a las 120 horas ya no hay una diferencia ($F=2,30$; $p > 0,05$; $gl=2$) (Anexo 15) . Es al final de la evaluación, a las 168 horas, que se ve una diferencia entre los tratamientos con la bacteria control y el medio puro ($F=12,35$; $p > 0,01$; $gl=2$) (Anexo 15). En el gráfico 3 se puede ver que no existe una diferencia significativa a las 168 entre los tratamientos de BtC en medio LB y BtC en T3, ya que se encuentran en el mismo rango.

En las evaluaciones de las poblaciones de huevos y ninfas a las 168 horas (Figura 9) se observó que en las hojas tratadas con BtC en T3 no había o era muy baja la población de huevos y de ninfas. En contraste, en las hojas tratadas con BtC en LB si había algunos huevos y ninfas. Además los ácaros tratados con BtC en T3 se veían secos en comparación con lo observado en el tratamiento con medio LB. La decisión de usar el medio T3 en los bioensayos, se toma a partir de la ausencia de huevos y ninfas a las 168 horas en las hojas tratadas con BtC en medio T3.

Figura 9: Evaluación del estado de huevos y ninfas en el medio puro, y los tratamientos de BtC en medio T3 y BtC en medio LB a las 168 horas.



6.3.2 Bioensayos con aislados bacterianos

A partir de las observaciones realizadas en el bioensayo previo se decidió hacer la fermentación de los aislados bacterianos en el medio T3. La aplicación y los conteos de individuos muertos se realizaron igual que en el bioensayo previo, y además se evaluó la población relativa de huevos y ninfas. En total se evaluó la acción acaricida de 22 de las bacterias aisladas, correspondientes a 4 de las 8 muestras de suelo colectadas (Tabla 7), más el control positivo con BtC y el control negativo que fue medio T3 puro sin bacteria. En total se evaluaron 24 tratamientos. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Tabla 7: Aislados bacterianos escogidos para realizar los bioensayos

GRUPOS MORFOLÓGICOS	COMPOST 2 AGRITAB-FARMS	PÁRAMO 1 PALUGUILLO	INVERNADERO 1 PONTE-TRESA	CULTIVO 1 MORA	
	 AISLADOS ESCOGIDOS 				
A	C2.13	P1.29	I1.23	Q1.2	
B	C2.20	P1.14	I1.12	Q1.10	
C					
D	C2.6				
E	C2.4	P1.23		Q1.4	
F	C2.23				
G		P1.15			
H		P1.5			
I		P1.21		Q1.13	
J			I1.2		
K			I1.5	Q1.14	
L				Q1.7	
M				Q1.8	
N					TOTAL AISLADOS ESCOGIDOS
O					
# DE GRUPOS MORFOLÓGICOS POR MUESTRA	5	6	4	7	22

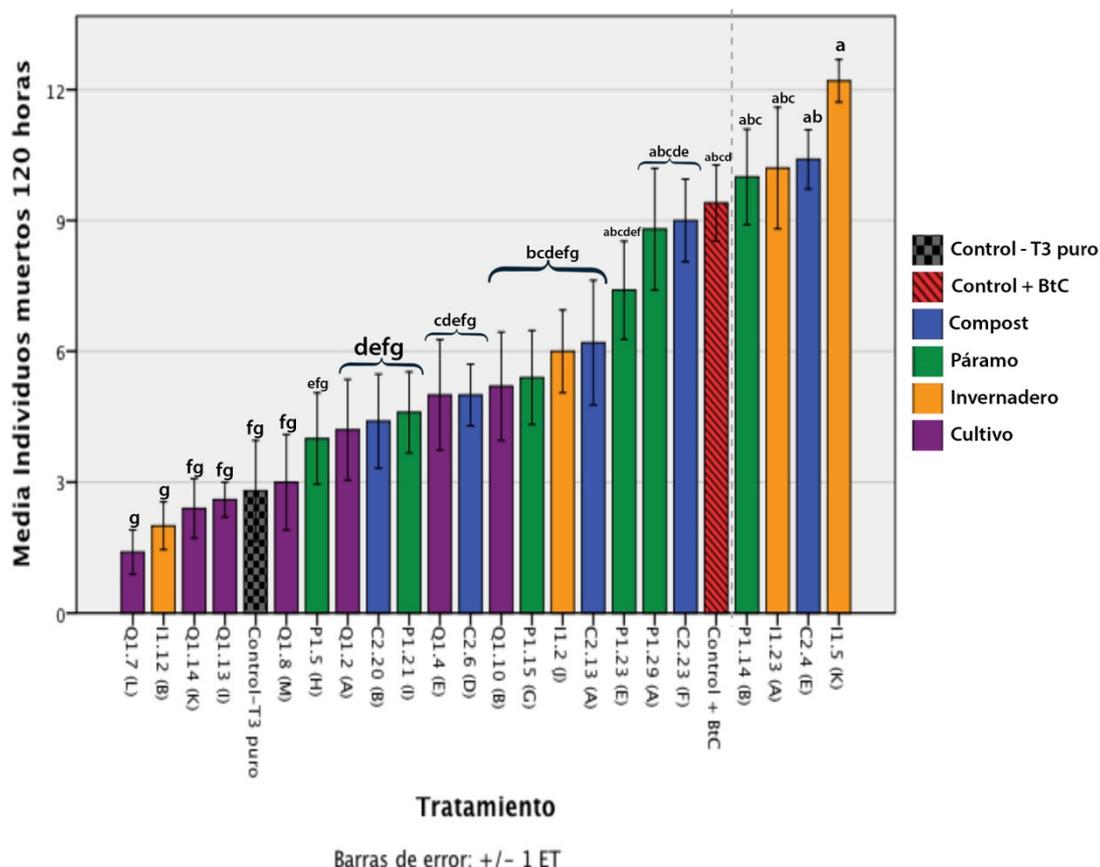
* más el control positivo con la bacteria BtC y el control negativo, medio T3 puro sin bacteria son en total 24 tratamientos.

En la tabla 7 se ven las bacterias elegidas representativas de cada grupo morfológico de las 4 muestras de suelo. Se eligieron más bacterias del mismo grupo morfológico provenientes de diferentes muestras de suelo, para evaluar el efecto acaricida dentro del mismo grupo morfológico.

6.3.2.1 Evaluación del efecto acaricida

Una vez escogidas las bacterias, se realizó la fermentación en medio T3, descrita en los materiales y métodos. Se realizaron los análisis estadísticos de los datos tomados a las 120 y 168 horas. Se observó que los tratamientos si presentaron diferencias significativas en ambos tiempos evaluados (Anexo 16).

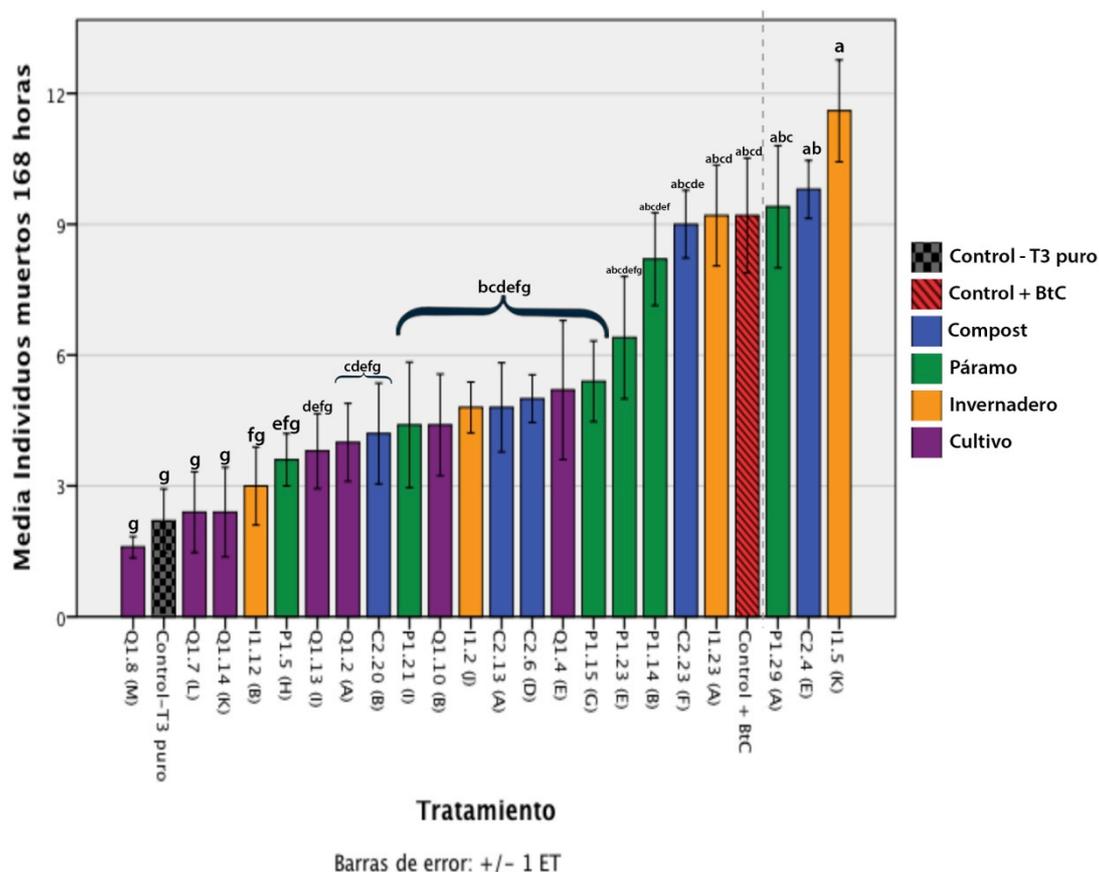
Gráfico 4: Evaluación de la acción acaricida de la aplicación de los aislados bacterianos a las 120 horas



El análisis de ADEVA mostró que el número de individuos muertos varía dependiendo de la aplicación de los tratamientos ($F=6,88$; $p < 0,0001$; $gl=23$) (Anexo 16). Los aislados P1.14(B), I1.23(A), C2.4(E) y I1.5(K) tiene un efecto acaricida igual o

inclusive mayor que el control positivo. En el gráfico 4 se observa que los aislados P1.29(A) y C2.23(F) también tienen un efecto acaricida, ya que no comparten rango con el control negativo, pero menor al de la bacteria control BtC.

Gráfico 5: Evaluación de la acción acaricida de la aplicación de los aislados bacterianos a las 168 horas

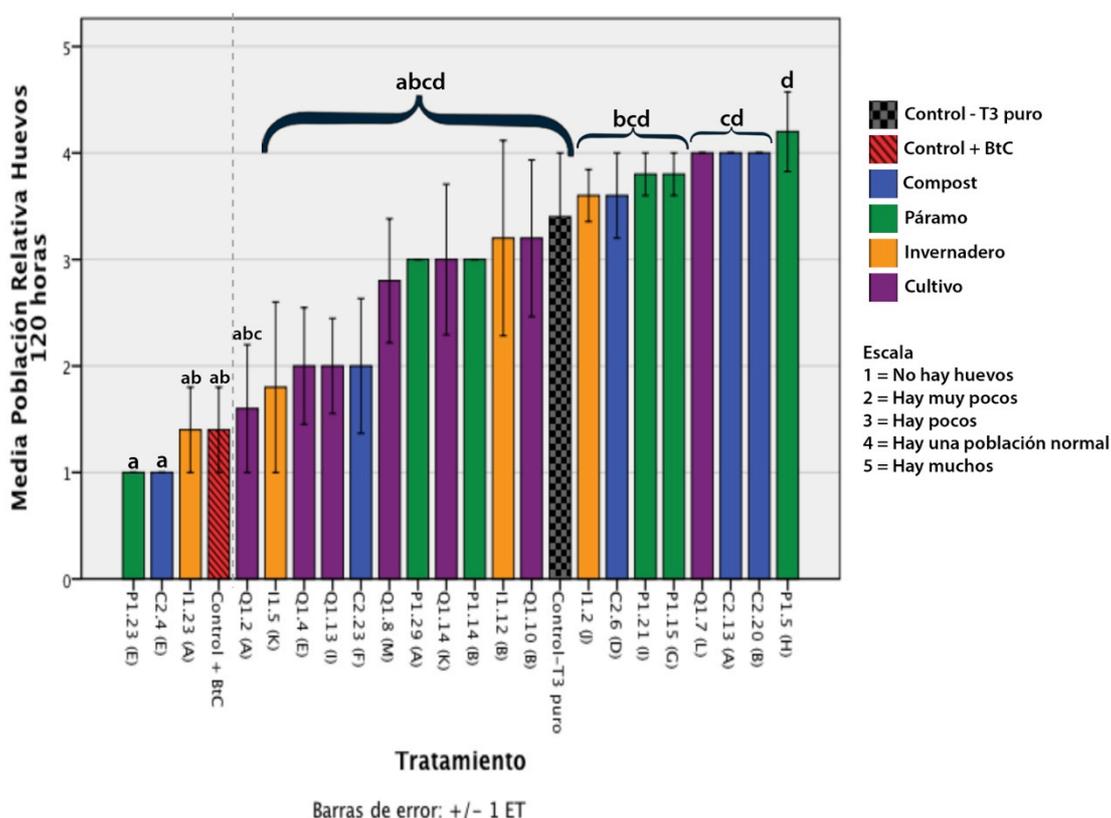


Los análisis estadísticos mostraron que las 168 horas también hay diferencia entre los tratamientos ($F=7,51$; $p < 0,0001$; $gl=23$) (Anexo 16). Las cepas P1.29(A), C2.4(E) y I1.5(K) muestran mayor número de individuos muertos, por sobre el control BtC (Gráfico 5). En comparación con el análisis a las 120 horas las cepas P1.14 (B) y I1.23(A) presentan una toxicidad menor que BtC pero estadísticamente aún comparten rango con el control positivo. A su vez la cepa P1.29(A) que no estaba entre los aislados de la evaluación a las 120 horas, aparece por encima del BtC. Las cepas P1.14(B), C2.23(F), y I1.23(A) son interesantes porque al no compartir características grupales con el control negativo demuestran que si tienen un efecto acaricida aunque en menor grado que la bacteria control BtC.

6.3.2.2 Análisis de la oviposición de hembras de *T. urticae*

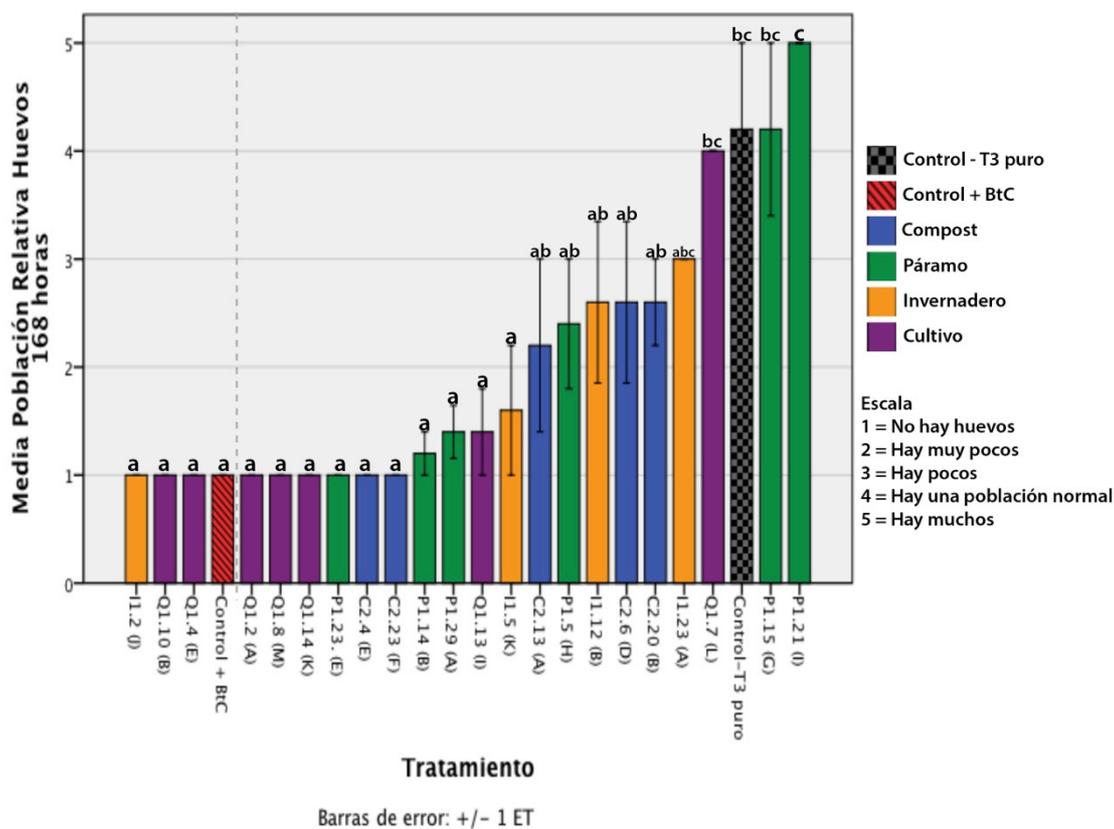
En este análisis se evaluó la posible inhibición de la oviposición de las hembras tratadas debido a la aplicación de los cultivos de los aislados bacterianos. Para esto se evaluó la población relativa de huevos haciendo una observación comparativa entre los tratamientos y se le asignó el número en la escala correspondiente a la infestación observada (1=no huevos, 5= muchos huevos). Igual que en el análisis de individuos muertos se evaluó estadísticamente los datos tomados a las 120 y 168 horas. Después de realizados las evaluaciones estadísticas los tratamientos presentan diferencias significativas tanto a las 120 ($F=5$; $p < 0,0001$; $gl=23$) y 168 horas ($F=9,10$; $p < 0,0001$; $gl=23$) (Anexo 17).

Gráfico 6: Evaluación del efecto en la oviposición a las 120 horas



En el análisis de oviposición a las 120 horas el control negativo y el control positivo comparten rango. vemos que las cepas P1.23(E), C2.4(E), y I1.23(A) presentan la población relativa de huevos más baja de los tratamientos (Gráfico 6).

Gráfico 7: Evaluación del efecto en la oviposición a las 168 horas

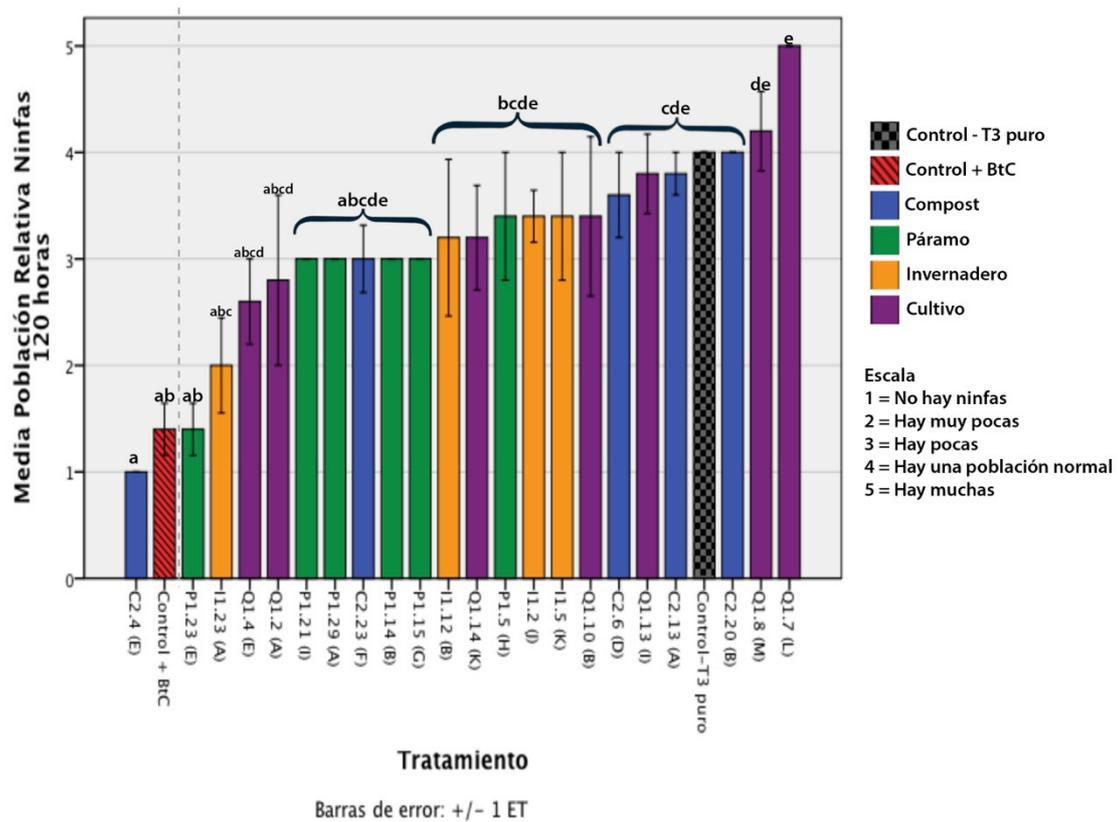


A las 168 horas ya se ve una diferencia entre los rangos estadísticos del el control negativo y positivo, pero también se ve una mayor uniformidad entre los tratamientos ya que mas del 50% de estos pertenecen al rango “a”. Si comparamos el gráfico 7 con el de los datos a las 120 horas, vemos que de las cepas que mostraron una fuerte inhibición antes: P1.23(F), C2.4(C), y I1.23(E), solo la última la cepa perdió su capacidad de frenar la oviposición, ya que no se encuentra dentro del grupo “a”.

6.3.2.3 Evaluación del efecto sobre larvas y ninfas

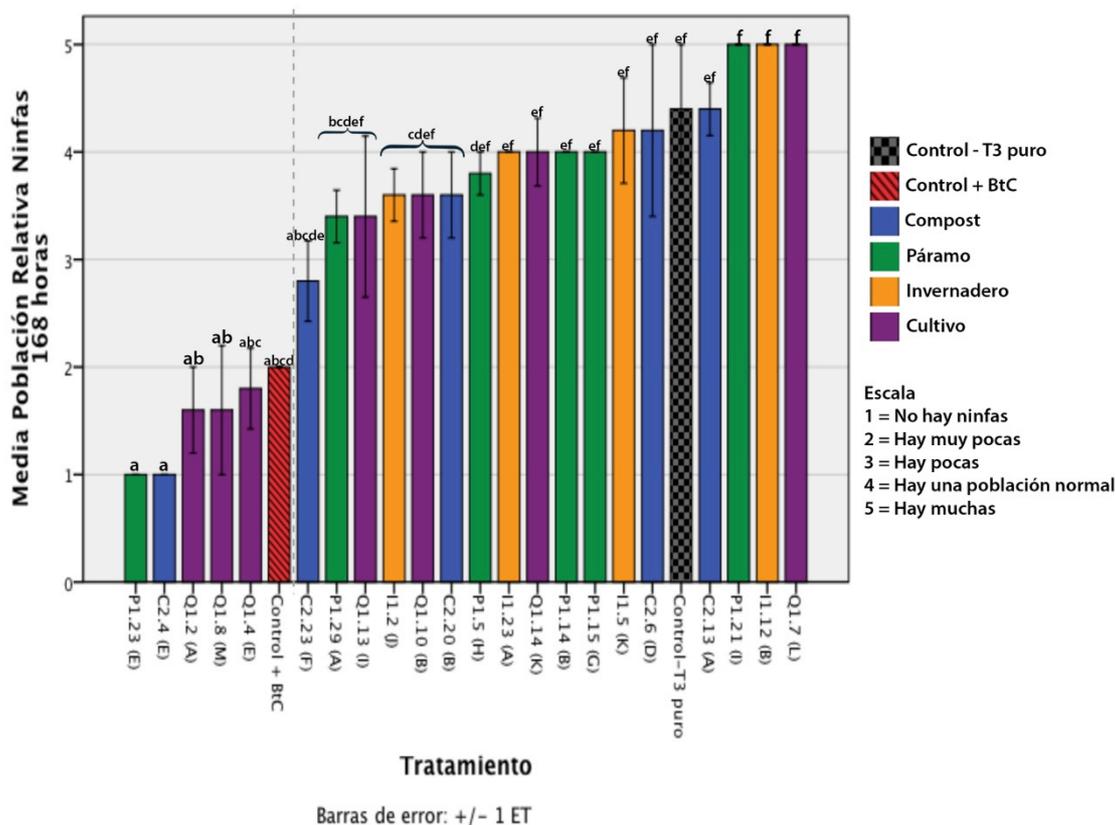
En este análisis se evaluó la posible inhibición en el desarrollo de los huevos y el efecto acaricida de los tratamientos hacia las larvas y ninfas de *T. urticae*. Al igual que en la evaluación de la población relativa de huevos, se hizo una observación comparativa entre los tratamientos y se le asignó el número que correspondiera a la infestación de ninfas en ese momento (1=no ninfas, 5= muchas ninfas). Los análisis estadísticos mostraron que si hubo diferencia significativa a las 120 ($F=5,41; p < 0,0001; gl=23$) y 168 horas ($F=11,45; p < 0,0001; gl=23$) (Anexo 18).

Gráfico 8: Evaluación del efecto sobre larvas y ninfas a las 120 horas



En el gráfico 8 se puede ver que los controles negativo y positivo no comparten características de rango. La cepa C2.4(E), inhibe más la infestación de ninfas que el control positivo y la cepa P1.23(F) presenta el mismo desempeño que BtC. Los demás tratamientos comparten características de rango con el control negativo, es decir no hay un efecto inhibitor sobre las ninfas del resto de las cepas evaluadas.

Gráfico 9: Evaluación del efecto sobre larvas y ninfas a las 168 horas



En el gráfico 9 se puede observar que a las 168 horas, igual que en la evaluación a 120 horas, si hay una diferencia entre los rangos del control positivo y negativo. Además se ve que hay 5 cepas: P1.23(E), C2.4(E), Q1.2(A), Q1.8(M), Q1.4(E) que presentan una población relativa inferior de ninfas a la de BtC. El resto de cepas comparten características de rango con el control negativo.

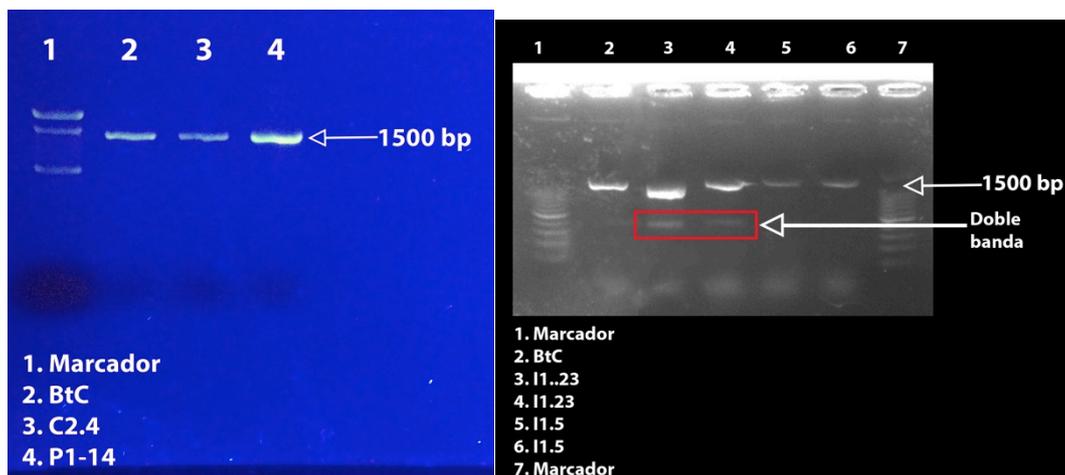
6.4 Caracterización molecular

6.4.1 Visualización en geles de agarosa

Se escogieron los aislados que mostraron mayor efecto acaricida en comparación al control positivo BtC a las 120 horas: P1.14(B), I1.23(A), C2.4(E) y I1.5(K), Se realizó la amplificación del fragmento 16S ADNr por medio de PCR para posterior caracterización en base a secuenciamiento Sanger. Se observaron las bandas en gel de agarosa. Las cepas P1.14(B), C2.4(E) y I1.5(K) mostraron una banda definida y fuerte de 1500 pares de bases, mientras con la cepa I1.23(A) no se pudo obtener un fragmento

definido aunque se hicieran varios intentos en optimizar la técnica. Por esta razón solo se hizo la purificación de ADN y la secuenciación de las cepas P1.14(B), C2.4(E) y I1.5(K).

Figura 10: Productos de PCR de las muestras de BtC, P1.14(B), C2.4(E), I1.5(K) y I1.23(A) usando los primers 16SR y 16SF



En la figura 10 se puede ver que de todas las muestras se pudo obtener una sola banda bien definida excepto de la cepa I1.23 (A), se ve también que las bandas están en el peso indicado de 1500 pares de bases.

6.4.2 Secuenciamiento

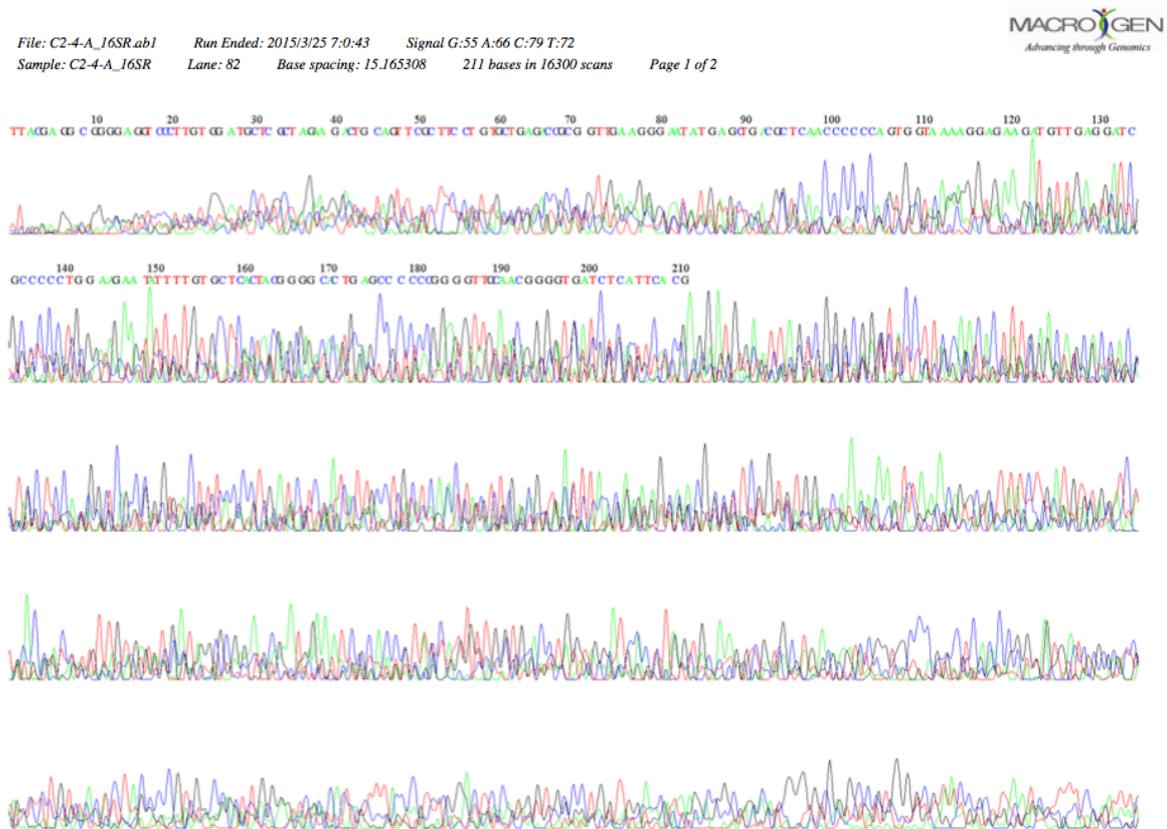
Las cepas que mostraron una sola banda bien definida fueron purificadas y se enviaron las muestras a MACROGEN en Corea para hacer la secuenciación mediante Sanger capilar.

La cantidad de ADN en la muestras se midió mediante NanoDrop (Anexo 4).

Se enviaron a secuenciar 2 muestras de BtC y de I1.5(K), y se envió solo una muestra de C2.4(E) y de P1.14(B).

La empresa MACROGEN realizó el secuenciamiento tanto en sentido delantero en el que la secuenciación va en el sentido 5' - 3' y en sentido reverso es decir la secuenciación va en el sentido 3' - 5' de la dirección estructural de ADN. De estos secuenciamientos se analizó los cromatogramas y se usó la mejor secuencia para

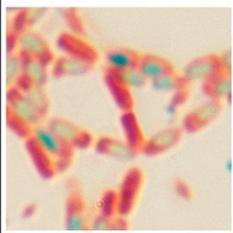
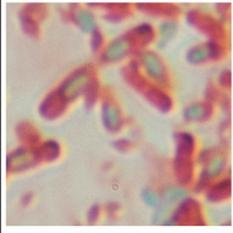
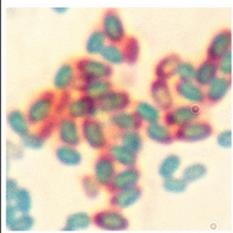
Figura 12: cromatograma en reverso de la secuencia de el aislado C2.4(E) que presento mala calidad



En la figura 12 se ve un cromatograma de muy mala calidad, se ve demasiado ruido tanto así que a los 210 pares de base se corta la secuenciación, este ruido puede ser resultado de una muestra contaminada o que hubo alguna interferencia en el proceso de la PCR.

Para el aislado P1.14(B) se usaron las dos secuencias por separado y produjeron los mismos resultados, los dos cromatogramas tenían buena calidad (Anexo 21 y 22). La cepa I1.5(K) presentó una baja calidad de su cromatograma de la secuencia en delantero, y una pésima calidad del cromatograma en reversa (Anexo 23 y 24) aún así se uso la parte que presentaba mejor calidad de la primera secuencia para la identificación.

Tabla 8: Resultados del análisis de las secuencias en BLAST

Aislado	Resultado	puntaje total	cobertura	Error	identidad	Fenotipo
BtC Control	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. YBT-1520, complete genome	24060	100%	0.0	100%	
C2.4	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. YBT-1520, complete genome	19348	100%	0.0	100%	
I1.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VRFPA04, complete genome	4529	99%	9,00E-158	99%	
P1.14	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168, complete genome	12367	100%	0.0	99%	

Fuente: Herramienta BLAST.

La bacteria BtC se identificó como *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* por lo que se asume que esta es la especie y variedad a la que corresponde la bacteria que se usó como control positivo en este estudio. El aislado bacteriano C2.4(E) igual correspondió a *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. La cepa I1.5(K) corresponde a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, El aislado P1.14(B), resultó ser *Bacillus subtilis*.

7. Discusión

El ácaro *Tetranychus urticae* es una de las plagas más graves en los cultivos bajo invernadero, su amplio espectro de plantas afectadas y su rápida reproducción hace de esta plaga difícil de controlar. En el caso de Ecuador es de vital importancia buscar

alternativas de manejo de *T. urticae* ya que es una plaga principal del cultivo de rosa, el cual es de gran impacto comercial en las exportaciones del país. En este contexto la generación de nuevas tecnologías amigables con al ambiente y económicamente rentables para el control del ácaro es prácticamente una necesidad en el país. El uso de biopesticidas como es el caso de los producidos en base a *Bacillus* es una alternativa viable.

Esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar una colección de aislados de *Bacillus* de muestras recogidas en diferentes localidades dentro de la provincia de Pichincha con el fin de encontrar nuevas cepas con acción acaricida. Se aislaron 166 bacterias que fueron clasificadas en 15 grupos morfológicos. Se evaluó el efecto acaricida, la inhibición de la oviposición y el efecto en las ninfas de 22 de las bacterias aisladas. De esta evaluación se apreció que 4 aislados mostraron alto potencial acaricida: P1.14(B), I1.23(E), C2.4(C) y I1.5(D). Las cepas P1.23(F), C2.4(C), y I1.23(E) tuvieron un efecto negativo en la oviposición de las hembras tratadas a las 120 horas y las cepas C2.4(E) y P1.23(F) tuvieron un efecto en la inhibición de la infestación de ninfas a las 168 horas.

En el estudio de Vardhan y otros (2013) se obtuvieron conteos bacterianos de *Bacillus* de entre 3×10^4 y 72×10^4 UFC/g de muestra de suelo. En el presente estudio se obtuvieron conteos entre $4,01 \times 10^5$ y $1,22 \times 10^7$. Si se comparan ambos estudios se aprecia que en la investigación de Vardhan y otros (2011) el rango en el que se encuentran los conteos es mucho más definido, y los conteos son menores que los registrados en esta investigación. Las diferencias en los conteos pueden deberse a las diferencias en las características de los suelos analizados y el método de aislamiento de *Bacillus* usado.

En este estudio se aislaron 166 bacterias en total, y de estas 5 cepas mostraron una morfología igual a la bacteria control BtC presentando cristales de forma bipiramidal, muy probablemente estas 5 cepas pertenecen a la especie *B. thuringiensis*. Para evaluar la eficiencia al aislar cepas de *B. thuringiensis* se usa el índice de *Bt*, el cual es el número de cepas de la especie *thuringiensis* dividido para el número de aislados obtenidos. Para este estudio el índice *Bt* fue de 0,03 lo cual significa que se obtuvo un 3% de *B. thuringiensis* del total de aislados. En las investigaciones realizada por Carrera (2009) y Ruíz de Escudero y otros (2004) el índice de *Bt* obtenido fue 0,55. En estas,

los aislados fueron identificados como *B. thuringiensis* por la presencia de cristales de diferentes formas. En el estudio de Hastowo y otros (1992) se reportaron frecuencias de 5-8% de *B. thuringiensis* es decir un índice de entre 0,5 y 0,8. Y en la investigación de Berón y Salerno (2006) el índice de *B. thuringiensis* fue de 0,027 un índice mucho mas parecido al obtenido en este estudio. Así mismo Dias y otros (1999) consiguieron un índice de 0,016 que es mucho menor que el obtenido en la presente investigación. Basándose en estos datos se puede concluir que el índice de *B. thuringiensis* en las muestras varia ampliamente según el protocolo de aislamiento usado, el parámetro usado para identificar a *Bacillus thuringiensis*, y el tipo y número de muestras que se esta analizando. El bajo porcentaje reportado en esta investigación puede deberse al método de aislamiento que se usó, o porque los métodos de tinción de bacterias no permitieron un clara observación de cristales más pequeños.

La abundancia de grupos morfológicos presentes dentro de las muestras manifiestan que el método de aislamiento generó aislados con gran diversidad dentro del género *Bacillus*. Pero si lo que se busca es aislar específicamente *B. thuringiensis* sería apropiado buscar otros protocolos de aislamiento y otros métodos de diferenciación de especies.

En general las comunidades microbianas del suelo y la rizosfera, son las más difíciles de caracterizar debido a su gran diversidad (Garbeva y otros, 2003). En la presente investigación se realizaron aislamientos y caracterizaciones de bacterias dentro del género *Bacillus* provenientes de muestras de suelo, para hacer los aislamientos se uso el protocolo de Molina y otros (2010) en el que las bacterias se cultivan en medio T3 y LB en cajas petri. En la investigación de Garbeva y otros (2003) se plantea que hay algunas bacterias presentes en el suelo que no tienen la capacidad de ser cultivadas en cajas petri, por lo que se asume que debido al método de aislamiento usado en esta investigación se podría haber perdido cepas de *Bacillus* presentes en los suelos analizados y que la biodiversidad es mucho más alta que la reportada en este estudio. Por esta razón durante la última década se han desarrollado técnicas que se basan en la amplificación por PCR extrayendo ADN directamente de las diluciones de suelo, sin la necesidad de realizar cultivos bacterianos en caja, lo que se recomienda para futuros estudios similares.

En el estudio de Garbeva y otros (2003) se realizaron muestreos de 3 parcelas: pasto permanente, tierra cultivada por corto tiempo y tierra cultivada por largo tiempo. De estas 3 muestras la que mayor biodiversidad mostró fue la muestra de pasto permanente con 16 especies de *Bacillus* seguida por las de tierra de cultivo por corto tiempo, con 10 especies y por último la tierra de cultivo por largo tiempo con 7 especies. Analizando estos datos se puede concluir que a mayor alteración en el suelo hay menor biodiversidad. Asumiendo que cada uno de los grupos morfológicos obtenidos en la presente investigación corresponde a una especie diferente de *Bacillus* se habrán obtenido 15 especies de *Bacillus* de las 8 muestras de suelo evaluadas. En la presente investigación la muestra con mayor diversidad fue el cultivo 1 “mora” con 7 grupos morfológicos seguido de Páramo 1 “Paluguillo” con 6 grupos, luego están las muestras de Cultivo 2 “Naranja” y Compost 2 “Agritab-Farms” que generaron 5 grupos morfológicos y el resto de muestras tuvieron entre 3 y 4 grupos morfológicos. Analizando estos datos se puede apreciar que hay una gran diferencia en la biodiversidad de las muestras, y que no necesariamente se relaciona la alta biodiversidad con suelos poco alterados. Si fuera ese el caso ambos páramos deberían presentar el mayor número de grupos morfológicos, y la muestra de Páramo 2 “Cayambe” solo generó 3 grupos morfológicos.

En el estudio de Garbeva y otros (2003) usando el método de amplificación directa del gen 16S ADNr sin usar cultivo en cajas petri, se obtuvieron 16 especies de *Bacillus*. En comparación a esta investigación en el estudio indicado se obtuvieron aproximadamente la misma cantidad de especies evaluando menos muestras. Esta diferencia puede ser consecuencia de la diferencia en la metodología usada en los aislamientos, o también puede ser porque algunas de las bacterias clasificadas dentro de un mismo grupo morfológico en esta investigación correspondan a más de una especie de *Bacillus*. Para poder asegurar cuantas especies de *Bacillus* se obtuvieron en este estudio se sugiere hacer secuenciaciones de todos los aislados obtenidos.

En cuanto a los bioensayos con *T. urticae*, en la mayoría de estudios, se evalúa directamente la mortalidad causada por la β -exotoxina producida por *Bacillus thuringiensis* sobre ácaros y no el efecto directo de todo el cultivo bacteriano como se realizó en esta investigación. En el estudio de Royalty y otros (1990) la mortalidad se evaluó a los 7 y 12 días después de la aplicación, en ese estudio concluyen que la aplicación tiene un efecto lento, pero al final controla todos los estadios del ácaro *T.*

urticae. En el estudio de Shoushtari y otros (2011) se evaluó la mortalidad al primero, segundo y tercer día después de la aplicación de los tratamientos, no encontrando efecto acaricida hacia los adultos de *T. urticae*. Esto pudo deberse a que no se esperó el suficiente tiempo para que la β -exotoxina hiciera efecto. En la presente investigación también se encontró que la bacteria tiene un efecto lento en la mortalidad del ácaro, ya que se tomaron datos a los 72, 120 y 168 horas, es decir a los 3, 5 y 7 días y al final se usó solamente los datos tomados a los 5 y 7 días después de la aplicación, ya que a los 3 días todavía no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos. Al saber que la β -exotoxina es una toxina de efecto lento es mejor realizar los conteos de individuos muertos después de las 72 horas de aplicación.

En esta investigación el control negativo mostró una mortalidad del 14,66 % y en el estudio de Royalty y otros (1990) tuvieron un mortalidad de 2,5%. El alto porcentaje obtenido en esta investigación puede deberse a que el protocolo de aplicación de los tratamientos fue diferente. En el estudio de Royalty y colaboradores, primero sumergieron las hojas en los tratamientos previo al traspaso de las hembras adultas, en contraste en esta investigación se asperjaron los cultivos bacterianos directamente a las hembras adultas de *T. urticae*

En el estudio de Hall y otros (1971) se probó el efecto acaricida de la β -exotoxina en el ácaro *Panonychus citri*, en varias concentraciones. En la dilución de la β -exotoxina al 0,01% al quinto día (120 horas) después de la aplicación obtuvieron una mortalidad corregida del 44%, un poco más baja que la obtenida en esta investigación, que para el control positivo con la bacteria BtC fue de 54,10%. Para los aislados bacterianos que mostraron mayor efecto acaricida que la bacteria control las mortalidades corregidas estuvieron entre 54,10% y 62,30%. Cabe recalcar que en el estudio de Hall y colaboradores cuando usaron la β -exotoxina pura se registro una mortalidad del 100% a los 3 días de aplicación. Esto sugiere que si se incrementa la concentración de la β -exotoxina de las bacterias aisladas, se podrían alcanzar un mayor efecto acaricida.

En la investigación realizada por Shoushtari y otros (2011) se evaluó el efecto de la β -exotoxina en la oviposición de las hembras de *T. urticae* y en el porcentaje de eclosión de los huevos. Para esto contaron los huevos que puso cada hembra tratada durante un periodo de 3 días. En ese estudio observaron que la β -exotoxina tiene efecto inhibiendo la oviposición de huevos pero no tiene un efecto en la eclosión de los

mismos. En el presente estudio también se evaluó el efecto de la aplicación de las bacterias aisladas en la oviposición, se observó que algunas de las cepas mostraron un efecto inhibitorio. De la evaluación de la oviposición a las 120 horas se deduce que los aislados P1.23(E), C2.4(E), y I1.23(A) pueden tener un efecto de inhibición en la oviposición (Gráfico 6). Cabe aclarar que se necesita hacer otros estudios para poder asegurar la capacidad de inhibir la oviposición de *T. urticae* de estas 3 cepas. En el estudio a las 168 horas más del 50% de los tratamientos se encuentra en el rango “a”, esta uniformidad entre los tratamientos puede deberse a que para esta etapa del ensayo muchos de los huevos que pusieron las hembras tratadas ya habían eclosionado. En este estudio no se evaluó el porcentaje de eclosión de los huevos si no la cantidad de ninfas presentes en las hojas, se observó que algunas cepas mostraron poblaciones relativamente menores a las de los otros tratamientos, por lo que se concluye que estas cepas pueden tener un efecto sobre las larvas y ninfas. En cuanto a la evaluación del efecto en las ninfas de los tratamientos a las 120 horas se aprecia que las cepas C2.4(E) y P1.23(E) tienen un efecto tóxico igual al de la bacteria control BtC. En el análisis a las 168 horas se observa que 5 aislados: P1.23(E), C2.4(E), Q1.2(A), Q1.8(M), Q1.4(E) mostraron poblaciones bajas de ninfas. En estos análisis los aislados P1.23(E) y C2.4(E) tienen un efecto sobre larvas y ninfas más fuerte que el resto de aislados evaluados.

Correlacionando el análisis de efecto sobre larvas y ninfas con el de la inhibición de la oviposición a las 120 horas, se puede inferir que de las cepas: P1.23(E), C2.4(E), y I1.23(A) que mostraron un efecto inhibitorio de la oviposición, las 2 primeras: P1.23(E), C2.4(E), también tienen un efecto larvicida. Esto hace de las cepas P1.23 y C2.4 aislados promisorios en el control de las poblaciones jóvenes de *T. urticae*.

El secuenciamiento del gen 16S ADN_r es una herramienta eficiente para hacer una clasificación detallada entre algunos grupos de *Bacillus*, pero entre las especies *B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* debido a que tienen una similaridad muy alta (>99%) es necesario usar otras técnicas (Mohamed y otros, 2007). Entre estas técnicas esta 16S ARDRA por sus siglas en inglés “Amplified Ribosomal DNA Restriction analysis” (Garbeva y otros, 2003, Vardhan y otros, 2011, Vardhan y otros, 2013).

La bacteria control BtC y el aislado C2.4(E) se identificaron por medio de secuenciación como *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* lo que se correlaciona con las observaciones por microscopia de estos aislados. El secuenciamiento del aislado I1.5(K) dio como resultado la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, pero esto no concuerda con las características fenotípicas de dicho aislados, probablemente porque al momento de realizar la PCR esta muestra pudo estar contaminada con *Pseudomonas*. El aislado P1.14(A) resultó ser *Bacillus subtilis* lo que concuerda con las características fenotípicas de este aislado observado a un aumento de 100x.

8. Conclusiones

- La muestra de Páramo 2 “Cayambe” presenta conteos bacterianos de 3×10^9 y fue estadísticamente diferente en el análisis frente a las otras muestras de suelo.
- A pesar de que no se encontró diferencias significativas en cuanto a la cantidad de bacterias, en el resto de las muestras se observaron diferencias en cuanto a la morfología y diversidad de los aislados.
- En total se catalogaron 166 aislados bacterianos de las 8 muestras de suelo provenientes de diferentes ambientes en 15 grupos morfológicos.
- De las 22 cepas evaluadas en la variable capacidad acaricida, las cepas P1.14(B), I1.23(A), C2.4(E) y I1.5(K), mostraron mayor número de individuos muertos, a las 120 horas y estas fueron escogidas como cepas con alto potencial acaricida.
- Las cepas P1.23(E), C2.4(E), y I1.23(A) tuvieron un efecto negativo en la oviposición de las hembras tratadas a las 120 horas.
- Las cepas C2.4(E) y P1.23(E) tuvieron un efecto en la inhibición de la infestación de ninfas a las 168 horas.
- A partir de la identificación molecular por medio de los secuenciamientos, se concluyó que la bacteria usada como control positivo BtC y el aislado C2.4(E) corresponden a *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. La cepa P1.14(B) correspondió a la bacteria *Bacillus subtilis*.

9. Recomendaciones

- Se recomienda probar otros métodos de aislamiento para obtener mayor cantidad de cepas y mayor cantidad de aislados productores de cristales.
- Hacer tinciones de los aislados obtenidos con azul de comassie que permiten una mejor diferenciación de los cristales al observarlos al microscopio.
- Ya que en el estudio de Carozzi y otros (1991) se observaron que algunos de los aislados bacterianos de *Bacillus* solo produjeron cristales cuando se les realizó el aislamiento con acetato por segunda o tercera vez, se recomienda utilizar este procedimiento con los aislados de bacterias que no mostraron cristales.
- Hacer aislamientos de *Bacillus* de muestras diferentes al suelo, como por ejemplo granos almacenados, insectos muertos y de telarañas.
- Hacer una estudio de otros medios de cultivo mas ricos en nutrientes que el medio T3, para evaluar si el aumento en los nutrientes afecta positivamente en la toxicidad de los aislados.
- Se recomienda realizar optimizaciones de los medios de cultivo para cada cepa que se encontró toxica en este estudio, y a su vez buscar alternativas como fuentes de nutrientes para los medios de fermentación que sean económicamente mas rentables.
- Evaluar el efecto en la mortalidad de ácaros depredadores de *T. urticae* con aplicaciones de los aislados P1.14(B), I1.23(A), C2.4(E) y I1.5(K) que en esta investigación mostraron un efecto acaricida fuerte.
- Hacer bioensayos específicos para evaluar el efecto que tiene la aplicación de los aislados en la oviposición de las hembras de *T. urticae*.
- Hacer bioensayos específicos para evaluar el efecto sobre las ninfas. que tiene la aplicación de los aislados.
- Realizar la caracterización molecular de un aislado de cada grupo morfológico que no se caracterizaron en esta investigación, para tener una mayor información de la diversidad de los aislados presentes en cada muestra y las posibles utilidades de cada uno de estos.
- Se recomienda usar otras herramientas genéticas además de la caracterización del 16S ADN_r, para poder confirmar los resultados obtenidos en esta investigación. Como por ejemplo la caracterización del gene 23S ADN_r, y

técnicas moleculares como electroforesis de enzimas multi-locus, análisis AFLP (Alvarez y del Valle, 2012, Chapman y Hoy, 1991, Ibrahim y otros, 2010). Y la región espaciadora intergenica (intergenic spacer region “ISR”) entre los genes 16S y 23S ADNr.

- Hacer caracterizaciones moleculares de las toxinas producidas por cada cepa aislada, de esta forma es más fácil diferenciar las cepas que podrían llegar a presentar toxicidad de las que no son tóxicas.
- A pesar de que muchas de las bacterias aisladas mostraron ser inocuas para *T. urticae* estas podrían presentar toxicidad a otras plagas, por lo que se recomienda hacer bioensayos con otros artrópodos.

10. Referencias

- Aktar, M. W., D. Sengupta y A. Chowdhury (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* **2**(1): 1-12.
- Alvarez, A. y F. d. del Valle (2012). Characterization and Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* Isolates that Are Potentially Useful in Insect Pest Control. *Biodiversity Enrichment in a Diverse World*. G. Akeem, InTech.
- Attathom, T. (2002). Biotechnology for insect pest control. *Sustainable Agricultural System in Asia* **2**: 73-84.
- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D. Ellis, G. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers y H. Burges (1997). Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worlwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *Journal of invertebrate pathology* **70**: 59-68.
- Berón, C. y G. Salerno (2006). Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl* **51**(6): 779-794.
- Brito, F. (2014). Identificación por fenotipo, cuantificación y técnicas moleculares de bacterias a dos profundidades en el cultivo "Hypericum" antes y después del tratamiento de 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina. Colegio de Ciencia e Ingeniería. Quito, Universidad San Francisco de Quito. **Ingeniero en Agroempresas**: 55.
- Carozzi, N., V. Kramer, G. Warren, S. Evola y M. Koziel (1991). Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polyrherase Chain Reaction Product Profiles. *Applied and enviromental microbiology* **57**(11): 3057-3061.
- Carrera, B. (2009). Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis berliner* autóctonos de Cuba. *Fitosanidad* **13**(2): 109-115.
- Cawoy, H., W. Bettiol, P. Ficker y M. Ongena (2011). Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases. *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*. M. Stoytcheva.
- CDC. "Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del Ensayo Biológico de la Botella de los CDC." Accesado 22 de abril 2015, desde http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_es.pdf.
- Centinkaya, F. (2002). Isolation of *Bacillus thuringiensis* and Investigation of Its Crystal Protein Genes. *Biotechnology and Bioengineering*. İzmir, Turquía, İzmir Institute of Technology. **Master of science**: 55.

- Cerna, E., J. Landeros, Y. Ochoa, J. Luna, O. Vásquez y O. Ventura (2009). Tolerancia del ácaro *Tetranychus urticae* Koch a cuatro acaricidas de diferente grupo toxicológico. *investigación y ciencia* **17**(44): 4-10.
- Chapman, M. y M. Hoy (1991). Relative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Tetranychidae and Phytoseiidae). *Journal of Applied Entomology* **111**: 147-154.
- Cranshaw, W. (2009) *Bacillus thuringiensis* Insect Series: Home and Garden 1-2
- Crissma, C., D. Cole y F. Carpio (1994). Pesticide use and farm worker health in Ecuadorian potato production. *American Journal of Agricultural Economics* **76**(3): 593-597.
- Dias, S., M. Sagardoy, S. Silva y J. Dias (1999). Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from Argentinean soils. *BioControl* **44**: 59-71.
- EPA (2014, 16 de mayo de 2014). "New Biopesticide Active Ingredients 1996-2010." Accesado 19 de abril, 2015, desde http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists/new_ai_2010.html.
- Fassler, J. (2011). "BLAST Glossary." Accesado 8 de mayo, 2015, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1762/>.
- Federici, B., H.-W. Park y Y. Sakano (2006). Insecticidal Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis*. Inclusions in Prokaryotes. J. Shively, Springer Berlin Heidelberg: 195-236.
- Fernandez, C. y R. Juncosa (2002). Biopesticidas ¿La Agricultura del futuro? *Phytoma* **141**: 14-19.
- Flores, R., R. Mendoza, J. Landeros, E. Cerna, A. Robles y N. Isiordia (2011). Caracteres morfológicos y bioquímicos de *Rosa x hybrida* contra *Tetranychus urticae* Koch en invernadero *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **3**: 473-482.
- Forero, G., M. Rodríguez, F. Cantor, D. Rodríguez y J. Cure (2008). Criterios para el manejo de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: tetranychidae) con el ácaro depredador *Amblyseius (Neoseiulus) sp.* (Acari: Phytoseiidae) en cultivos de rosas. *Agronomía Colombiana* **26**: 78-86.
- Garbeva, P., J. van Veen y J. van Elsas (2003). Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb Ecol* **45**(3): 302-316.

- García, D. (2011). Caracterización del perfil proteico de una cepa entomopatógena de *Bacillus pumilus*. Instituto de Biotecnología. Granada, España, Universidad de Granada. **Master en Biotecnología**.
- Hall, I., D. Hunter y K. Arakawa (1971). The effect of beta-exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on citrus red mite *Journal of invertebrate pathology* **18**: 359-362.
- Hastowo, S., B. Lay y M. Ohba (1992). Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *Journal of Applied Bacteriology* **73**: 108-113.
- Hossain, S., M. Haque y N. Naher (2006). Control of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) by some selected chemicals. *University Journal of Zoology, Rajshahi University* **25**: 15-18.
- Hoy, M. y Y.-L. Ouyang (1987). Toxicity of the p-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). *JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY* **80**: 507-511.
- Ibrahim, M., N. Griko, M. Junker y L. Bulla (2010). *Bacillus thuringiensis* a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs* **1**(1): 31-50.
- Itoua-Apoyolo, C., L. Drif, M. Vassal, H. DeBarjac, J. Bossy, F. Leclant y R. Frutos (1995). Isolation of Multiple Subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a Population of the European Sunflower Moth, *Homoeosoma nebulella*. *Applied and environmental microbiology* **61**: 4343-4347.
- Knight, A., E. Beers, S. Hoyt y H. Riedl (1990). Acaricide bioassays with spider mites (Acari: Tetranychidae) on pome fruits: evaluation of methods and selection of discriminating concentrations for resistance monitoring *JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY* **83** (5): 1752-1760.
- Koppert (2012). "Productos: Plagas y enfermedades." Accesado 18 de abril de 2015, 2015, desde <http://www.koppert.es/productos/productos-contra-plagas-enfermedades/>.
- Larrea, M. (2014). *Bacillus* spp. en *Tetranychus urticae* en rosas (*Rosa* spp.) bajo invernadero y sus eventos de patogenicidad. Escuela de biología aplicada. Quito, Ecuador. , Universidad Internacional del Ecuador. **Agrobiotecnólogo**: 96.
- Lee, C., S. Lee, E. Han y S. Kim (2004). Use of cell culture-PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. *Appl Environ Microbiol* **70**(11): 6695-6705.
- Macke, E., S. Magalhaes, H. Khan, A. Luciano, A. Frantz, B. Facon y I. Olivieri (2011). Sex allocation in haplodiploids is mediated by egg size: evidence in the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proc Biol Sci* **278**(1708): 1054-1063.

- Mohamed, E., M. Abe, K. Ghanem, Y. Abdel-Fattah, Y. Nakagawa y E. El-Helow (2007). Diversity of *Bacillus* genotypes in soil samples from El-Omayed biosphere reserve in Egypt. Journal of culture collections **5**: 18-84.
- Molina, C., J. Caña-Roca, A. Osuna y S. Vilchez (2010). Selection of a *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) Larvae. Applied and environmental microbiology **76**: 1320–1327.
- Nester, E., L. Thomashow, M. Metz y M. Gordon (2002). 100 years of *Bacillus thuringiensis*. A critical scientific Assessment, American Academy of Microbiology.
- Özcan, O. (2008). Medium development for production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Graduated school of natural and applied sciences. Ankara, Turquía, Middle East Technical University **Master of science in biotechnology**: 91.
- Rampersad, J. y D. Ammons (2005). A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. BMC Microbiology **5**(53).
- Reinoso, Y., L. Casadesús, A. García, J. Gutiérrez y V. Álvarez-Rivera (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias de género *Bacillus* antagonistas de *Pectovacterium carotovorum*. Fitosanidad **10**(3): 187-191.
- Royalty, R., F. Hall y R. Taylor (1990). Effects of Thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) Mortality, Fecundity, and Feeding. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY **83**(3): 792-798.
- Ruíz de Escudero, I., I. Ibañez, M. Padilla, A. Carnero y P. Caballero (2004). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedente de muestras de tierra de Canarias. Boletín de sanidad vegetal plagas **30**: 703-712.
- Sachidanadham, R., K. Jenny, A. Fiechter y K. Jayaraman (1997). Stabilization and increased production of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* in steady- and transient-state continuous cultures. Applied microbiology biotechnology **47**: 12-17.
- Shoushtari, R., S. Modarres y N. Zamani (2011). Study on β -exotoxin (thurigiensin) effect on biology and growth parameters of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on common bean. Researches of the first international conference: 1-6.
- Taborsky, V. (1992). Small-Scale processing of microbial pesticides. Praga, Checoslovaquia, Food and Agriculture of the United Nations FAO.
- Todar, K. (2012). Todar's online textbook of microbiology.
- Travers, R., P. Martin y C. Reicherlderfer (1987). Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. Applied and environmental microbiology **53**: 1263-1266.

- Uribe, D., W. Marinez y J. Cerón (2003). Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of invertebrate pathology* **82**: 119-127.
- Valencia, G. (2014). Aislamiento y caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* spp. a partir de plantaciones de rosas infestadas con el ácaro *Tetranychus urticae* para su posible uso como biocontrol. Quito, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. **Ingeniería en Biotecnología**: 55.
- Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw y L. Tirry (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**(8): 563-572.
- Van Rie, J. (2000). *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *International Journal of Medical Microbiology* **290**(4-5): 463-469.
- Vardhan, S., R. Kaushik, A. Saxena y D. Arora (2011). Restriction analysis and partial sequencing of the 16S rRNA gene as index for rapid identification of *Bacillus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**(2): 283-296.
- Vardhan, S., A. Yadav, A. Pandey y D. Arora (2013). Diversity analysis of biocontrol *Bacillus* isolated from rhizospheric soil of rice-wheat (*Oryza sativa-Triticum sativum* L.) at India. *J Antibiot (Tokyo)* **66**(8): 485-490.
- Wakisaka, Y., E. Masaki y Y. Nishimoto (1982). Formation of Crystalline δ -Endotoxin or Poly- β -Hydroxybutyric Acid Granules by Asporogenous Mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology* **43**(6): 1473-1480.
- WHO (1999). Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*. Environmental health criteria. Ginebra, World Health Organization WHO. **217**.
- Yul, R., J. Choi, M. Li, B. Jin y Y. Je (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**(4): 547-559.
- Zapata, S. (2008). Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada BIO 250L. Universidad San Francisco de Quito.
- Zhang, Z.-Q. (2003). Mites of Greenhouses Identification, Biology and Control. Cambridge, Reino Unido, CABI Publishing.

11. Anexos

Anexo 1: medios de cultivo usados en esta investigación

1. L Broth Acetato de Sodio 0,25 M (1 ltr)

INGREDIENTES	CANTIDAD
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Acetato de Sodio	20,51 g

2. L agar (1 ltr)

INGREDIENTES	CANTIDAD
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g

3. T3 liquido (1 ltr)

INGREDIENTES	CANTIDAD
Triptona	3 g
Triptosa	2 g
Extracto de Levadura	1,5 g
Fosfato de Sodio	6,9 g
MnCl	0,005 g

4. T3 Agar (1 ltr)

INGREDIENTES	CANTIDAD
Triptona	3 g
Triptosa	2 g
Extracto de Levadura	1,5 g
Fosfato de Sodio	6,9 g
MnCl	0,005 g
Agar	15 g

5. Luria Broth o LB (1 ltr)

INGREDIENTES	CANTIDAD
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Anexo 2: Protocolo para realizar tinción Gram

Una vez listos los frotis bacterianos que se van a teñir se cubre los frotis con una solución de cristal violeta por 1 minuto, al terminar el minuto se lava la placa con agua corriente evitando que el chorro de agua caiga directamente sobre el frotis, luego se cubre el frotis con lugol por un minuto, al terminar se repite el lavado, luego se lava la placa con solución decolorante o alcohol cetona por 10 segundos, se lava nuevamente la placa y se cubre el frotis con solución de safranina por 1 minuto, por ultimo se deja secar la placa y se observa al microscopio, las bacterias Gram positivas se verán de color violeta y las Gram negativas se verán de color rojo carmín (Royalty y otros, 1990)

Anexo 3 : Protocolo para realizar a tinción de endoespora

Una vez listos los frotis bacterianos que se van a teñir se pone el colorante verde de malaquita sobre cada placa y se aplica calor de vapor de agua por 5 minutos para que el colorante entre en la endoespora. Se hace un lavado con agua evitando que el chorro caiga directamente sobre el frotis, en este lavado el colorante se queda en las endoesporas pero no en el resto de la células. Luego se realiza una tinción de contraste con safranina por un minuto y se lava. Por ultimo se observa al microscopio. Las endoesporas se verán verdes y las células vegetativas se verán rojas (Zapata, 2008)

Anexo 4: medición de la concentración de ADN de las muestras que se enviaron a secuenciar.

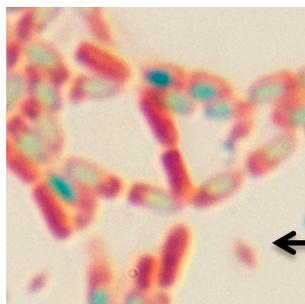
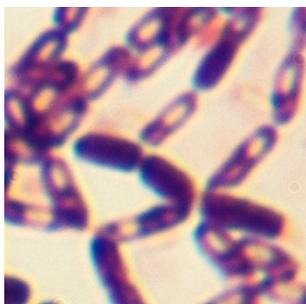
Tabla #: Concentración de ADN medida en NanoDrop

Muestra	Concentración ADN
BTB-1	39,9 ng/ μ l
BTB-2	63,3 ng/ μ l
C2.4-1	31,5 ng/ μ l
P1.14-1	78,9 ng/ μ l
I1.5-1	22,6 ng/ μ l
I1.5-2	20,7 ng/ μ l

Anexo 5: ADEVA evaluación de conteos bacterianos de las 8 muestras de suelo analizadas

ADEVA de un factor					
UFC/g					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,31E+19	7	3,30E+18	3,808	0,013
Intra-grupos	1,39E+19	16	8,68E+17		
Total	3,70E+19	23			

Anexo 6: Fotografías de la tinción Gram y tinción de endoespora de la bacteria control BtC (200x)

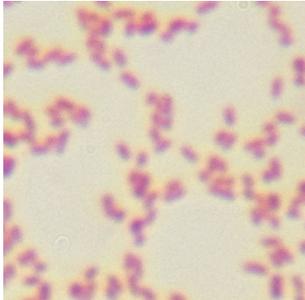


← Cristales bipiramidales

**Anexo 7: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Compost 1
“Ponte-Tresa” (200x)**

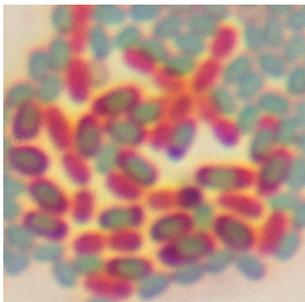
GRUPO MORFOLOGICO A

C1.1

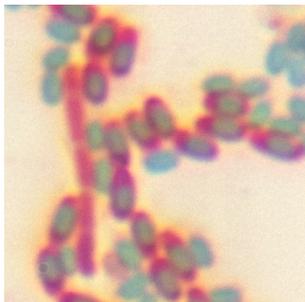


GRUPO MORFOLOGICO B

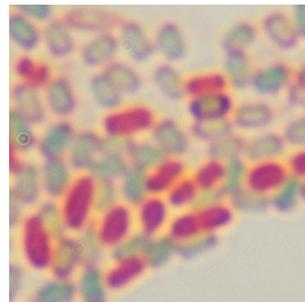
C1.2



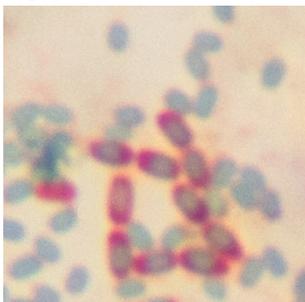
C1.3



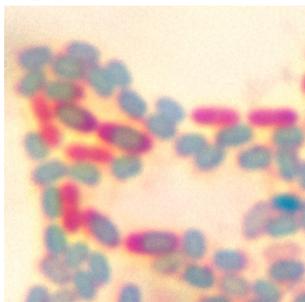
C1.4



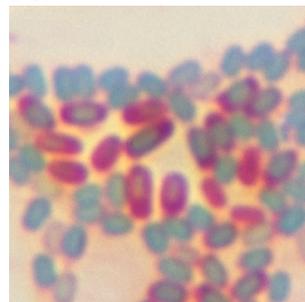
C1.5



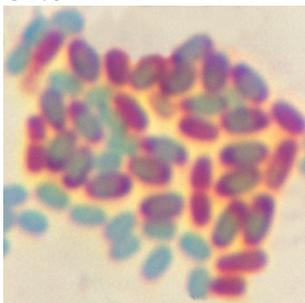
C1.6



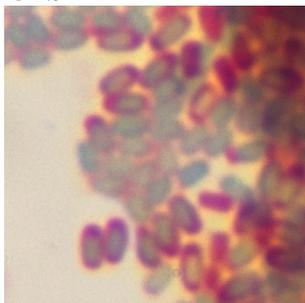
C1.7



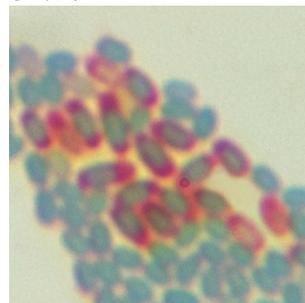
C1.8



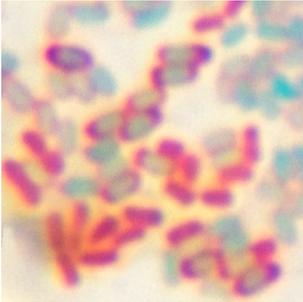
C1.9



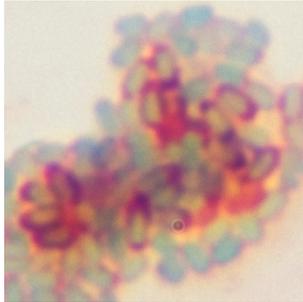
C1.10



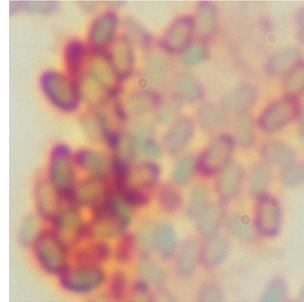
C1.13



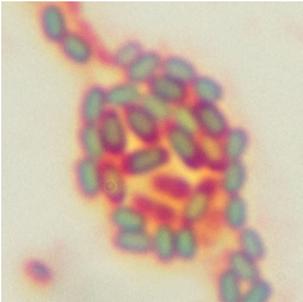
C1.14



C1.15

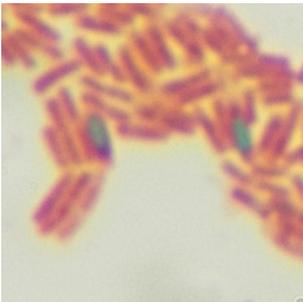


C1.16



GRUPO MORFOLOGICO C

C1.11



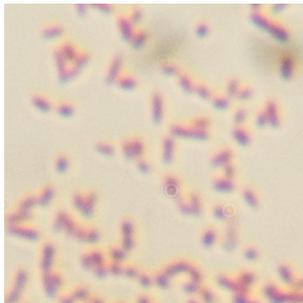
Anexo 8: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Compost 2 “Agritab-Farm” (200x)

GRUPO MORFOLÓGICO A

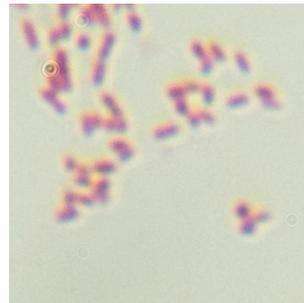
C2.1



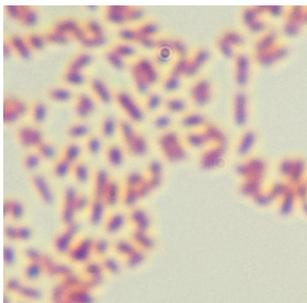
C2.3



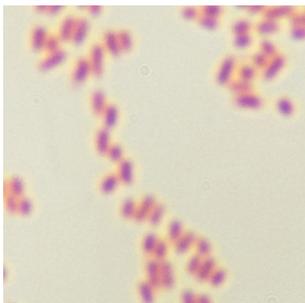
C2.5



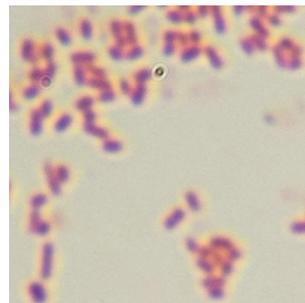
C2.8



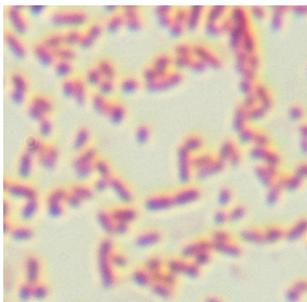
C2.10



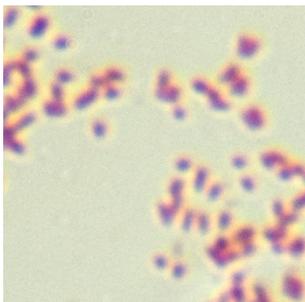
C2.12



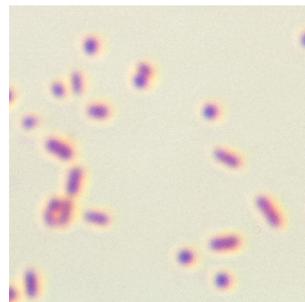
C2.13



C2.14

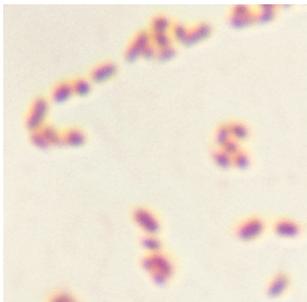


C2.15

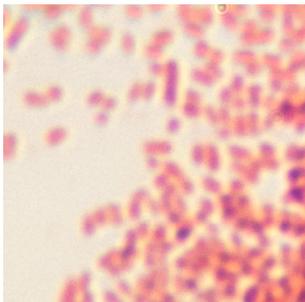


*Bioensayo

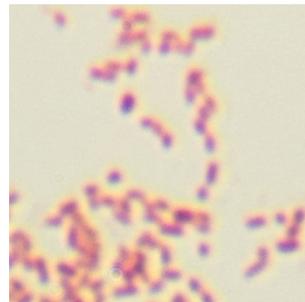
C2.16



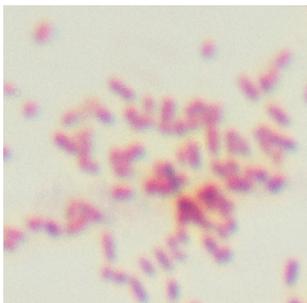
C2.17



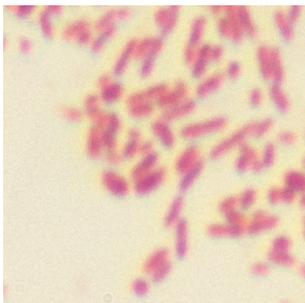
C2.18



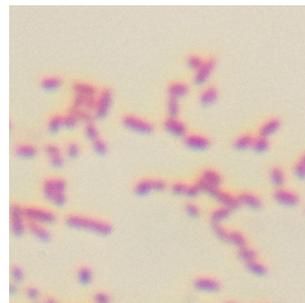
C2.19



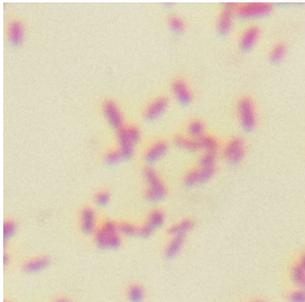
C2.22



C2.24

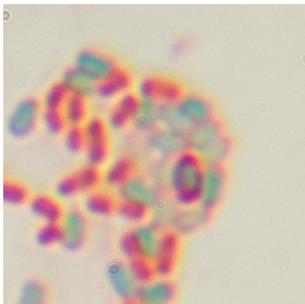


C2.25

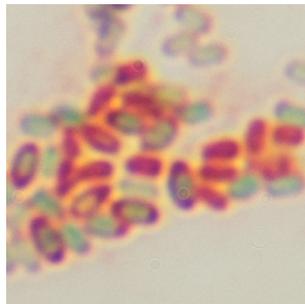


GRUPO MORFOLOGICO B

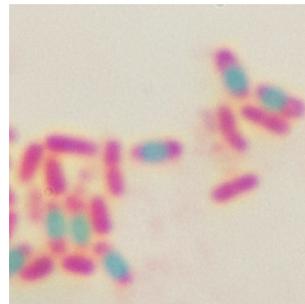
C2.7



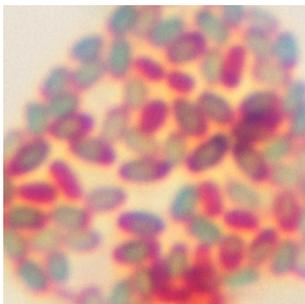
C2.9



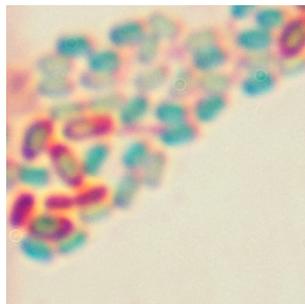
C2.11



C2.20



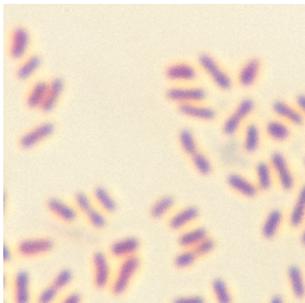
C2.21



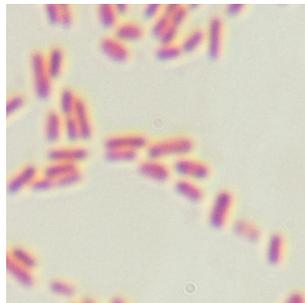
*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO D

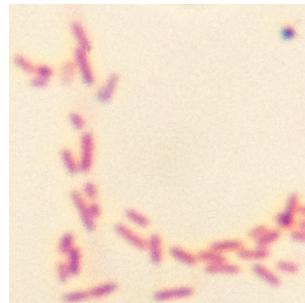
C2.2



C2.6



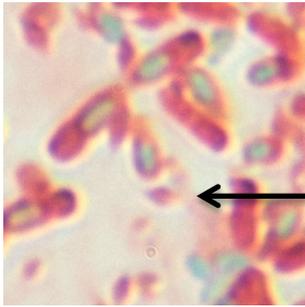
C2.26



*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO E

C2.4

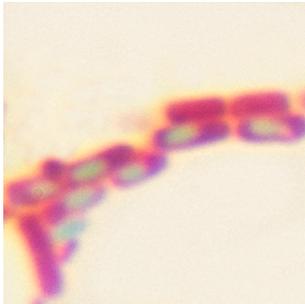


← Cristales
bipiramidales

*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO F

C2.23

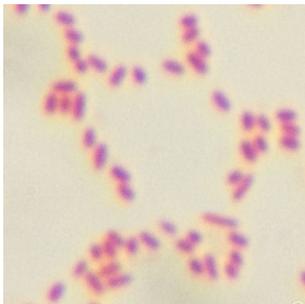


*Bioensayo

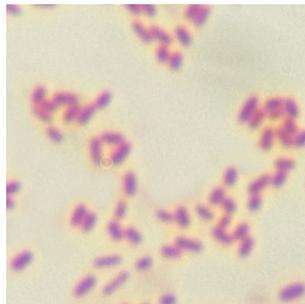
**Anexo 9: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Páramo 1
“Paluguillo” (200x)**

GRUPO MORFOLOGICO A

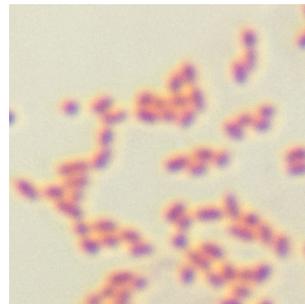
P1.2



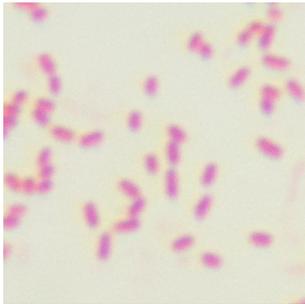
P1.13



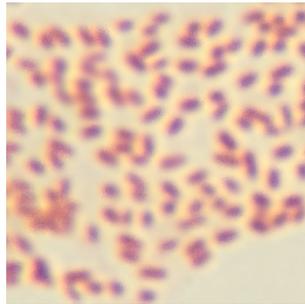
P1.16



P1.28



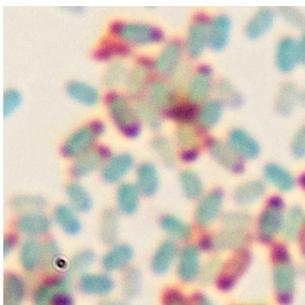
P1.29



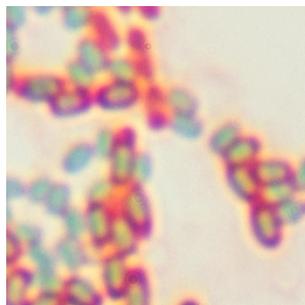
*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO B

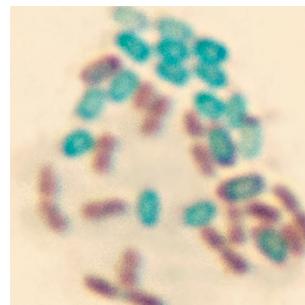
P1.1



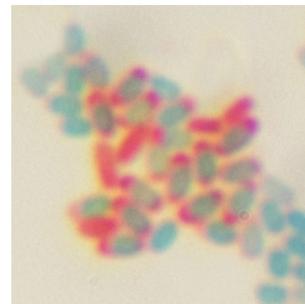
P1.3



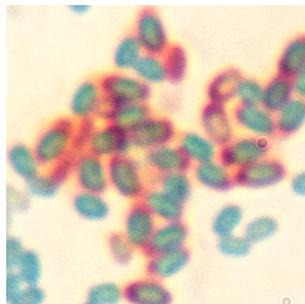
P1.6



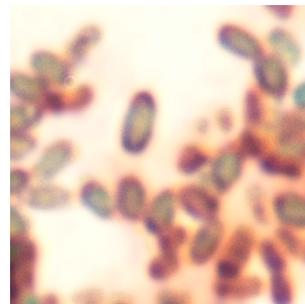
P1.8



P1.14

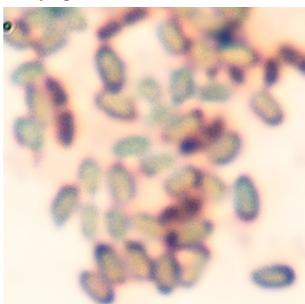


P1.22

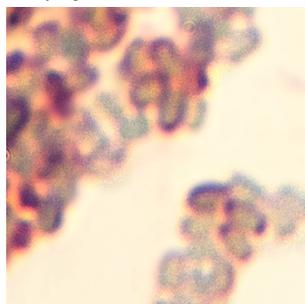


*Bioensayo

P1.25

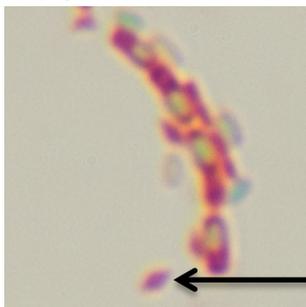


P1.26



GRUPO MORFOLOGICO E

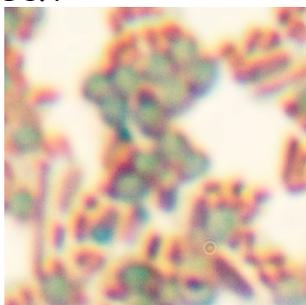
P1.23

Cristales
bipiramidales

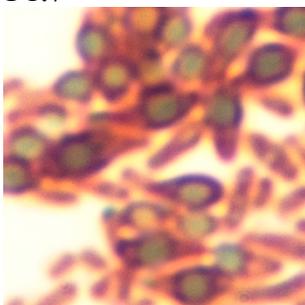
*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO G

P1.4



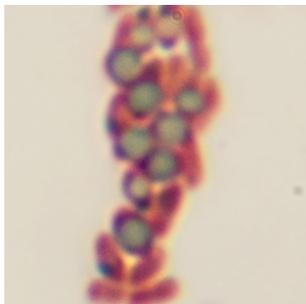
P1.7



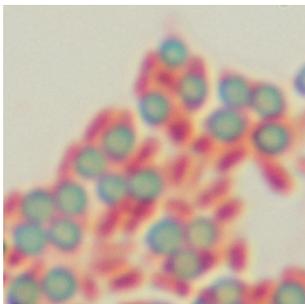
P1.9



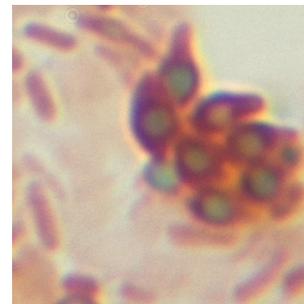
P1.10



P1.12

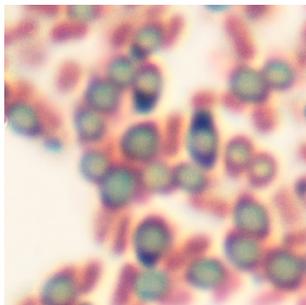


P1.15



*Bioensayo

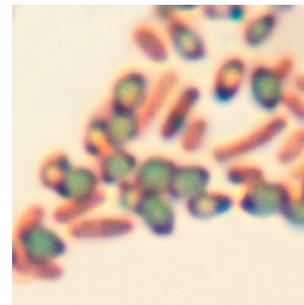
P1.17



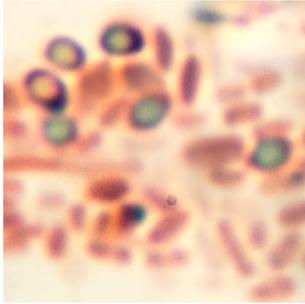
P1.18



P1.20

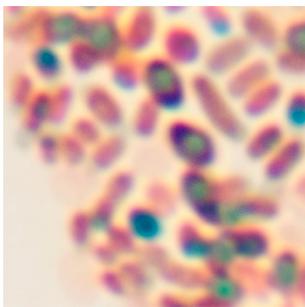


P1.24

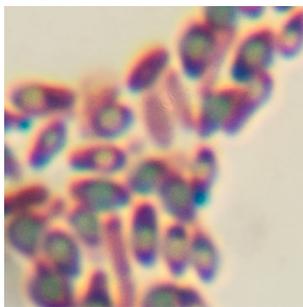


GRUPO MORFOLOGICO H

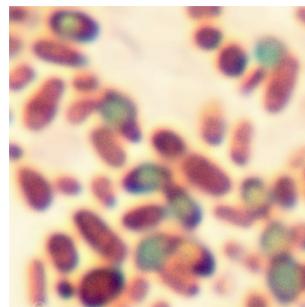
P1.5



P1.11



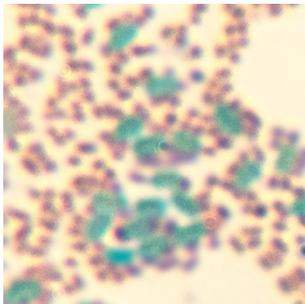
P1.19



*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO I

P1.21



P1.27

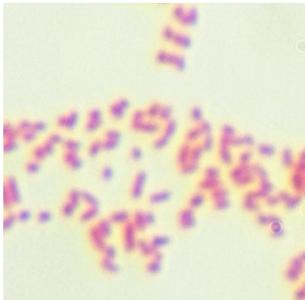


*Bioensayo

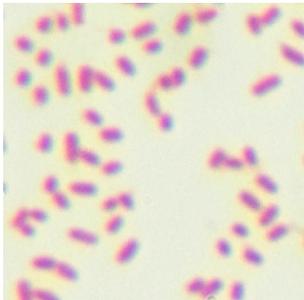
**Anexo 10: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Páramo 2
“Cayambe” (200x)**

GRUPO MORFOLÓGICO A

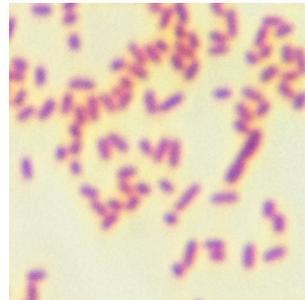
P2.9



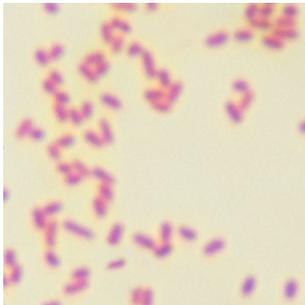
P1.12



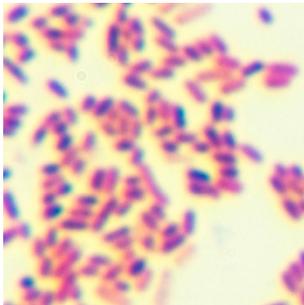
P2.13



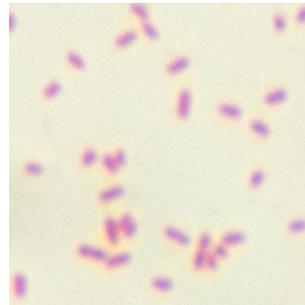
P2.14



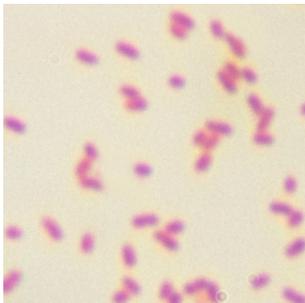
P2.15



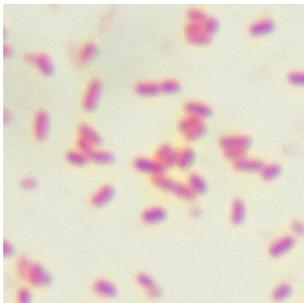
P2.23



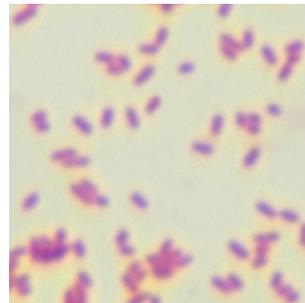
P2.24



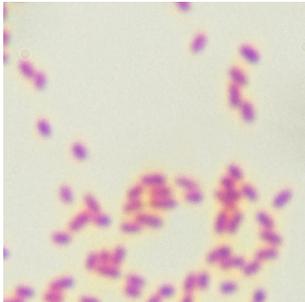
P2.25



P2.26

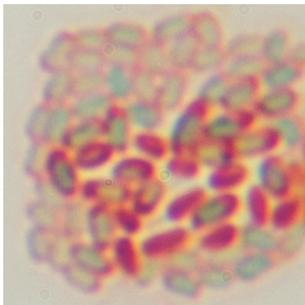


P2.28

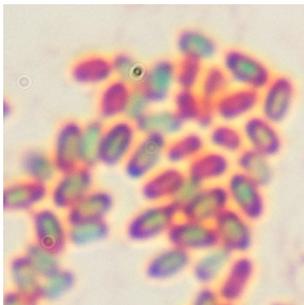


GRUPO MORFOLOGICO B

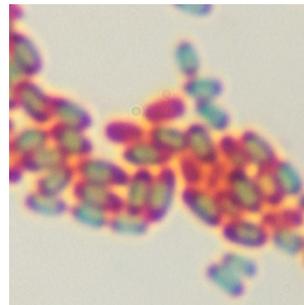
P2.1



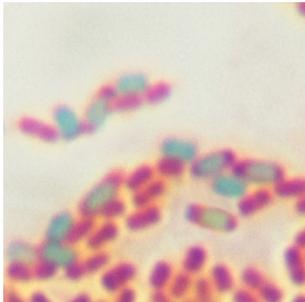
P2.4



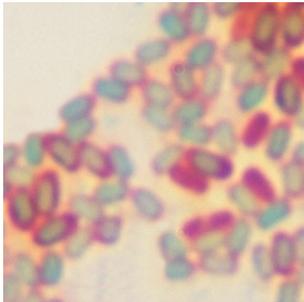
P2.8



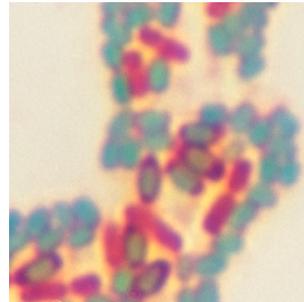
P2.16



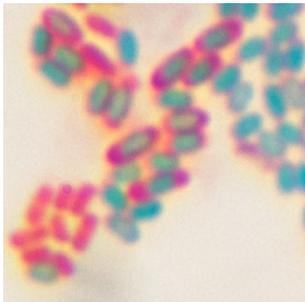
P2.10



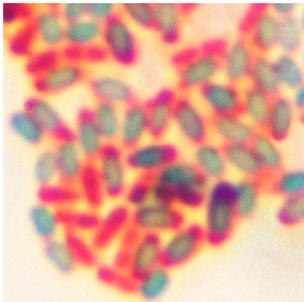
P2.11



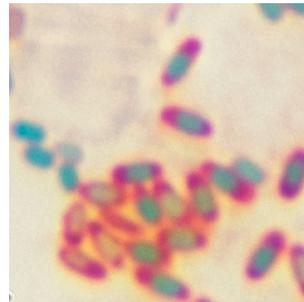
P2.17



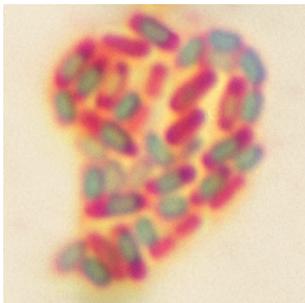
P2.20



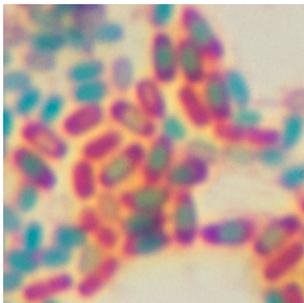
P2.21



P2.22

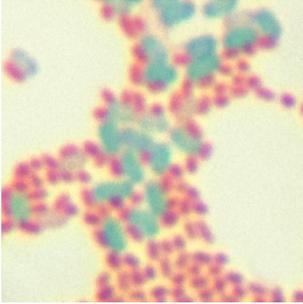


P2.27

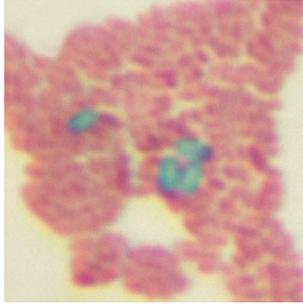


GRUPO MORFOLOGICO I

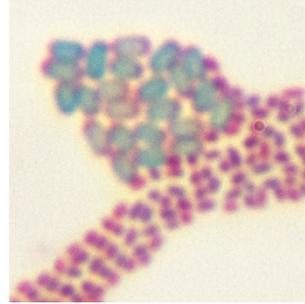
P2.2



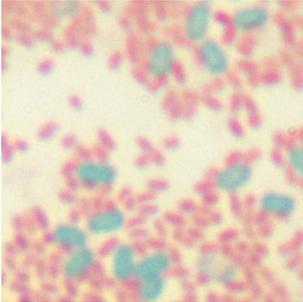
P2.3



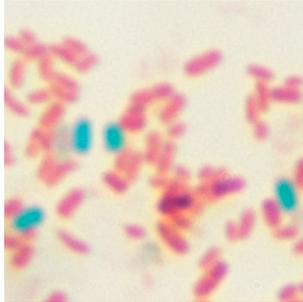
P2.5



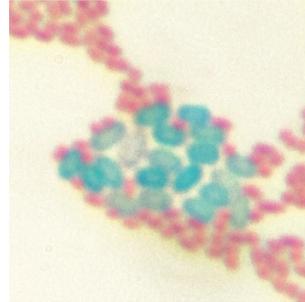
P2.6



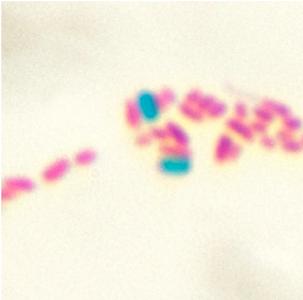
P2.7



P2.18

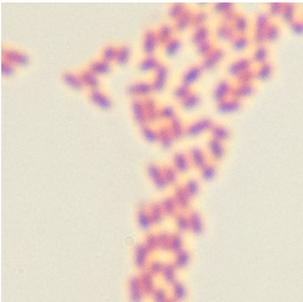


P2.19

**Anexo 11: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Invernadero 1 “Ponte-Tresa”**

GRUPO MORFOLOGICO A

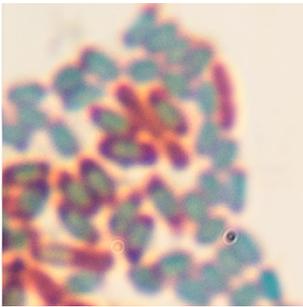
I1.23



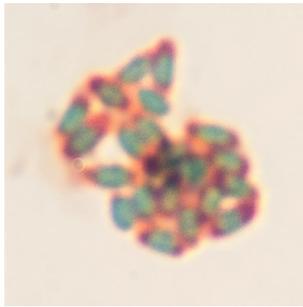
*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO B

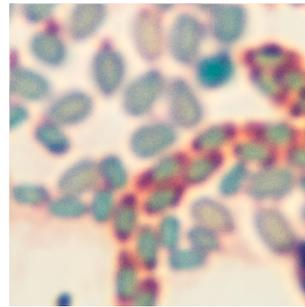
I1.1



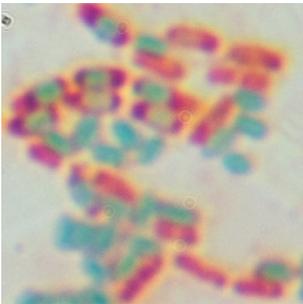
I1.4



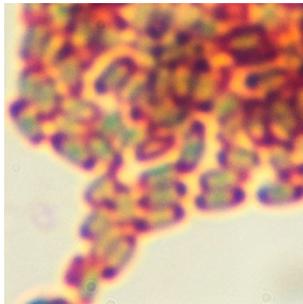
I1.6



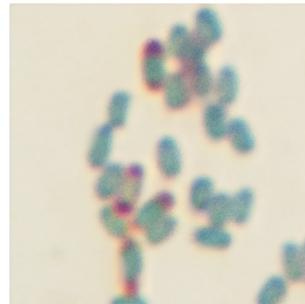
I1.7



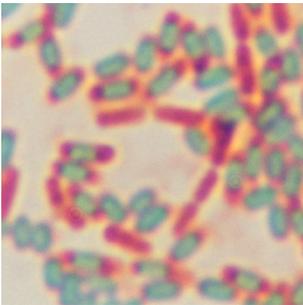
I1.8



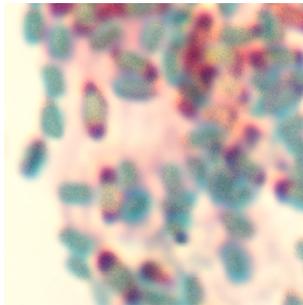
I1.9



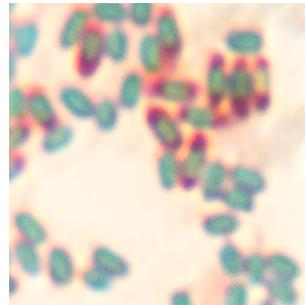
I1.10



I1.11

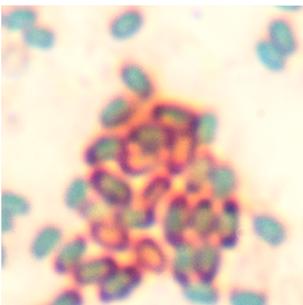


I1.12

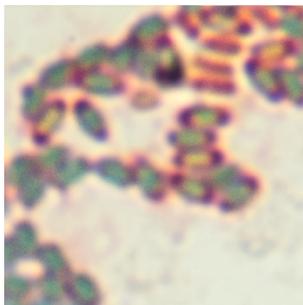


*Bioensayo

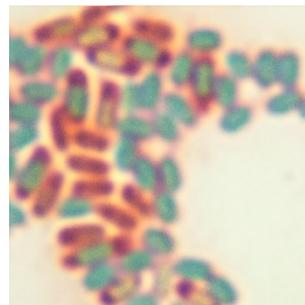
I1.13



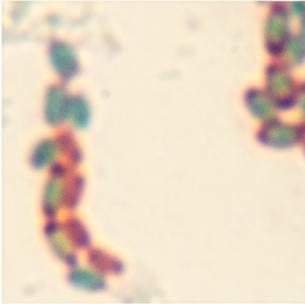
I1.15



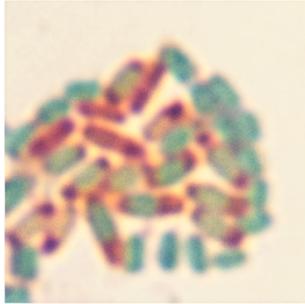
i1.16



I1.17

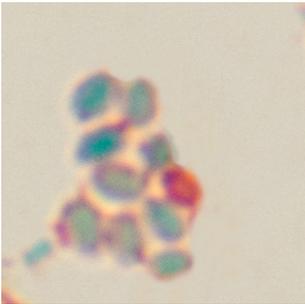


I1.18

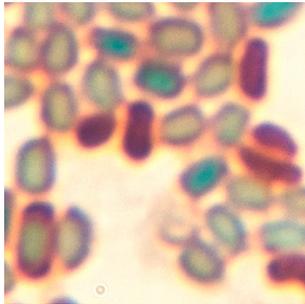


GRUPO MORFOLOGICO J

I1.2



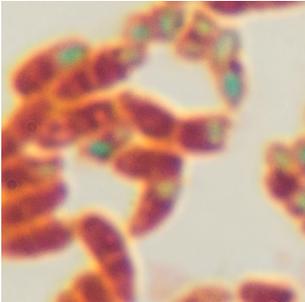
I1.3



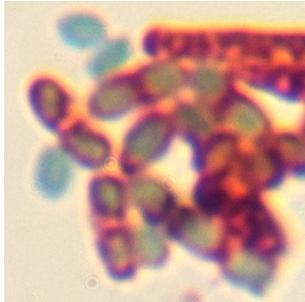
*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO K

I1.5



I1.14

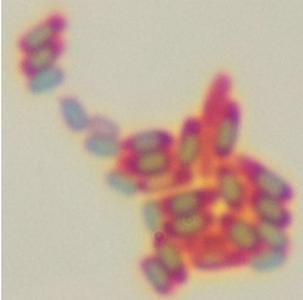


*Bioensayo

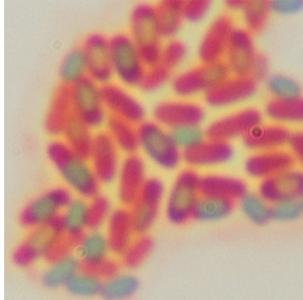
Anexo 12: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Invernadero 2 “Machachi” (200x)

GRUPO MORFOLOGICO B

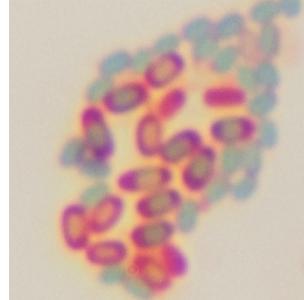
I2.1



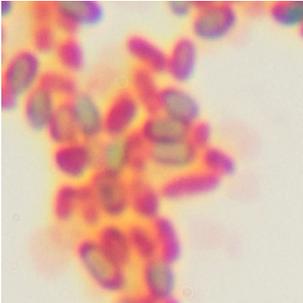
I2.3



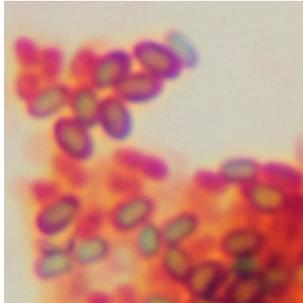
I2.4



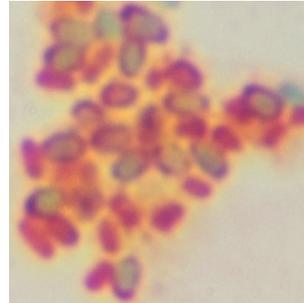
I2.5



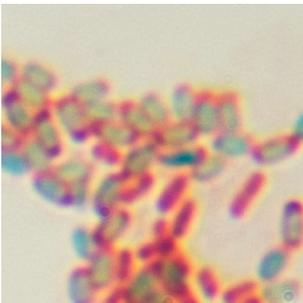
I2.7



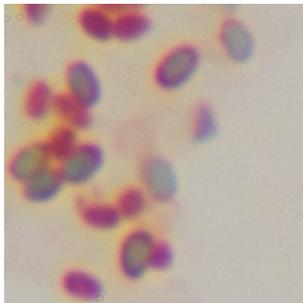
I2.8



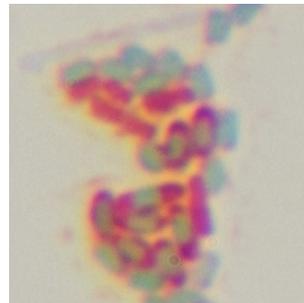
I2.9



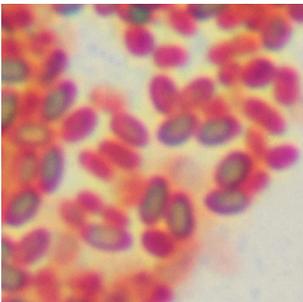
I2.10



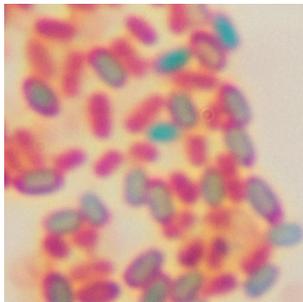
I2.12



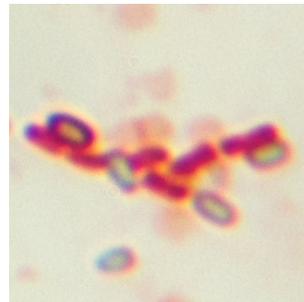
I2.13



I2.14

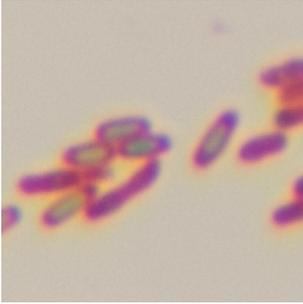


I2.15

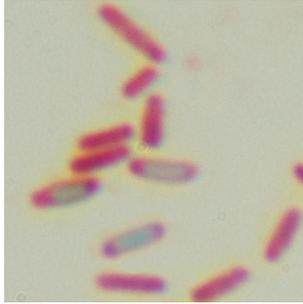


GRUPO MORFOLOGICO C

I2.6

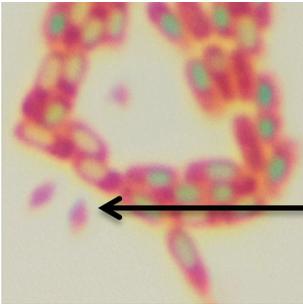


I2.11



GRUPO MORFOLOGICO E

I2.2

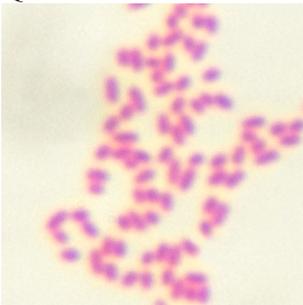


Cristales
bipiramidales

**Anexo 13: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Cultivo 1
“Mora” (200x)**

GRUPO MORFOLOGICO A

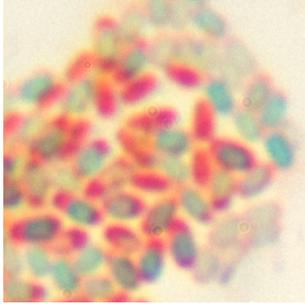
Q1.2



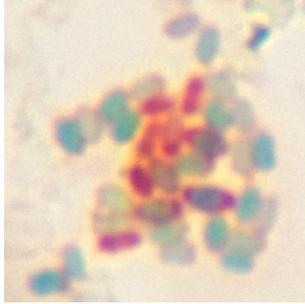
* Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO B

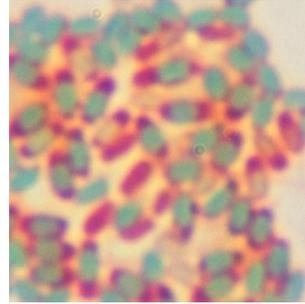
Q1.1



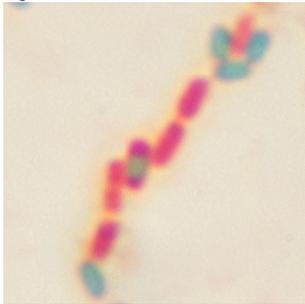
Q1.3



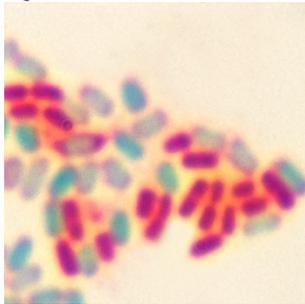
Q1.9



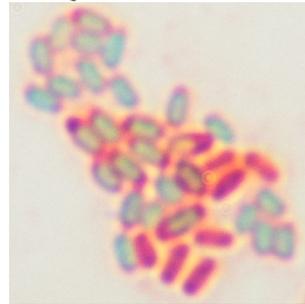
Q1.10



Q1.11

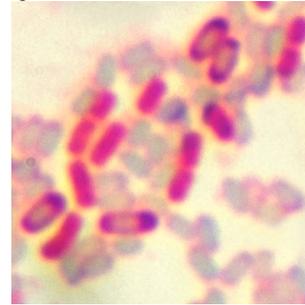


Q1.12

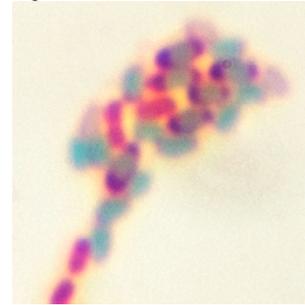


*Bioensayo

Q1.15

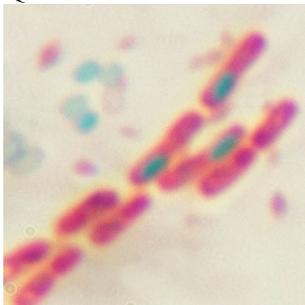


Q1.16

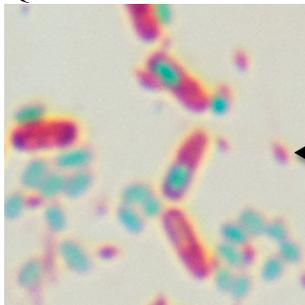


GRUPO MORFOLOGICO E

Q1.4



Q1.5

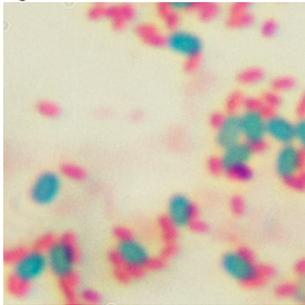


← Cristales bipiramidales

*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO I

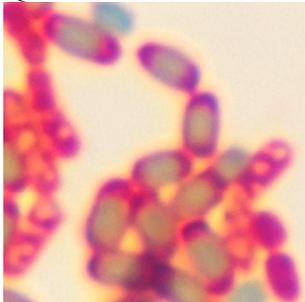
Q1.13



*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO K

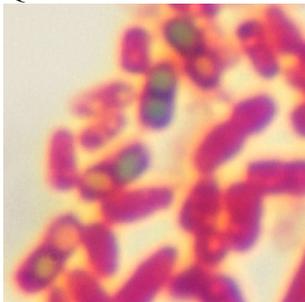
Q1.14



*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO L

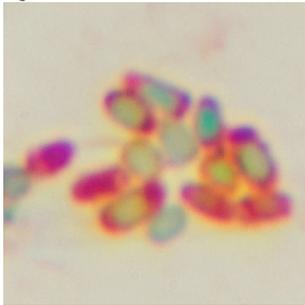
Q1.7



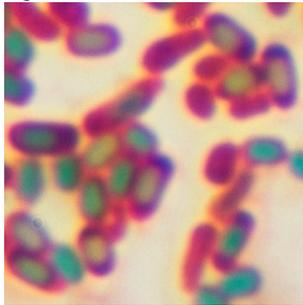
*Bioensayo

GRUPO MORFOLOGICO M

Q1.6



Q1.8

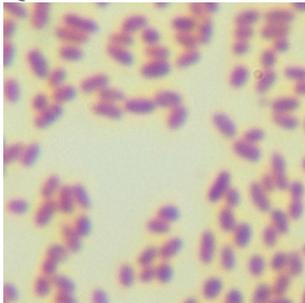


*Bioensayo

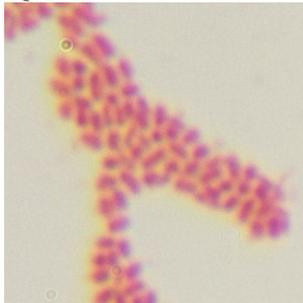
**Anexo 14: Fotografías de todos los aislados bacterianos de la muestra Cultivo 2
“Naranja” (200x)**

GRUPO MORFOLOGICO A

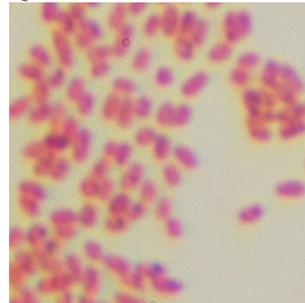
Q2.8



Q2.16

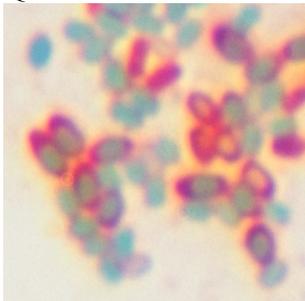


Q2.18

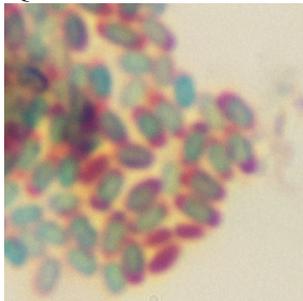


GRUPO MORFOLOGICO B

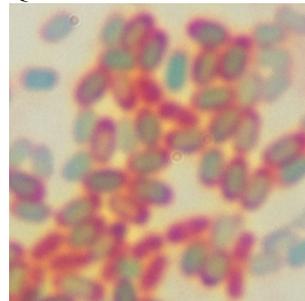
Q2.1



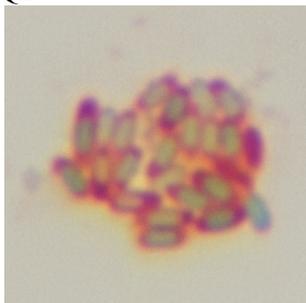
Q2.2



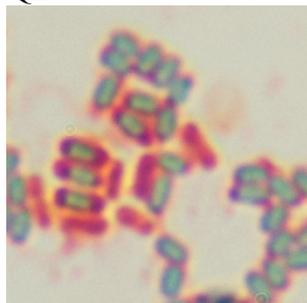
Q2.3



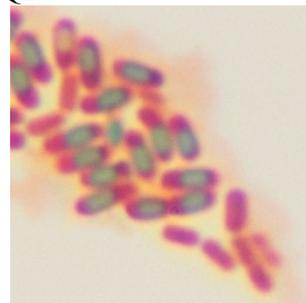
Q2.5



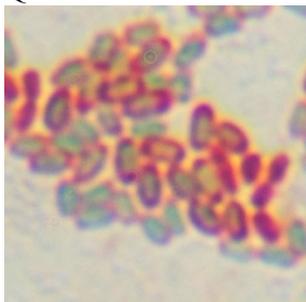
Q2.7



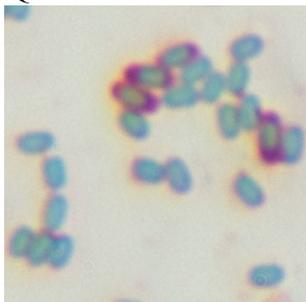
Q2.9



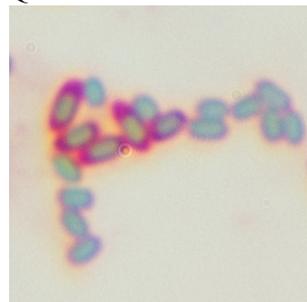
Q2.11



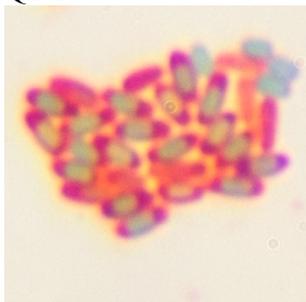
Q2.13



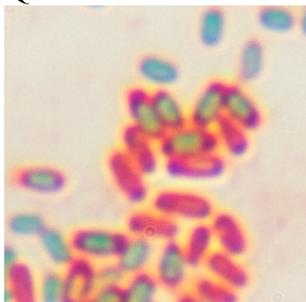
Q2.14



Q2.15



Q2.17



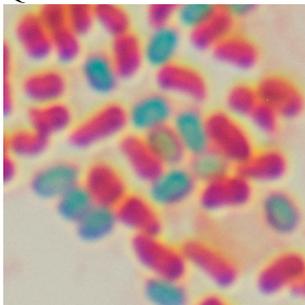
GRUPO MORFOLOGICO M

Q2.12

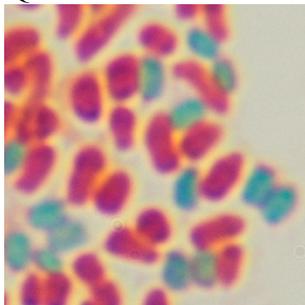


GRUPO MORFOLOGICO N

Q2.4



Q2.6



GRUPO MORFOLOGICO O

Q2.10



Anexo 15: ADEVAs evaluación de efecto acaricida de la bacteria control BtC en medio Lb y BtC en medio T3, a las 72, 120 y 168 horas

ADEVA de un factor					
Individuos muertos 72 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	19,500	2	9,750	6,882	0,015
Intra-grupos	12,750	9	1,417		
Total	32,250	11			

ADEVA de un factor					
Individuos muertos 120 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38,000	2	19,000	2,303	0,156
Intra-grupos	74,250	9	8,250		
Total	112,250	11			

ADEVA de un factor					
Individuos muertos 168 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	87,167	2	43,583	12,354	0,003
Intra-grupos	31,750	9	3,528		
Total	118,917	11			

Anexo 16: ADEVA's evaluación de efecto acaricida de los cultivos bacterianos a las 120 y 168 horas

ADEVA de un factor					
Individuos muertos 120 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1086,400	23	47,235	9,209	0,000
Intra-grupos	492,400	96	5,129		
Total	1578,800	119			

ADEVA de un factor					
Individuos muertos 168 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	921,167	23	40,051	7,510	0,000
Intra-grupos	512,000	96	5,333		
Total	1433,167	119			

Anexo 17: ADEVA's evaluación del efecto en la oviposición a las 120 y 168 horas

ADEVA de un factor					
infestación huevos 120 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	125,567	23	5,459	5,001	0,000
Intra-grupos	104,800	96	1,092		
Total	230,367	119			

ADEVA de un factor					
infestación huevos 168 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	182,367	23	7,929	9,105	0,000
Intra-grupos	83,600	96	,871		
Total	265,967	119			

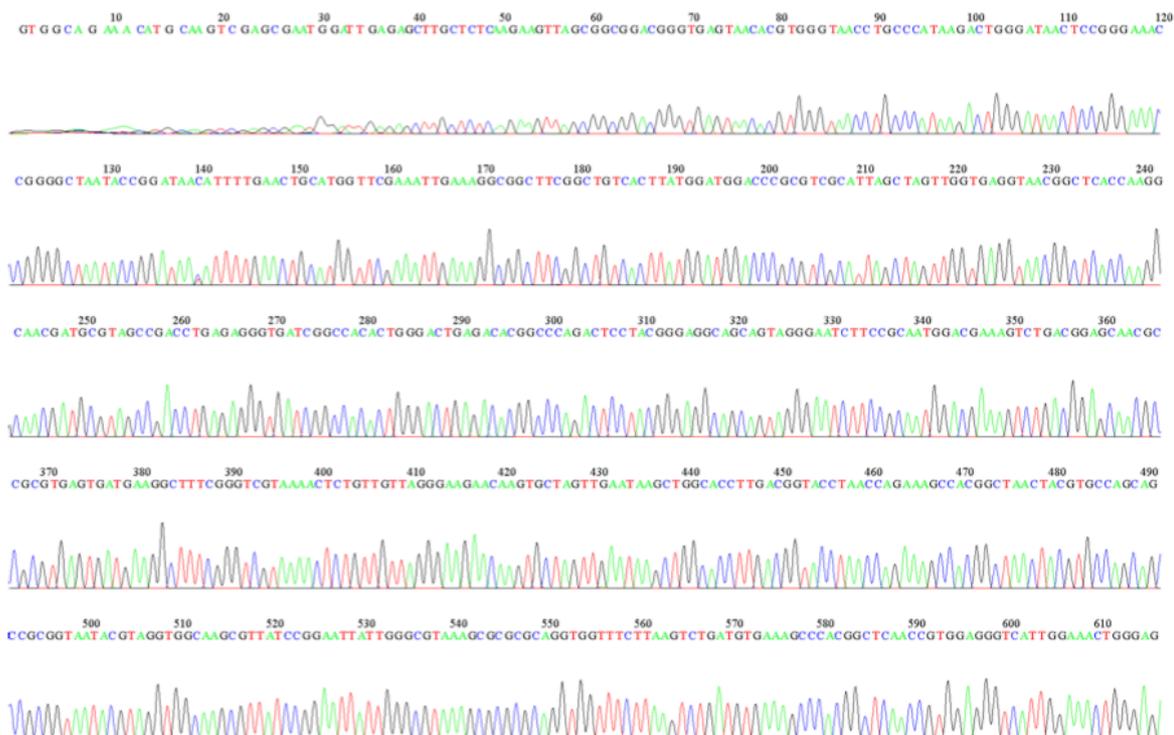
Anexo 18: ADEVAs evaluación del efecto sobre las larvas y ninfas de los cultivos bacterianos a las 120 y 168 horas

ADEVA de un factor					
infestación Ninfas 120 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	99,192	23	4,313	5,419	0,000
Intra-grupos	76,400	96	0,796		
Total	175,592	119			

ADEVA de un factor					
infestación Ninfas 168 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	177,792	23	7,730	11,452	0,000
Intra-grupos	64,800	96	0,675		
Total	242,592	119			

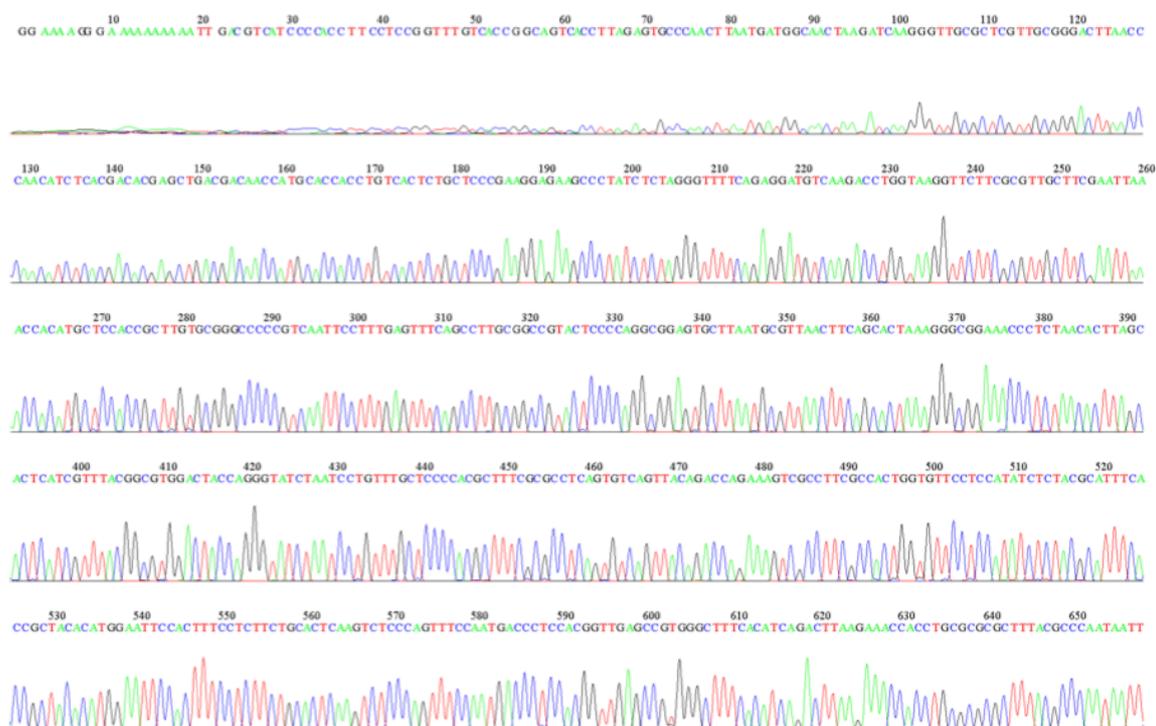
Anexo 19: Cromatograma en delantero de la bacteria control BtC

File: BTB-A_16SF.ab1 Run Ended: 2015/3/25 8:58:58 Signal G:4086 A:6018 C:6697 T:5479
 Sample: BTB-A_16SF Lane: 7 Base spacing: 15.026907 1202 bases in 14566 scans Page 1 of 2



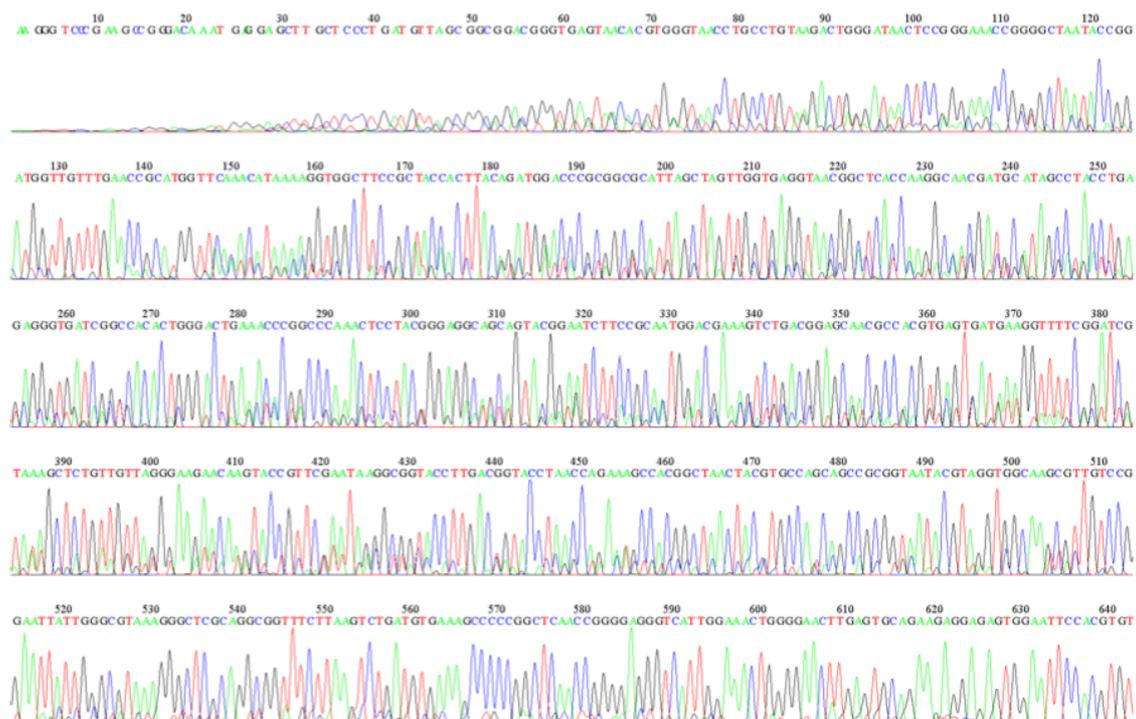
Anexo 20: Cromatograma en reversa de la bacteria control BtC

File: BTB-A_16SR.ab1 Run Ended: 2015/3/25 8:58:58 Signal G:426 A:488 C:689 T:517
 Sample: BTB-A_16SR Lane: 9 Base spacing: 15.0084305 1124 bases in 12780 scans Page 1 of 2



Anexo 21: Cromatograma en delantero del aislado P1.14(B)

File: P1-14-A_16SF.ab1 Run Ended: 2015/3/25 7:0:43 Signal G:809 A:1379 C:1589 T:1318
 Sample: P1-14-A_16SF Lane: 84 Base spacing: 15.276845 1085 bases in 12663 scans Page 1 of 2



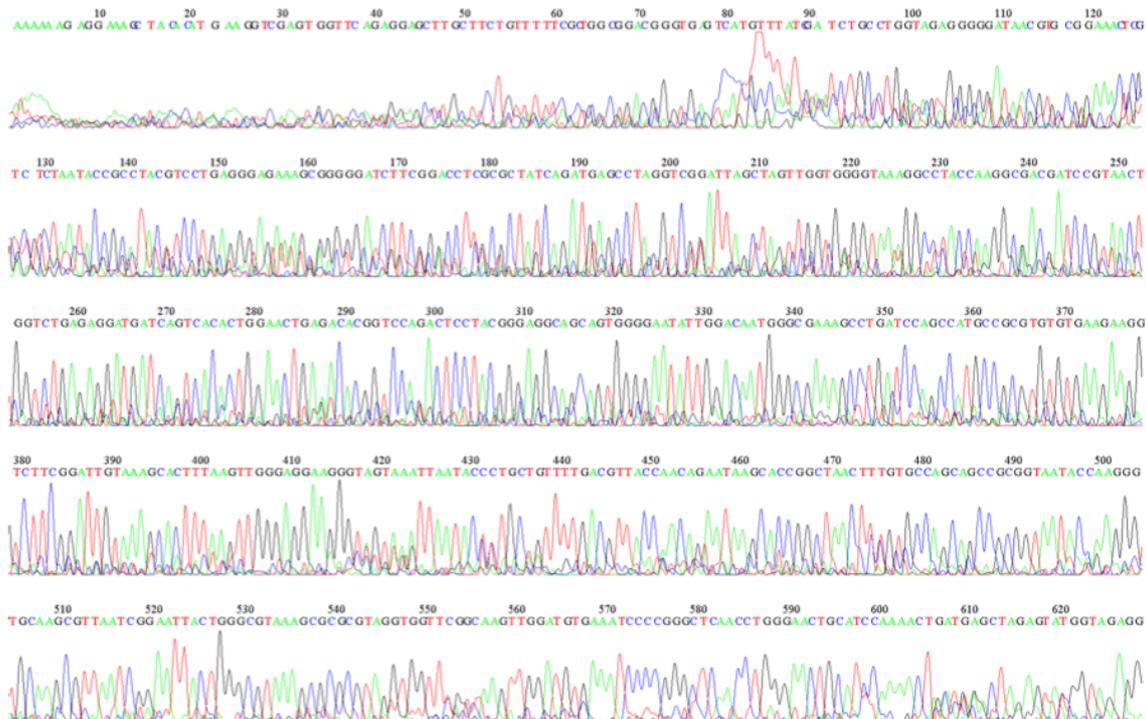
Anexo 22: Cromatograma en reversa del aislado P1.14(B)

File: P1-14-A_16SR.ab1 Run Ended: 2015/3/25 7:0:43 Signal G:1110 A:1016 C:1509 T:1097
 Sample: P1-14-A_16SR Lane: 86 Base spacing: 15.4216 1250 bases in 14700 scans Page 1 of 2



Anexo 23: Cromatograma en delantero del aislado I1.5(K)

File: I1-5-B_16SF.ab1 Run Ended: 2015/3/25 8:58:58 Signal G:89 A:90 C:89 T:77
 Sample: I1-5-B_16SF Lane: 12 Base spacing: 14.87705 1431 bases in 16300 scans Page 1 of 2



Anexo 24: Cromatograma en reversa del aislado I1.5(K)

File: I1-5-B_16SR.ab1 Run Ended: 2015/3/25 8:58:58 Signal G:41 A:49 C:60 T:57
Sample: I1-5-B_16SR Lane: 14 Base spacing: 15.06518 195 bases in 16301 scans Page 1 of 2

