

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación de la producción de toxinas y efecto acaricida
de cuatro cepas de *Bacillus* sometidas a tratamientos de
estrés térmico.**

Proyecto de Investigación

Camila Alejandra Arboleda Paredes

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 18 de julio de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación de la producción de toxinas y efecto acaricida de cuatro cepas de *Bacillus* sometidas a tratamientos de estrés térmico.

Camila Alejandra Arboleda Paredes

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

Antonio León, PhD

Firma del profesor:

Quito, 18 de julio de 2019

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Camila Alejandra Arboleda Paredes

Código:

00125369

Cédula de Identidad:

1723159263

Lugar y fecha:

Quito, 18 de julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, les agradezco a mis padres por todo el apoyo que me brindaron durante la carrera, por todo el esfuerzo que significaron estos 5 años y por siempre creer en mí; por haberme enseñado a tener metas claras y a esforzarme por ser siempre mejor.

A Antonio León, por haberme confiado este trabajo y por darme una grandiosa oportunidad de aprender, también por ser un excelente tutor de tesis, quien estuvo a mi lado para resolver cualquier duda durante la investigación.

A Darío Ramírez, por haber sido una guía durante este proyecto y estar conmigo en cada paso del mismo, además de por toda la paciencia y el cariño que me brindó.

Finalmente, quiero agradecerles a mis amigos, y ahora colegas, Sol Llerena y Camilo Ramírez, por crear un ambiente de trabajo lleno de risas y momentos inolvidables, por todos los momentos compartidos durante la carrera y durante el tiempo que tomaron nuestras investigaciones. Siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón.

RESUMEN

T. urticae o araña roja, es un ácaro plaga que ataca a un amplio rango de cultivos a nivel mundial, causando grandes pérdidas en el sector agrícola. El control de esta plaga es complicado puesto que es uno de los artrópodos que presenta mayor resistencia a los pesticidas químicos; por lo tanto, se buscan alternativas para su control que, además sean amigables con el medio ambiente. El uso de *B. thuringiensis* como control biológico se ha popularizado en los últimos años por su gran efectividad contra lepidópteros y otras especies plaga. Es una bacteria que produce endosporas cuando se encuentra en condiciones de estrés, y simultáneamente, produce cristales proteicos (proteínas Cry) con actividad insecticida. *B. thuringiensis* presenta una gran variabilidad en cuanto a las toxinas que produce, por lo que no todas las cepas producen las mismas proteínas Cry y por lo tanto, atacan a diferentes plagas. Se ha reportado toxicidad de *B. thuringiensis* a los ácaros *T. urticae*, por lo que es importante estudiar cepas que puedan tener un efecto acaricida, así como evaluar los tratamientos de estrés que promuevan una mayor producción de toxinas.

En el presente estudio se evaluaron cuatro cepas que presentaron toxicidad para *T. urticae* en un estudio previo realizado por Narváez, 2015 (B, C, P e I). Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas, y como resultado, las cepas B y C presentaron el perfil esperado para *B. thuringiensis*, mientras que la cepa P presentó un resultado contrario al esperado en la prueba de urea y la cepa I mostró resultados diferentes a *B. thuringiensis* en la prueba de urea y citrato. Posteriormente se evaluó el efecto acaricida de las cuatro cepas en bioensayos, solo B y C tuvieron un efecto acaricida en los bioensayos preliminares, por lo que las cepas P e I fueron descartadas de posteriores ensayos.

Adicionalmente, se cuantificó la producción de endosporas y de células vegetativas de las dos cepas a diferentes tiempos de crecimiento e incubación en frío; siendo los tratamientos B36-0, B36-4, B72-0, B72-4, C36-0, C36-4, C72-0, C72-4 (36-72 horas de crecimiento, 0-4 días de incubación en frío) los que mostraron diferencias significativas en el número de endosporas producidas, por lo que fueron seleccionados para la realización de bioensayos. Los tratamientos B36-4, B72-0, B72-4, C36-4, C72-0, C72-4, presentaron una alta actividad acaricida en los bioensayos (70-85% de mortalidad), siendo valores estadísticamente iguales a la mortalidad observada con el control positivo. Los tratamientos B36-0 y C36-0, tuvieron un porcentaje de mortalidad mucho menor (30%). Los resultados indican que la producción de toxinas con efecto acaricida, dependen de la producción de endosporas y no tienen que ver con el tipo de tratamiento de estrés que provoca la esporulación. Finalmente, la microscopía de barrido electrónico permitió observar cristales y endosporas aunque no fue posible la obtención de imágenes nítidas debido a limitaciones de los materiales que se tenían disponibles.

Palabras clave: *Tetranychus urticae*, ácaros, *Bacillus thuringiensis*, Toxinas Cry, endosporas, estrés térmico, efecto acaricida.

ABSTRACT

T. urticae, or two spotted mite, is a plague that attacks a wide range of crops worldwide, causing large losses in the agricultural sector. The control of this pest is complicated since it is one of the arthropods that presents the greatest resistance to chemical pesticides; therefore, it is important to search for alternatives to their control that are effective and also friendly to the environment. The use of *B. thuringiensis* as a biological control has become popular in recent years, due to its effectiveness to Lepidoptera order and other pests. It is a bacterium that produces endospores when it is under stress conditions, and simultaneously, produces protein crystals (Cry proteins) with insecticidal activity. *B. thuringiensis* has a great variability in terms of the toxins that produces, so, not all strains produce the same Cry proteins and in consequence, they are effective to different pests. Toxicity of *B. thuringiensis* to *T. urticae* has been reported, so it is important to study strains that may have a miticidal effect, as well as evaluate stress treatments that promote greater production of toxins.

In the present study, four strains that presented toxicity for *T. urticae* in a previous study made by Narváez, 2015 were evaluated (B, C, P and I); the strains were characterized by biochemical tests, and as a result, strains B and C presented the expected profile for *B. thuringiensis*, while strain P did not present the expected result in the urea test; also, strain I showed different results to *B. thuringiensis* in the urea and citrate tests. Subsequently, the acaricidal effect of the four strains was evaluated in bioassays, only B and C had an acaricidal effect in the preliminary bioassays, and in consequence, strains P and I were discarded from further trials. In addition, the production of endospores and vegetative cells of the two strains was quantified at different growth and cold incubation times; being treatments B36-0, B36-4, B72-0, B72-4, C36-0, C36-4, C72-0, C72-4 (36- 72h of growth, 0-4d of 4°C incubation), the ones that showed significant differences in the number of endospores produced, so they were selected for the bioassays.

The treatments B36-4, B72-0, B72-4, C36-4, C72-0, C72-4, showed a high acaricidal activity in the bioassays (70-85% mortality), being values statistically equal to mortality observed with the positive control. Treatments B36-0 and C36-0 had a much lower mortality rate (30%). The results indicate that the production of toxins with acaricidal effect, depend on the production of endospores and have nothing to do with the type of stress treatment that causes sporulation. Finally, the electronic scanning microscopy allowed the observation of crystals and endospores, although it was not possible to obtain clear images due to limitations of the materials that were available.

Key words: *Tetranychus urticae*, mites, *Bacillus thuringiensis*, Cry toxins, endospores, low temperatures stress, acaricidal effect.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	12
1.1 EL ÁCARO TETRANICHUS URTICAE	12
1.2 CONTROL QUÍMICO	14
1.3 CONTROL BIOLÓGICO	16
1.4 BACTERIAS DEL GÉNERO BACILLUS	17
1.5 BACILLUS THURINGIENSIS.....	18
1.6 TOXINAS CRY	18
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS.....	23
ÁREA DE ESTUDIO	24
MATERIALES.....	25
5.1 REPRODUCCIÓN DE TETRANICHUS URTICAE	25
5.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS	25
5.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	25
5.4 PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOENSAYOS PREMINARES.....	26
5.5 BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	26
5.6 CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	27
5.7 ENSAYOS DE TIEMPO DE CRECIMIENTO E INCUBACIÓN EN FRÍO.....	27
5.8 PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOENSAYOS	28
5.9 BIOENSAYOS.....	29
5.10 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	29
5.12 ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
MÉTODOS	31
6.1 REPRODUCCIÓN DE TETRANICHUS URTICAE	31
6.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS	31
6.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	31
6.4 PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	32
6.5 BIOENSAYOS PRELIMINARES	32
6.6 CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	33
6.7 ENSAYOS DE TIEMPO DE CRECIMIENTO E INCUBACIÓN EN FRÍO.....	34
6.7.1 Crecimiento de cepas a diferentes tiempos de crecimiento e incubación en frío	34
6.7.2 Microscopía y conteos de endosporas y células vegetativas.....	34
6.8 PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOENSAYOS	35
6.9 BIOENSAYOS.....	36
6.10 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	36
6.12 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
RESULTADOS.....	37
7.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS	37
7.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	38
7.3 BIOENSAYOS PRELIMINARES	38
7.4 CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	40
7.5 ENSAYOS DE TIEMPO DE CRECIMIENTO E INCUBACIÓN EN FRÍO.....	42
7.6 PRUEBAS DE EFICACIA ACARICIDA O BIOENSAYOS.....	45
7.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	47
DISCUSIÓN.....	49
8.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS DE BACILLUS CON POTENCIAL ACARICIDA.....	49
8.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS	50
8.3 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD ACARICIDA	50
8.4 CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO DE CEPAS DE BACILLUS.....	51
8.5 ENSAYOS DE TIEMPO DE CRECIMIENTO E INCUBACIÓN EN FRÍO	52

8.6 PRUEBAS DE ACTIVIDAD ACARICIDA CON TRATAMIENTOS TÉRMICOS (BIOENSAYOS)	54
8.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	57
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos Bioensayos preliminares	32
Tabla 2. Tratamientos Bioensayos	35
Tabla 3. Pruebas bioquímicas para las cepas B, C, P e I.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de una hembra adulta de <i>T. urticae</i>	13
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. urticae</i>	14
Figura 3. Hojas para bioensayo.....	33
Figura 4. Microscopía reactivación de cepas.....	37
Figura 5. Bioensayos preliminares.....	39
Figura 6. Curvas de crecimiento microbiano para las cepas B y C.....	40
Figura 7. Microscopía de las tinciones de verde de malaquita de las cepas B y C a las 5, 36 y 72h de crecimiento.....	41
Figura 8. Figura 8. Microscopía tinciones verde de malaquita de las cepas B y C para los ensayos de tiempo de crecimiento e incubación en frío.....	42
Figura 9. Conteos de endosporas y células vegetativas 5, 36 y 72 h de crecimiento y 0, 4 y 8 días de incubación en frío.....	43
Figura 10. Conteos de endosporas y células vegetativas 36 y 72 h de crecimiento y 0, 1, 2, 3, 4 y 8 días de incubación en frío.....	44
Figura 11. Porcentaje de mortalidad de ácaros para cada tratamiento de tiempo de crecimiento e incubación en frío.....	46
Figura 12. Individuos de <i>T. urticae</i> a los 5 días de la aplicación de tratamientos.....	47
Figura 13. Microscopia electrónica de barrido para a muestra B72-4.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

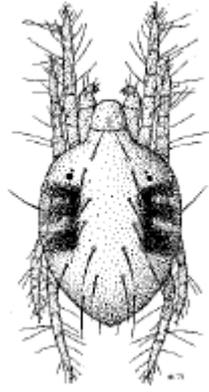
Anexo 1. Receta medio T3 líquido	66
Anexo 2. Receta medio T3 sólido.....	66
Anexo 3. Datos Bioensayos preliminares	66
Anexo 4. Curva de Crecimiento Microbiano 0-8h.....	67
Anexo 5. Datos absorbancia Curva de Crecimiento Microbiano	67
Anexo 6. Datos ensayos tiempo de crecimiento e incubación en frío	68
Anexo 7. Datos Bioensayos Finales.....	69
Anexo 8. Conteos de endosporas y células vegetativas comprobatorios bioensayos finales .	71

INTRODUCCIÓN

1.1 El ácaro *Tetranychus urticae*

Los ácaros *T. urticae*, conocidos comúnmente como ácaros rojos, son artrópodos pertenecientes a la familia Tetranychidae, considerados una importante plaga agrícola debido a que atacan a un amplio rango de cultivos, tales como el algodón, la frutilla, el tomate, el pepino, las rosas, entre otros (Bayer AG, 2019). Esta plaga se alimenta del contenido de las células vegetales; los primeros daños generalmente se presentan en las hojas, observándose puntos de color amarillo cuando existen densidades bajas de ácaros. A medida que la población aumenta, la totalidad de las hojas se tornan amarillas, de modo que las estomas se ven afectadas y por lo tanto, la respiración restringida. Además, la capacidad fotosintética de la planta se ve reducida. Posteriormente, ocurre la defoliación de la planta y en casos de infección severa, la muerte de la misma (Bayer AG, 2019).

Su morfología varía entre machos y hembras, siendo estas últimas de forma ovalada con una longitud de aproximadamente 0.5mm; mientras que los machos presentan una forma más delgada y puntiaguda con una longitud de alrededor de 0.3mm. Ambos presentan 4 pares de patas (Zhang, 2003). Una de las características más representativas de esta plaga son las manchas negras en los laterales del cuerpo; sin embargo, su coloración puede ir desde un verde o amarillo claro, hasta verde oscuro o marrón. En el caso de las hembras, se puede presentar un color naranja rojizo en épocas de invierno (Parella & Van Lenteren, 1999).

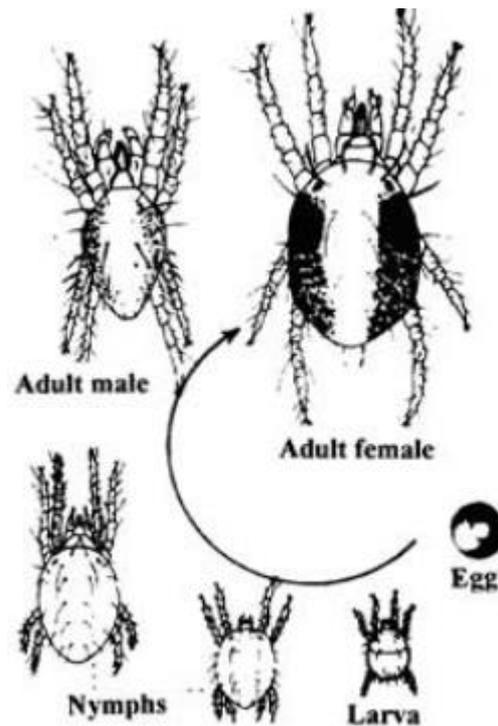


Fuente: (Zhang, 2003)

Figura 1. Ilustración de una hembra adulta de T. urticae

El ciclo de vida de este artrópodo consta de 4 estadios; los huevos son esféricos, transparentes, lisos y brillantes y miden alrededor de 0.12mm. En el estadio de larva, los individuos poseen tres pares de patas y un tamaño de 0.15mm aproximadamente; en un inicio son transparentes, pero van adoptando un color verde o amarillo según su alimentación. Además, en este estadio se comienzan a apreciar las manchas laterales en el cuerpo de las larvas (Bayer AG, 2019). Posteriormente, se desarrollan las ninfas, las cuales pueden ser de dos tipos: protoninfa y deutoninfa siendo esta última la que dará origen a las hembras, por lo que tiene un mayor tamaño y una forma más ovalada. En ambos casos se observan las manchas de los laterales más marcadas y aparece el cuarto y último par de patas. El último estadio es el de adultos, en el que se observan ácaros de mayor tamaño en los que se diferencian claramente los individuos macho y hembra (Van Leewen, Vontas, Tsagkarakou, & Tirry, 2010)

El tiempo que toma el desarrollo de un huevo hasta convertirse en adulto depende de la temperatura a la que el mismo se desarrolle; siendo a mayor temperatura, menor el tiempo de desarrollo. A pesar de que los ácaros pueden crecer en un rango de temperaturas de 12-40°C, su rango óptimo es de 30 a 32°C, condiciones en las cuales, el desarrollo de los 4 estadios toma apenas una semana (Zhang, 2003).



Fuente: (Victoria State Government, 2019)

Figura 2. Ciclo de vida de T. urticae

1.2 Control Químico

El control químico de plagas es la reducción o eliminación de poblaciones de organismos plaga con ayuda de sustancias químicas, las cuales se conocen como plaguicidas o pesticidas (Flint & Gouveia, 2001). Dichas sustancias no comprenden compuestos que repelen o impiden la alimentación o reproducción de los insectos, sino aquellos que causan la muerte de los mismos (Ware & Whitacre, 2004).

Los plaguicidas presentan algunos beneficios para los productores agrícolas, tales como ser productos de fácil uso, económicos y que usualmente presentan una rápida solución al problema de las plagas, razones por las cuales los agricultores siguen haciendo uso de los mismos. No obstante, la falta de conocimiento acerca del uso de estas sustancias y la preocupación por combatir las plagas agrícolas, ha hecho que los agricultores incrementen dosis o apliquen mezclas de productos de forma innecesaria, teniendo como resultado un uso

indiscriminado de los insecticidas; situación que ha desencadenado varios problemas (Sadof, O'Neil, Heraux, & Wiedenmann, 2004)

Uno de los principales problemas que presenta la aplicación de pesticidas es la contaminación ambiental, puesto que estos compuestos tienen la capacidad de filtrarse en el suelo y llegar a aguas subterráneas, lo cual permite que se esparzan por el ambiente y por lo tanto, tengan contacto con animales, plantas e incluso el ser humano. Una de las características más preocupantes de los plaguicidas es la capacidad que presentan de bioacumularse; o que significa que pueden almacenarse en los tejidos de los animales que tienen contacto con los mismos (Ware & Whitacre, 2004). Además, algunos de estos químicos también tienen la capacidad de biomagnificarse; es decir, aumentan su concentración a medida que incrementan los niveles de la cadena trófica (Thieme, Heimbach, & Müller, 2010)

Otro de los grandes problemas de los pesticidas, son los daños que causan a la salud humana; pudiendo presentarse problemas de intoxicación no solamente en los consumidores de los cultivos que se tratan con químicos, sino también en los trabajadores que están involucrados tanto en la aplicación de los productos químicos, como en la elaboración de los mismos. (Flint & Gouveia, 2001). Las intoxicaciones agudas pueden tener efectos inmediatos cuando se está expuesto a altas concentraciones de insecticidas, o también efectos crónicos que se dan como resultado de la exposición a dosis bajas de pesticidas por un tiempo prolongado (Van Driesche & Bellows, 1996).

Por otro lado, el uso de pesticidas de forma indiscriminada ha provocado la aparición de insectos plaga resistentes. Durante las primeras aplicaciones de los productos químicos, los insectos objetivo muestran una alta susceptibilidad, por lo cual, solo se necesitan dosis bajas de plaguicidas para la obtención de altas tasas de mortalidad. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo y que aumenta el número de aplicaciones, se necesitan de mayores dosis de insecticidas para obtener los resultados deseados, y eventualmente, estos dejan de ser efectivos

por completo, por lo que es necesario reemplazar el producto por otro (Coppel & Mertins, 1977). Los casos de resistencia a pesticidas no son un problema de hace pocos años; siendo así que, en 1989, la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) reportó 504 casos de insectos resistentes en los que se incluían poblaciones de lepidópteros, coleópteros, dípteros y ácaros (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009). Los ácaros son una de las plagas en las que se han observado más casos de resistencias; es así que en el estudio realizado por Van Leewen y otros en 2010; *T. urticae* se posicionó como el artrópodo más resistente a los pesticidas, basándose en el número de ingredientes activos a los que se había reportado resistencia.

Por último, los insecticidas no solamente causan daño a los insectos plaga, sino que también afectan a otros insectos que pueden ser beneficiosos para mantener un equilibrio en la naturaleza ya que pueden ser competidores naturales de las plagas o en el mejor de los casos, depredadores de las mismas, por lo que ayudan a controlar en cierto nivel a los insectos problema (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009). Por consiguiente, al reducir la cantidad de insectos benéficos, es común observar el incremento de las poblaciones de insectos plaga, lo cual hace aún más complicado su control (Coppel & Mertins, 1977).

1.3 Control Biológico

Debido a los múltiples problemas que presenta el control químico, surge el control biológico de plagas como una solución a los mismos. Este tipo de control se basa en la utilización de organismos vivos, o compuestos aislados de los mismos, para la eliminación de insectos plaga. (Van Driesche & Bellows, 1996). El control biológico puede ser realizado con la utilización de enemigos naturales de las plagas como, por ejemplo, insectos depredadores; así como mediante la aplicación de compuestos obtenidos a partir de plantas o microorganismos, tales como bacterias u hongos. A este último grupo se los conoce como biopesticidas (Centinkaya, 2002). Son muchas las ventajas del control de plagas por medio de biopesticidas; una de ellas es la inocuidad hacia el ser humano y hacia otros insectos que no

son los objetivo; esto debido a su alta selectividad (Torres & Fernandez, 2015). Asimismo, la utilización de biopesticidas es una alternativa amigable con el medio ambiente ya que no produce contaminación y los casos de resistencias de insectos plaga a los biopesticidas se presentan con una frecuencia mucho menor que los casos observados con el uso de químicos pesticidas (Coppel & Mertins, 1977). De este modo, el control biológico es una alternativa que permite si bien no siempre eliminar por completo el uso de plaguicidas; si es posible realizar un manejo integrado de plagas en el que se trabaje con biopesticidas y pesticidas químicos en conjunto; disminuyendo así, la cantidad de pesticidas utilizados (Flint & Gouveia, 2001).

1.4 Bacterias del género *Bacillus*

Puesto que alrededor del 30% de los biopesticidas son realizados a base de bacterias; estas juegan un papel sumamente importante dentro del control biológico (Centinkaya, 2002). El modo de infección de estas bacterias es comúnmente por vía digestiva; y las bacterias utilizadas pueden ser de dos grandes grupos: no esporulantes y esporulantes. Las primeras comprenden familias como Pseudomonaceae, Streptococcaceae y Enterobacteriaceae y suelen utilizarse con menor frecuencia como biopesticidas (Cranshaw, 2009). Por otra parte, las bacterias esporulantes son las pertenecientes a la familia Bacillaceae, al tener la capacidad de formar endosporas, estas bacterias son altamente persistentes en el medio ambiente y por lo tanto tienen una alta virulencia. Dentro de las bacterias del género *Bacillus* que más se utilizan para la elaboración de biopesticidas se encuentran: *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis*; siendo esta última la más empleada en el mercado de los biopesticidas, por lo que el 70% de los pesticidas biológicos que se encuentran a la venta son fabricados a partir de esta bacteria (Cranshaw, 2009).

1.5 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es un bacilo flagelado gram positivo y aerobio estricto. En la naturaleza, se encuentra en el suelo y se ha convertido en una bacteria de gran interés industrial debido a que produce cristales proteicos que presentan toxicidad para algunos insectos plaga. La bacteria fue descubierta en 1902 por el científico japonés Shigetane Ishiwatari; no obstante, no fue sino hasta 1911, que la bacteria fue aislada por primera vez, en esta investigación, el biólogo Ernst Berliner además la relacionó con una enfermedad que atacaba a la polilla gris de la harina (Cranshaw, 2009). Años más tarde, en 1976, Ribert Zakharyan notó un plásmido en la bacteria y sugirió que la presencia del mismo podría ser la razón de la esporulación, así como de la producción de toxinas en *B. thuringiensis*. Hoy en día se sabe que, en la mayoría de cepas de *B. thuringiensis*, los genes que codifican para las proteínas insecticidas (genes Cry), están localizados en plásmidos; y de hecho, es la presencia de diferentes plásmidos lo que distingue a una cepa de otra. (De Castro, Ausique, Nunes, Ibahnes, & Junior, 2001)

1.6 Toxinas Cry

Las proteínas Cry de *B. thuringiensis* se han usado como insecticidas desde los años 20; siendo así que en el presente incluso existen productos comerciales como Dipel (Valent BioSciences) y Thuricide (Bonide) que contienen los cristales Cry como el principio activo insecticida (Coppel & Mertins, 1977). Las toxinas Cry han mostrado ser efectivos para un gran número de plagas para la agricultura, tales como los lepidópteros, dípteros, coleópteros y ácaros (Cranshaw, 2009)

Los cristales Cry son proteínas formadoras de poro, las cuales son liberadas como prototoxinas, es decir, no presentan toxicidad. Para que estas adquieran propiedades insecticidas, deben ser procesadas por proteasas presentes en el intestino de los insectos susceptibles cuando se alimentan de las mismas. Una vez que las toxinas se encuentran activas

en el tracto digestivo, se unen a receptores ubicados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino, y posteriormente, se insertan en la membrana para formar el poro lítico. Esto causa un desequilibrio osmótico en el intestino, lo que conlleva a la parálisis del mismo, que trae como consecuencia el cese de la alimentación de los insectos y posteriormente, su muerte (Royalty, Hall, & Taylor, 1990) (Soberón & Bravo, 2007).

Las toxinas Cry, junto con las proteínas Cyt, forman parte de la inclusión parasporal producida por *B. thuringiensis*; sin embargo, la virulencia y patogenicidad de la bacteria es conferida por las proteínas Cry. Estas proteínas se constituyen por tres dominios. El dominio I presenta 7 α -hélices antiparalelas, siendo la hélice 5 el centro del dominio puesto que se encuentra rodeada por el resto de las hélices. El dominio II está formado por 3 láminas β antiparalelas que se ubican en una topología conocida como llave griega. Por último, el dominio III está constituido por 2 láminas β antiparalelas en forma de un β sándwich (Schnepf, y otros, 1998)

Se cree que el dominio I es el responsable de la formación del poro lítico, mientras que el dominio II, podría estar involucrado en el reconocimiento del receptor de las células epiteliales del intestino ya que tiene un gran parecido con las regiones de unión antígeno-anticuerpo en otras proteínas. (De Maagd, Bravo, & Crickmore, 2001). Por otro lado, el dominio III estaría encargado de proteger a la toxina del efecto de las proteasas y por ende, de mantener su estructura; además, se ha presentado evidencia de que este dominio ayuda al dominio II en el reconocimiento del receptor y al dominio I en la formación del poro lítico (Portela, Chaparro, & López, 2013).

Las especies del género *Bacillus* se caracterizan por la capacidad de producir endosporas cuando se encuentran bajo condiciones de estrés y a este proceso se le conoce como esporulación; durante el mismo, la célula vegetativa se divide en dos compartimentos: la preespora y la célula madre. En *B. thuringiensis*, los cristales Cry se acumulan en la célula

madre durante la esporulación (Soberón & Bravo, 2007). El proceso de esporulación consta de 7 fases, las mismas que son reguladas por diferentes genes. En la fase I se activan los genes que comienzan la esporulación, en la fase II, se forma un septo en la célula vegetativa que divide a la misma asimétricamente en la célula madre y la preespora. En la fase III se da a invaginación, en la cual la célula madre absorbe a la preespora. Posteriormente, se da la formación del cortex en la fase IV y la formación de la cubierta de la endospora en la fase V. Durante la fase VI se da la maduración de la endospora y en la fase VII la liberación de la misma (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2010).

La formación de las toxinas Cry comienza en la fase III de la esporulación por la activación de los genes Cry y el proceso continúa hasta el final de la esporulación. La síntesis de las toxinas Cry se da a partir de dos promotores, Bt1 y Bt2; el primero se activa en las fases III y IV y el segundo en las fases V y VI (Bechtel & Bulla, 1976).

1.7 Antecedentes

El presente trabajo es una continuación de la investigación realizada por Ana Narváez en 2015; en la cual se aislaron cepas de *Bacillus* nativas de suelos y compost de la provincia de Pichincha. En dicho trabajo, además de caracterizar morfológicamente los aislados, se realizaron bioensayos para determinar el efecto acaricida de 22 bacterias aisladas. Como resultado, se obtuvieron 3 cepas que mostraron el mayor efecto acaricida (C2.4, I.15 y P1.14) en base al número de individuos muertos luego de 120 horas. Adicionalmente, se utilizó a la bacteria BTC como control puesto que fue aislada de un producto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*. En esta investigación se utilizaron inicialmente las 4 cepas del estudio anterior para evaluar el efecto del estrés térmico a bajas temperaturas sobre la producción de toxinas con efecto acaricida. Sin embargo, luego de una evaluación preliminar se decidió trabajar solo con dos cepas que mostraron actividad (C2.4 y BTC)

JUSTIFICACIÓN

Tetranychus urticae es una plaga polífaga ya que ataca a un sinnúmero de cultivos, tales como el tomate, el pepino, la frutilla, las rosas, entre otras. De igual modo, es una plaga cosmopolita, se ha reportado la presencia de la misma en la mayoría de países de todos los continentes (Bolland, Gutierrez, & Flechtmann, 1998). Se alimenta del contenido de las células vegetales, causando así, decoloración de las hojas, defoliación y finalmente la muerte de las plantas que infesta (Bondada, Oosterhuis, Tugwell, & Kim, 1995).

Uno de los cultivos que se ve más afectado por esta plaga es el de rosas puesto que, incluso densidades bajas de ácaros, afectan la calidad de las mismas. La presencia de 10 a 50 ácaros por hoja reducen el tamaño del tallo de la flor entre un 17 y 26%; siendo la longitud del tallo una de las características más importantes para las rosas de exportación. Asimismo, los floricultores destinan alrededor de 4500 dólares por hectárea al año para el control químico de esta plaga (Centinkaya, 2002)

No obstante, la efectividad de estos pesticidas ha disminuido con el paso del tiempo debido al uso excesivo de los mismos. Según la base de datos de resistencia a pesticidas por parte de artrópodos; el ácaro *T. urticae*, ha presentado 517 casos de resistencia a diferentes tipos de plaguicidas a nivel mundial; una de las cifras más altas de todos los artrópodos (Mota-Sanchez & Wise, 2019)

Por esta razón, se han evaluado varias alternativas para el control de estos ácaros, siendo la bacteria *Bacillus thuringiensis* uno de los microorganismos que mejor controla esta plaga, por lo que es el ingrediente activo de muchos de los biopesticidas que se comercializan en la actualidad (Royalty, Hall, & Taylor, 1990). Puesto que se conoce que las toxinas Cry son producidas durante el proceso de esporulación y que este se da cuando las bacterias se encuentran en condiciones de estrés, es importante estudiar qué tipos de tratamientos de estrés

podrían incrementar la producción de estas toxinas, de modo que sea posible la obtención de productos más efectivos.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la producción de toxinas con efecto acaricida de dos cepas de *Bacillus* luego de ser sometidas a tratamientos de estrés térmico

Específicos:

- Implementar un criadero de ácaros de *Tetranychus urticae*
- Realizar la reactivación y caracterización bioquímica de las cuatro cepas de *Bacillus* spp. obtenidas en un estudio previo.
- Evaluar el efecto acaricida de las cuatro cepas de *Bacillus* por medio del porcentaje de mortalidad de ácaros y seleccionar las mejores cepas para análisis posteriores.
- Caracterizar el crecimiento de las dos mejores cepas de *Bacillus* mediante la realización de curvas de crecimiento microbiano
- Analizar las diferencias de la cantidad de endosporas y células vegetativas producidas según tres diferentes tiempos de crecimiento y durante 8 días de estrés térmico a 4°C por medio de tinciones de verde de malaquita y microscopía.
- Realizar una microscopía electrónica de barrido (SEM) para la observación de los cristales proteicos producidos por las cepas de *Bacillus*.
- Evaluar el efecto acaricida de las toxinas producidas por dos cepas de *Bacillus* sp. sometidas a tratamientos con dos tiempos de crecimientos y dos tiempos de estrés térmico en base al cálculo de porcentaje de mortalidad de ácaros.

ÁREA DE ESTUDIO

Las bacterias utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ y provinieron del trabajo previo, “Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* nativas de suelos de la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro *Tetranychus urticae*”, realizado por Ana Narváez.

Por otra parte, los análisis microbiológicos y la preparación de tratamientos fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola USQ, mientras que los bioensayos se realizaron en el invernadero del mismo laboratorio.

MATERIALES

5.1 Reproducción de *Tetranychus urticae*

- Plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum*)
- Ácaros *Tetranychus urticae*
- Calefactor

5.2 Reactivación de cepas

- Cultivos microbianos de 5 cepas de *Bacillus* (BTC, C2.4, PI.14, I.15)
- Termobloque Drybath Stdrd 1 blk 100-120V (Thermo Scientific)
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Medio T3 líquido
- Cajas Petri plásticas
- Medio T3 sólido
- Asa de siembra metálica
- Portaobjetos
- Verde de malaquita
- Microscopio óptico con cámara digital ICC50 E (Leica)

5.3 Caracterización bioquímica

- Cepas de *Bacillus* (BTC, C2.4, PI.14, I.15)
- Medio de cultivo Sulfato Indol Movimiento (SIM)
- Caldo de cultivo urea
- Medio de cultivo citrato
- Medio de cultivo amilasa
- Medio de cultivo Vogues Proskauer (VP)

- Medio de cultivo agar sangre
- Tubos de ensayo
- Asa de siembra metálica
- Asa de estocada metálica
- Incubador 6 (Thermo Electron)

5.4 Preparación de tratamientos bioensayos preliminares

- Cajas Petri plásticas
- Medio de cultivo T3 sólido
- Cepas de *Bacillus* (BTC, C2.4, PI.14, I.15)
- Cultivo bacteriano de *E. coli*
- Medio de cultivo T3 líquido
- Matraces Erlenmeyer 250 ml
- Algodón
- Incubadora de agitación S1-64 (HYSC)
- Portaobjetos
- Verde de malaquita
- Microscopio óptico con cámara digital ICC50 E (Leica)
- Cámara de Petroff Hausser
- Microscopio de campo oscuro DM750 P (Leica)
- Refrigerador

5.5 Bioensayos Preliminares

- Hojas de pepino dulce
- Ácaros *Tetranychus urticae*
- Cajas Petri de vidrio

- Esponja floral (Oasis)
- Palos de pincho
- Solución Sacarosa 1%
- Spray de gota fina
- Estereomicroscopio EZ4 (Leica)
- Tratamientos (BTC, C2.4, Pl.14, I.15, *E.coli*)

5.6 Curva de crecimiento microbiano

- Cajas Petri plásticas
- Medio de cultivo T3 sólido
- Cepas de *Bacillus* (BTC, C2.4)
- Medio de cultivo T3 líquido
- Matraces Erlenmeyer 250 ml
- Algodón
- Incubadora de agitación S1-64 (HYSC)
- Espectrofotómetro 7305 (Jenway)
- Celdas para espectrofotómetro
- Portaobjetos
- Verde de malaquita
- Microscopio óptico con cámara digital ICC50 E (Leica)

5.7 Ensayos de tiempo de crecimiento e Incubación en frío

- Cajas Petri plásticas
- Medio de cultivo T3 sólido
- Cepas de *Bacillus* (BTC, C2.4)
- Medio de cultivo T3 líquido

- Matraces Erlenmeyer 250 ml
- Algodón
- Incubadora de agitación S1-64 (HYSC)
- Refrigerador
- Espectrofotómetro 7305 (Jenway)
- Celdas para espectrofotómetro
- Portaobjetos
- Verde de malaquita
- Microscopio óptico con cámara digital ICC50 E (Leica)

5.8 Preparación de tratamientos bioensayos

- Cajas Petri plásticas
- Medio de cultivo T3 sólido
- Cepas de *Bacillus* (BTC, C2.4)
- Cultivo bacteriano *E. coli*
- Producto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*
- Medio de cultivo T3 líquido
- Matraces Erlenmeyer 250 ml
- Algodón
- Incubadora de agitación S1-64 (HYSC)
- Portaobjetos
- Verde de malaquita
- Microscopio óptico con cámara digital ICC50 E (Leica)
- Cámara de Petroff Hausser
- Microscopio de campo oscuro DM750 P (Leica)

- Refrigerador

5.9 Bioensayos

- Hojas de pepino dulce
- Ácaros *Tetranychus urticae*
- Cajas Petri de vidrio
- Esponja floral (Oasis)
- Palos de pincho
- Solución Sacarosa 1%
- Spray de gota fina
- Tratamientos (BTC, C2.4, PI.14, I.15, *E.coli*)
- Estereomicroscopio EZ4 (Leica)

5.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

- Solución paraformaldehído al 3.7% en PBS 1X
- Etanol 50%
- Etanol 70%
- Etanol 80%
- Etanol absoluto
- Micropipeta 100-1000 μ l
- Puntas para micropipeta de 100-1000 μ l
- Tubos Eppendorf 1.5ml
- Centrífuga CF-10 (WiseSpin)
- Microscopio de Barrido electrónico JSM-IT300 (JEOL)

5.11 Análisis de resultados

- Software estadístico SPSS

MÉTODOS

6.1 Reproducción de *Tetranychus urticae*

La reproducción de los ácaros fue realizada en plantas de pepino dulce, obtenidas del vivero ServiPlants ubicado en la vía a Nayón. Estas fueron ubicadas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ, el cual se mantuvo a una temperatura de 32°C. Los ácaros que se utilizaron para la primer infestación fueron obtenidos de la florícola “Rosen Tantau” ubicada en la vía Pintag km 6, y se introdujeron 8 plantas de pepino dulce nuevas semanalmente.

6.2 Reactivación de cepas

Para la reactivación de cepas se realizó un pase de las cepas BTC, C2.4, I.15 y P1.14 desde una caja Petri con medio T3 sólido (Anexo 1), hacia tubos Eppendorf de 1.5ml con medio T3 líquido (Anexo 2). Dichos tubos fueron situados en el termobloque Drybath Stdrd 1 blk 100-120V (Thermo Scientific) a una temperatura de 80°C por 15 minutos. Posteriormente, se sembraron las bacterias en cajas Petri con medio T3 sólido nuevo, estas fueron incubadas a 37°C por 18h. Una vez que se comprobó la presencia de un solo tipo de colonias bacterianas en las diferentes cajas Petri, se realizaron tinciones de verde de malaquita siguiendo el protocolo de Centinkaya (2002) y se observaron las placas en el microscopio óptico digital ICC50 E (Leica) y las morfologías fueron comparadas con las registradas por Ana Narváez en el trabajo previo “Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* nativas de suelos de la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro *Tetranychus urticae*”

6.3 Caracterización bioquímica

Cada una de las cepas BTC, C2.4, I.15 y P1.14 fueron sembradas por duplicado en tubos de ensayo con los medios de cultivo SIM, urea, citrato, amilasa, Vogues Proskauer y Agar sangre. Los tubos fueron incubados a 37°C por 24h en la incubadora 6 (Thermo Electron).

6.4 Preparación de tratamientos bioensayos preliminares

Para la preparación de los tratamientos se empleó la metodología de García (2011), para lo cual se utilizaron matraces Erlenmeyer de 100 ml en los que se colocaron 20 ml de medio T3 líquido. Cada matraz fue inoculado con 4 colonias aisladas de una cepa diferente, y posteriormente incubado por 24 horas en la incubadora de agitación S1-64 (HYSC) a 200 rpm y 30°C. Una vez transcurrido dicho tiempo, se pasaron 3 ml de cada matraz, a 3 nuevos matraces con 20 ml de T3 líquido (1ml/matraz), con la finalidad de que el inóculo primario sea homogéneo para cada uno de los triplicados. Luego los cultivos fueron incubados en agitación bajo las mismas condiciones previamente mencionadas, esta vez por 72 horas. Después de haber transcurrido el tiempo de crecimiento, los cultivos fueron sometidos a estrés térmico (4°C por 8 días).

A continuación se muestran los tratamientos que fueron empleados para cada cepa; cabe recalcar que cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Tabla 1. Tratamientos Bioensayos preliminares

Tratamiento	Descripción	Código
BTC	Cepa BTC, 72h crecimiento, 8d incubación 4°C	B
C2.4	Cepa C2.4, 72h crecimiento, 8d incubación 4°C	C
PI.14	Cepa PI.14, 72h crecimiento, 8d incubación 4°C	P
I.15	Cepa I.15, 72h crecimiento, 8d incubación 4°C	I
<i>E.coli</i>	Cepa <i>E. coli</i> , 72h crecimiento, 8d incubación 4°C	Control -

6.5 Bioensayos preliminares

Siguiendo el protocolo de Royalty y otros (1990), con ciertas modificaciones, los bioensayos fueron realizados con hojas de pepino dulce, las mismas que fueron lavadas con agua potable, secadas y colocadas de manera vertical en cubos de esponja floral contenidos en

cajas Petri con agua. Cada hoja fue inoculada con 10 ácaros adultos y los peciolo fueron rodeados con vaselina, de modo que se evite que los ácaros escapen. Posteriormente se aplicaron los tratamientos, mencionados en la sección anterior, con un spray de gota fina (con un volumen de descarga de 1ml aproximadamente). Adicionalmente, se realizó la reaplicación de los tratamientos a los 3 días.

Los conteos se hicieron a los 3, 5 y 7 días desde la aplicación, para lo cual se utilizó un estereomicroscopio EZ4 (Leica), y se tomaron datos de los individuos vivos y muertos por hoja. Para el cálculo de porcentaje de mortalidad se utilizó el número total de individuos por hoja como el 100%; es decir, no se tomaron en cuenta individuos desaparecidos. De igual forma, se descontaron los individuos nuevos que fueron naciendo durante el experimento.



Figura 3. Hojas para bioensayo

6.6 Curva de crecimiento microbiano

Para la realización de las curvas de crecimiento de las cepas B y C, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio T3 líquido. El inóculo inicial consistió de 30 colonias aisladas de cada cepa por cada matraz, los mismos que fueron incubados a 200 rpm y 30°C por 24 horas en la incubadora de agitación S1-64 (HYSC). Posteriormente se realizaron subcultivos de cada cepa, tomando 1 ml del cultivo para realizar un pase a un nuevo matraz con 150 ml de T3 líquido. Los subcultivos fueron realizados por triplicado para cada cepa.

Después se incubaron los cultivos en agitación bajo las mismas condiciones y se tomaron 1.5 ml de cada matraz Erlenmeyer cada 30 minutos por 8 horas para mediciones de absorbancia a 630 nm en el espectrofotómetro 7305 (Jenway). Al cabo de las 8 horas, las mediciones de absorbancia se realizaron con lapsos más amplios de tiempo, por lo que los siguientes datos se tomaron a las 16, 24, 36, 48 y 72 horas del inicio del crecimiento (Catañeda & Sánchez, 2016) (Tapia & Moreno, 2014). Adicionalmente, se realizaron tinciones de verde de malaquita a las 5, 36 y 72 horas.

6.7 Ensayos de tiempo de crecimiento e Incubación en frío

6.7.1 Crecimiento de cepas a diferentes tiempos de crecimiento e incubación en frío

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio T3 líquido. Se inocularon 30 colonias aisladas de cada cepa (B y C) a dos diferentes matraces, y estos se incubaron a 200 rpm y 30°C por 24 horas en la incubadora de agitación S1-64 (HYSC). Una vez transcurridas 24 horas, se tomó 1 ml de cada matraz que fue inoculado en uno nuevo con 150 ml de T3 líquido. Las dos cepas fueron incubadas en agitación bajo las condiciones previamente mencionadas pero durante diferentes tiempos (5, 36 y 72h), cada una de las cepas y tiempos por triplicado; y luego se pasaron a tratamientos en frío (4°C) durante 8 días, realizando 1 tinción de verde de malaquita por día, desde el día 0 al 8 de tratamiento en frío.

6.7.2 Microscopía y conteos de endosporas y células vegetativas

Para la microscopía y conteo de endosporas y células vegetativas se adaptó la técnica de gram de gota fresca presentada por Celso y Otros (1998); para lo cual, se utilizó un asa de siembra calibrada y se tomaron 10 ul de cada muestra homogeneizada, los mismos que fueron colocados en un portaobjetos sin ser extendidos y se dejaron secar junto al mechero. Posteriormente, se realizó la tinción de verde de malaquita siguiendo la metodología propuesta por Centinkaya (2002). Después, se observaron las placas al microscopio óptico digital ICC50

E (Leica) y se tomaron 15 fotos de diferentes campos por cada muestra para la posterior cuantificación de endosporas y células vegetativas (Hiraoka, y otros, 2005).

6.8 Preparación de tratamientos bioensayos

La preparación de los tratamientos para los bioensayos fue realizada siguiendo la misma metodología descrita para la preparación de los tratamientos para los bioensayos preliminares, con la única diferencia de que en este caso solo se utilizaron las cepas B y C, las mismas que fueron sometidas a diferentes tiempos de crecimiento en agitación, así como a diferentes tiempos de incubación en frío. Adicionalmente, se incluyó en el experimento un control positivo, el cual es un producto comercial a base de *B. thuringiensis*.

Cada tratamiento fue realizado por triplicado; los detalles de cada tratamiento son especificados en la siguiente tabla.

Tabla 2. Tratamientos Bioensayos

Tratamiento	Descripción	Código
BTC 36-0	Cepa BTC, 36h de crecimiento, 0d incubación 4°C	B36-0
BCT 36-4	Cepa BTC, 36h de crecimiento, 4d incubación 4°C	B36-4
BTC 72-0	Cepa BTC, 72h de crecimiento, 0d incubación 4°C	B72-0
BCT 72-4	Cepa BTC, 72h de crecimiento, 4d incubación 4°C	B72-4
C2.4 36-0	Cepa C2.4, 36h de crecimiento, 0d incubación 4°C	C36-0
C2.4 36-4	Cepa C2.4, 36h de crecimiento, 4d incubación 4°C	C36-4
C2.4 72-0	Cepa C2.4, 72h de crecimiento, 0d incubación 4°C	C72-0
C2.4 72-4	Cepa C2.4, 72h de crecimiento, 4d incubación 4°C	C72-0
<i>E. coli</i>	Cepa E. coli, 72h crecimiento, 4d incubación 4°C	Control -
Producto comercial	Producto comercial a base de <i>B. thuringiensis</i> disuelto en agua	Control +

6.9 Bioensayos

La metodología para la realización de los bioensayos fue la misma antes mencionada en los bioensayos preliminares, difiriendo en los tratamientos que fueron aplicados. En este caso, se aplicaron los tratamientos detallados en la Tabla 2 por triplicado.

6.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la microscopía electrónica de barrido se tomó 1ml de la muestra B72-4 y se realizó una centrifugación a 13000rpm por 10 minutos en la centrífuga CF-10 (WiseSpin), se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 centrifugaciones más con 1 ml de muestra cada una; posteriormente, se incubó el precipitado con una solución de paraformaldehído al 3.7% en PBS 1X por 30 minutos y después se realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones. Una vez descartado el sobrenadante, se incubó el precipitado con una solución de etanol al 50% por 10 minutos, seguido por otra centrifugación. Se repitió el procedimiento con soluciones de etanol del 70%, 80%, 90% y con etanol absoluto. Finalmente, se dejó secar el precipitado a 37°C por 24 horas (Liang, y otros, 2011).

Una vez preparadas las muestras, se realizó la microscopía de barrido electrónico en el equipo JSM-IT300 de la marca JEOL en el Laboratorio de Ingeniería Mecánica de la USFQ.

6.11 Análisis de Resultados

Los análisis estadísticos tanto para los bioensayos como para los conteos de endosporas y células vegetativas fueron realizados en el software estadístico SPSS versión 22. Se realizaron análisis de comparación de medias ANOVA de un factor, así como pruebas de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

7.1 Reactivación de cepas

Se realizó la reactivación de las cepas que obtuvieron el mejor efecto acaricida en el trabajo realizado por Ana Narváez (B, C, P, I) mediante la inoculación de las mismas en medio T3 líquido, estas recibieron un tratamiento térmico a 80°C por 15 minutos y posteriormente fueron sembradas en medio T3 sólido para verificar la existencia de una sola morfología. Además se realizaron tinciones de verde de malaquita para la identificación morfológica presentada a continuación.

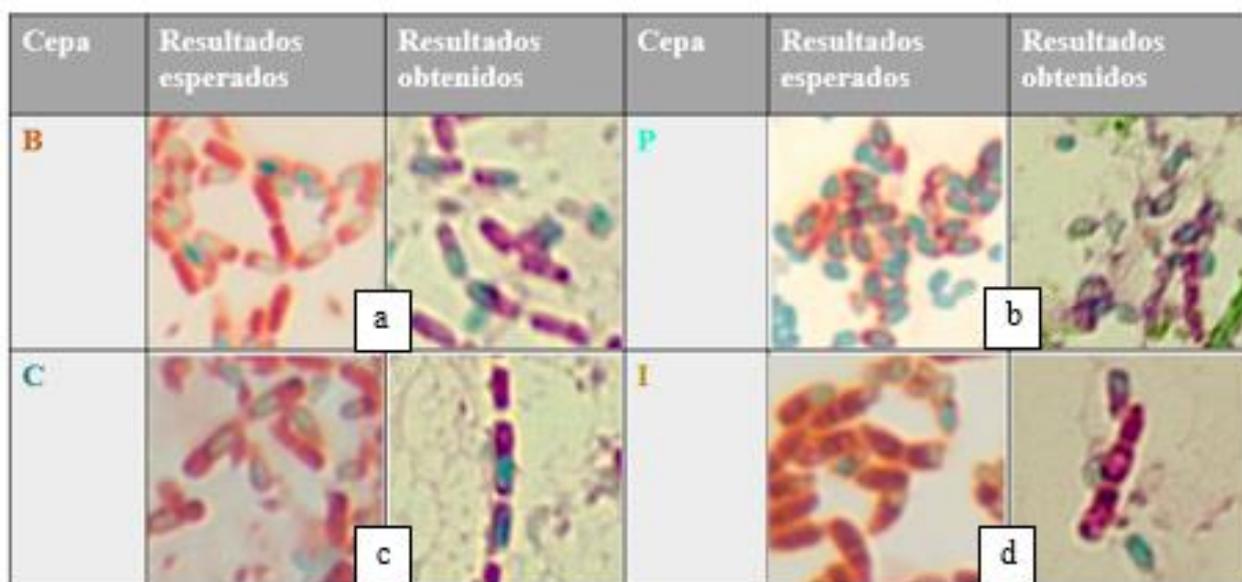


Figura 4. Microscopía reactivación de cepas. a. Cepa B, izquierda microscopía esperada, obtenida por Narváez, 2015, derecha microscopía obtenida en el presente estudio; se observan bacilos largos con endosporas elipsoidales subterminales o terminales. b. Cepa P, izquierda microscopía esperada, derecha microscopía obtenida; se observan bacilos cortos con endosporas elipsoidales centrales. Cepa C, izquierda microscopía esperada, derecha microscopía obtenida; se observan bacilos largos con endosporas elipsoidales subterminales o terminales. Cepa I, izquierda microscopía esperada, derecha microscopía obtenida; se observan bacilos largos con endosporas elipsoidales o redondas subterminales o terminales

La figura muestra, en el lado izquierdo, las microscopías obtenidas en la investigación de Ana Narváez para las 4 cepas en estudio, mientras que en el lado derecho se presentan las morfologías obtenidas luego de la reactivación de cepas. Se evidencian las mismas morfologías

esperadas y obtenidas para todas las cepas, se puede deducir que se pudieron recuperar las bacterias y que se tratan de las mismas utilizadas por Ana Narváez.

7.2 Caracterización bioquímica

Además de la caracterización morfológica, se realizó una identificación bioquímica, utilizando las pruebas de SIM, urea, citrato, amilasa VP y hemólisis para todas las cepas, adicionalmente, se incluyó el perfil esperado para *Bacillus thuringiensis* en estas pruebas, de modo que las cepas puedan ser comparadas

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para las cepas B, C, P e I.

Prueba	Perfil <i>Bacillus thuringiensis</i>	B	C	P	I
SIM	Sulfato -	Sulfato -	Sulfato -	Sulfato -	Sulfato -
	Indol -	Indol -	Indol -	Indol -	Indol -
	Movimiento +	Movimiento +	Movimiento +	Movimiento +	Movimiento -
UREA	-	-	-	+	+
CIT	+	+	+	+	-
Amilasa	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+
Hemólisis	+	+	+	+	+

La tabla muestra los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas para las cuatro cepas; de igual forma, se observa el perfil esperado para *B. thuringiensis*. Se evidencia que tanto a cepa B como la C, presentaron los resultados esperados para *B. thuringiensis* en todas las pruebas realizadas. Sin embargo, las cepas I y P fueron positivas para la prueba del citrato y la cepa I fue también positiva para la prueba de urea. Esto indica que es más probable que las cepas B y C se traten de *Bacillus thuringiensis*, antes que las cepas P e I

7.3 Bioensayos preliminares

Los bioensayos preliminares fueron realizados con la finalidad de determinar si las cuatro cepas estudiadas continuaban presentando el efecto acaricida demostrado en el trabajo previo. Los ensayos se hicieron en plantas de pepino dulce con 10 ácaros en estadio adulto por

hoja. Se aplicaron tratamientos de las cuatro cepas (B, C, I y P), así como de un control negativo (*E. coli* en medio T3) obtenidos luego de 72 horas de crecimiento en agitación y 8 días de incubación en frío; cada tratamiento fue aplicado por triplicado y posteriormente se realizaron conteos a los 3, 5 y 7 días desde la aplicación y se calculó el porcentaje de mortalidad de cada tratamiento.

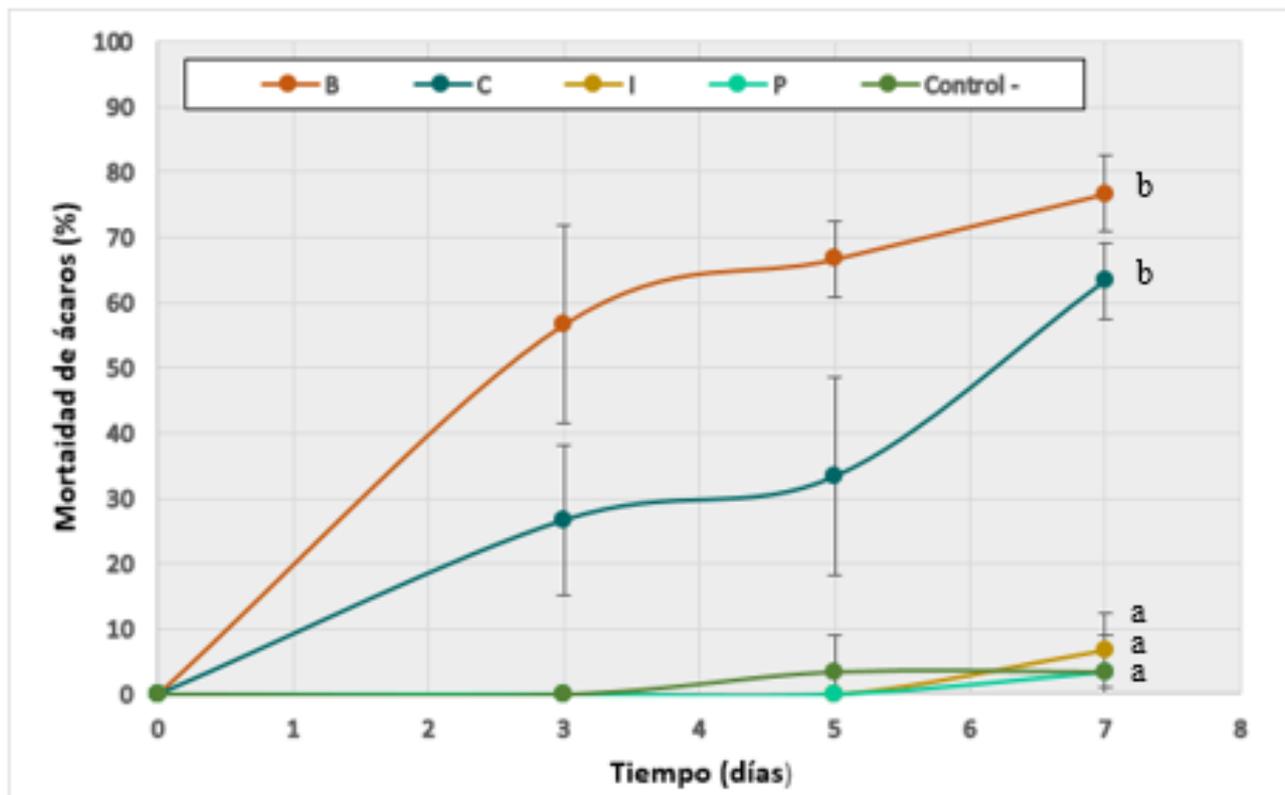


Figura 5. Bioensayos preliminares. La comparación de medias realizada con el análisis ANOVA de un solo factor, y la posterior prueba de Tukey, arrojaron diferencias significativas con un alfa de 0.05 de las cepas B y C con las cepas P, I y el control -. Mostrándose un porcentaje de mortalidad de ácaros casi 70 veces mayor en los tratamientos con las cepas B y C.

Los conteos a los 3 días de la aplicación ya muestran un efecto acaricida en las cepas B y C, al cabo de 7 días, el porcentaje de mortalidad incrementa para dichas cepas, no obstante, no se encuentran diferencias significativas entre la mortalidad causada por ambas cepas. Por el contrario, las cepas P e I no arrojaron diferencias estadísticamente significativas con el control negativo, por lo cual, no se considera que presenten algún efecto tóxico contra *T. urticae*.

7.4 Curva de crecimiento microbiano

En base al bajo o nulo efecto acaricida que presentaron las cepas P e I en los bioensayos preliminares, se decidió retirarlas del estudio y enfocar el mismo a las cepas B y C que mostraron una alta mortalidad de ácaros. Por lo tanto, se realizaron curvas de crecimiento microbiano para caracterizar el crecimiento de dichas dos cepas durante 72 horas de crecimiento en agitación a 200 rpm y 30°C, y adicionalmente se hicieron tinciones de verde de malaquita para observar las fases de esporulación.

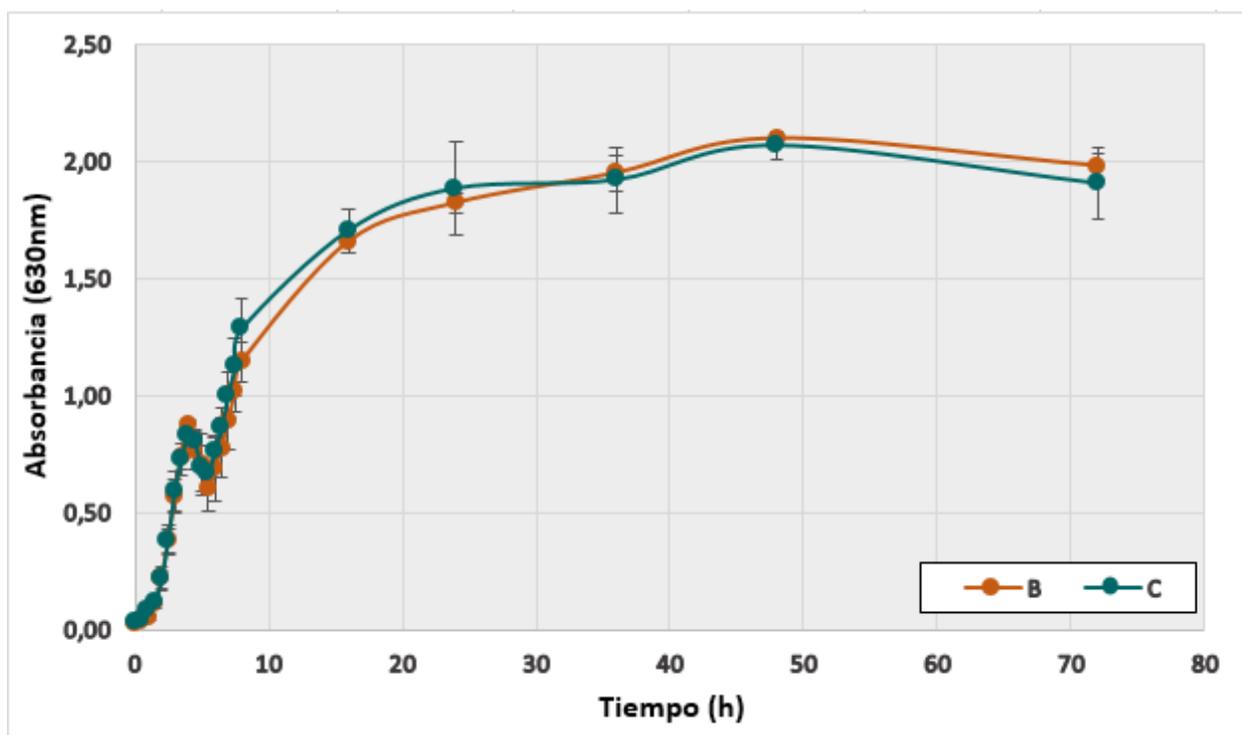
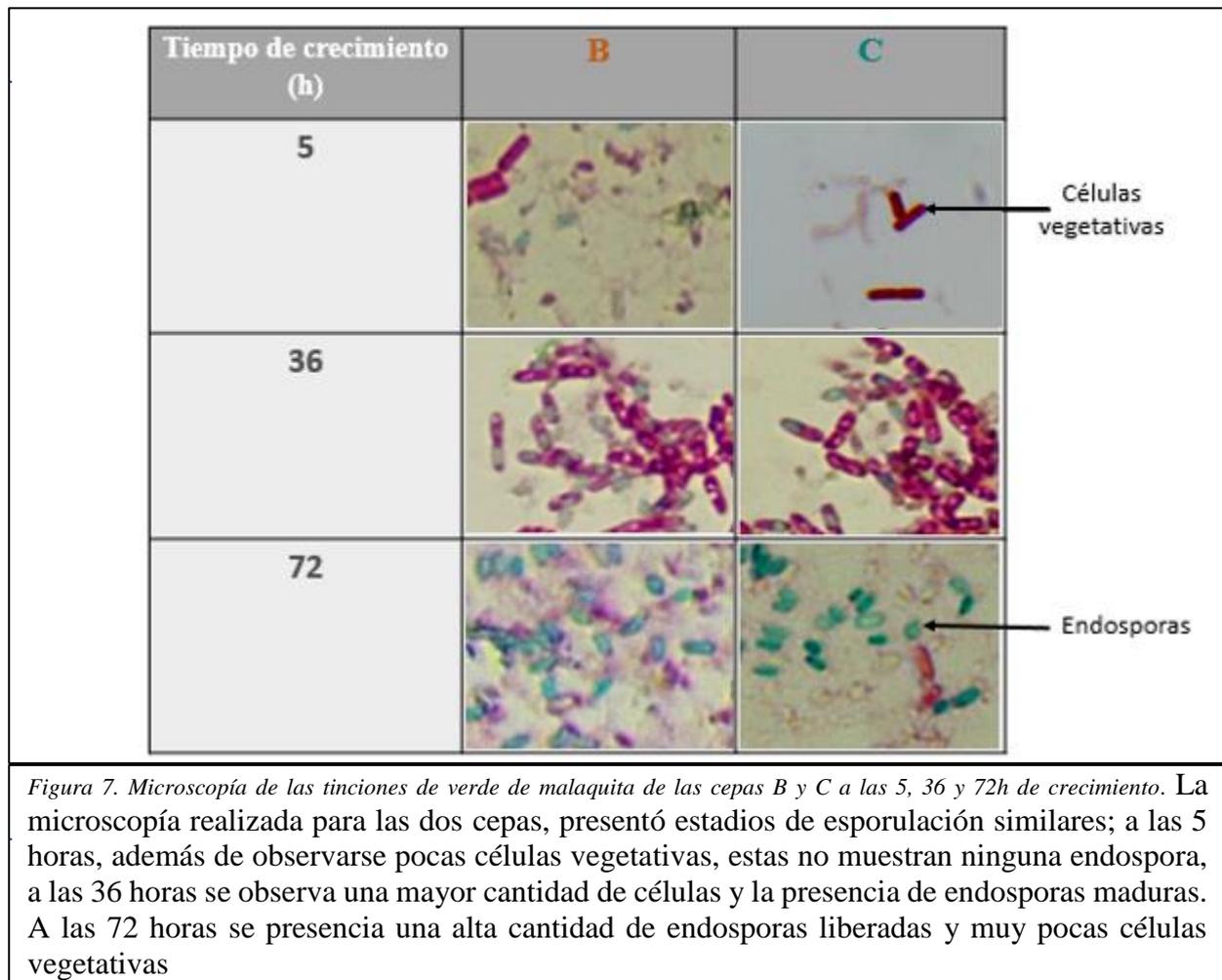


Figura 6. Curvas de crecimiento microbiano para las cepas B y C. Las cepas B y C muestran un comportamiento muy similar durante su crecimiento, observándose una fase de adaptación corta, seguida por una primera fase exponencial y una primera fase estacionaria a las 5h, se continúa con la segunda fase exponencial y alrededor de las 36h se observa una segunda fase estacionaria que se prolonga hasta las 72h

Se observan las curvas de crecimiento de las cepas B y C, mediante datos de absorbancia a 630nm, tomados durante 72 horas de crecimiento. Se evidencia un comportamiento muy similar para las dos cepas, existiendo una disminución de la absorbancia

alrededor de las 5 horas y una segunda fase exponencial que continúa hasta las 16 horas para luego dar paso a la fase estacionaria a las 36 horas, la misma que continúa hasta las 72 horas



La microscopía permitió comprender mejor lo obtenido en la curva de crecimiento microbiano ya que se observó que la primera fase estacionaria a las 5 horas no era producto del comienzo de la esporulación ya que en la microscopía no se observaron endosporas. Adicionalmente, se observó lo esperado a las 36 y 72 horas, puesto que al encontrarse en la fase estacionaria del crecimiento microbiano, se esperaba observar una presencia alta de endosporas, lo cual se observó con la microscopía realizada.

7.5 Ensayos de tiempo de crecimiento e Incubación en frío

Se realizaron ensayos para determinar cuáles serían los tiempos de crecimiento en medio líquido y agitación y de incubación en frío (4°C) óptimos, para obtener altas cantidades de endosporas en un menor tiempo. Para ello, se prepararon tratamientos, con las cepas B y C, sometiéndolas a 5, 36 y 72 horas de crecimiento y posteriormente incubándolas a 4°C por 8 días. Se realizó una tinción de verde de malaquita por día y por tratamiento desde el día 0 hasta el día 8 de estrés térmico y posteriormente, se realizaron conteos de endosporas y células vegetativas para determinar si se podían observar diferencias entre tratamientos.

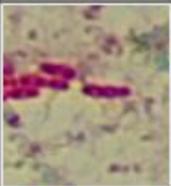
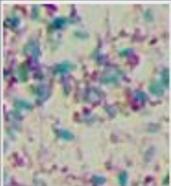
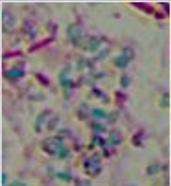
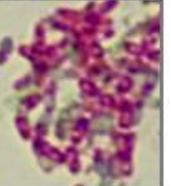
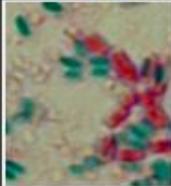
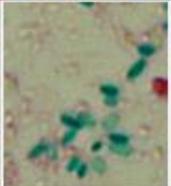
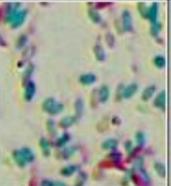
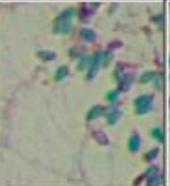
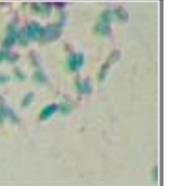
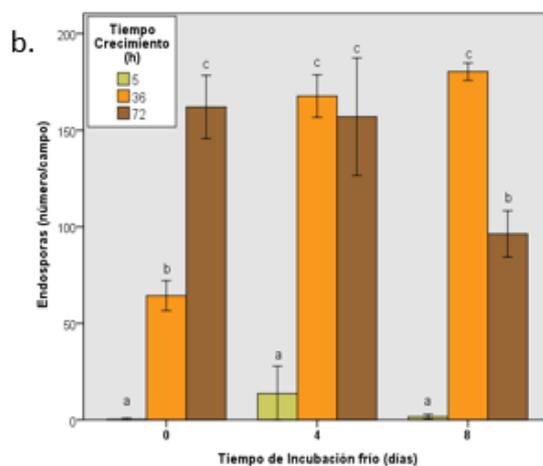
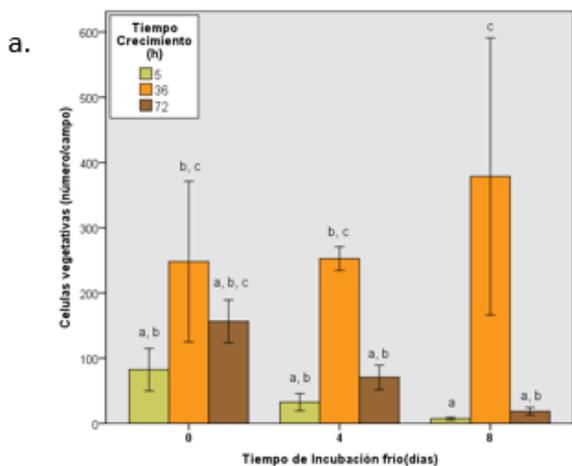
	B			C		
	Tiempo de Incubación en frío (d)			Tiempo de Incubación en frío (d)		
Tiempo de crecimiento (h)	0	4	8	0	4	8
5						
36						
72						

Figura 8. Microscopía tinciones verde de malaquita de las cepas B y C para los ensayos de tiempo de crecimiento e incubación en frío. Se evidencia que con 5 horas de crecimiento, no existió formación de endospora a ningún tiempo de estrés térmico, para ninguna de las dos cepas. La cepa B mostró las primeras fases de esporulación a las 36 h y 0 días de frío, no obstante, solo se observan endosporas maduras y liberadas a los 4 y 8 días de incubación en frío. Con la cepa C, igualmente se ven los primeros estadios de formación de endospora a las 36 h de crecimiento y 0 días de refrigeración; con 4 y 8 días de tratamiento frío se ve la presencia de endosporas maduras pero no gran cantidad de endosporas liberadas. En cuanto a las 72 horas de crecimiento, se observan endosporas maduras y liberadas desde el día 0 de tratamiento frío, tanto para la cepa B como para la C.

B



C

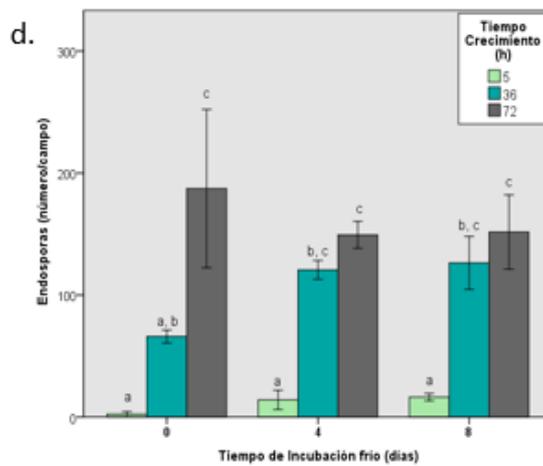
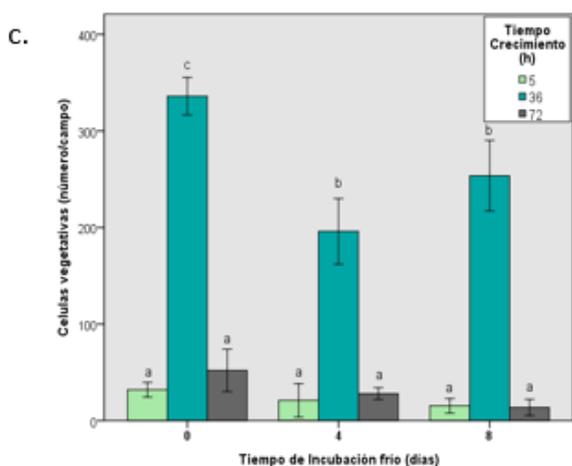


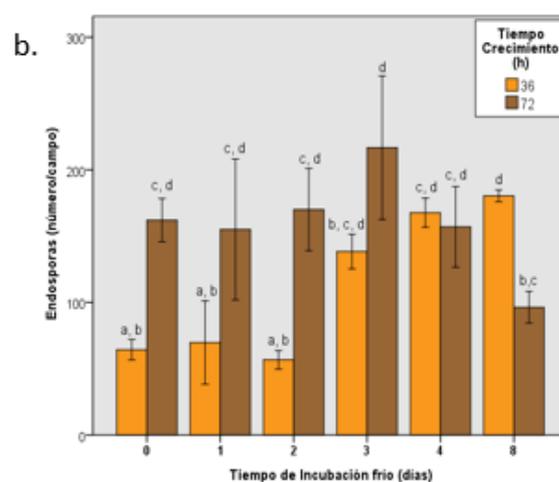
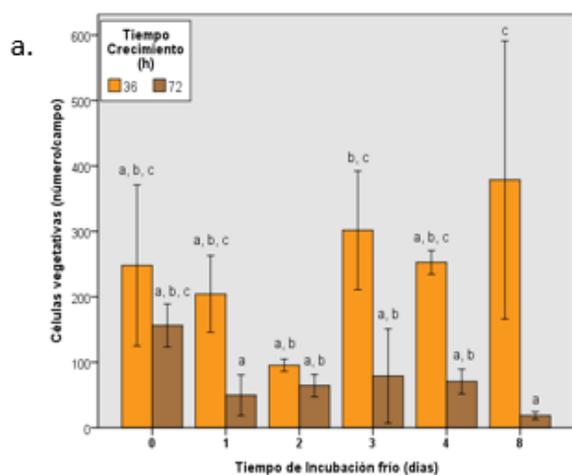
Figura 9. Conteos de endosporas y células vegetativas 5, 36 y 72 h de crecimiento y 0, 4 y 8 días de incubación en frío. Conteos de células vegetativas y endosporas a las 5, 36 y 72 horas de incubación y con 0, 4, y 8 días de tratamiento en frío. a. cepa B (células vegetativas), b. cepa B (endosporas), c. cepa C (células vegetativas), d. cepa C (endosporas). Las letras corresponden a los grupos estadísticamente iguales ($p < 0.05$) luego de realizar un ANOVA y una prueba de Tukey

Los conteos de endosporas para la cepa B y C muestran valores muy bajos en los tratamientos con 5 h de crecimiento en agitación. El tratamiento de 36h de crecimiento, muestra que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los 4 y 8 días de tratamiento en frío tanto en la cepa B como en la C. Por otro lado, en las dos cepas se observa que con 72 h de crecimiento, la cantidad de endosporas desde con 0, 4 y 8 días de incubación en frío son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) ya que desde el día 0 se obtiene una alta cantidad de endosporas. En cuanto a los conteos de células vegetativas, se observan bajas cantidades de células vegetativas, se observan bajas cantidades en los tratamientos de 5 y 72 h de crecimiento,

y cantidades mayores de células vegetativas a las 36h de crecimiento. No obstante, se evidencia una alta desviación estándar en los datos obtenidos.

Puesto que se observó que a las 5h de crecimiento, no se logró obtener una cantidad de endosporas razonable, se decidió retirar a dicho tratamiento de los experimentos. Adicionalmente, puesto que si se observaron diferencias significativas en los tratamientos de 36h de crecimiento entre las 0 y 4h de incubación en frío, se decidió ampliar los conteos a los días 1, 2 y 3 de tratamiento en frío, de modo que se pueda determinar en qué día se daba el aumento en la producción de endosporas.

B



C

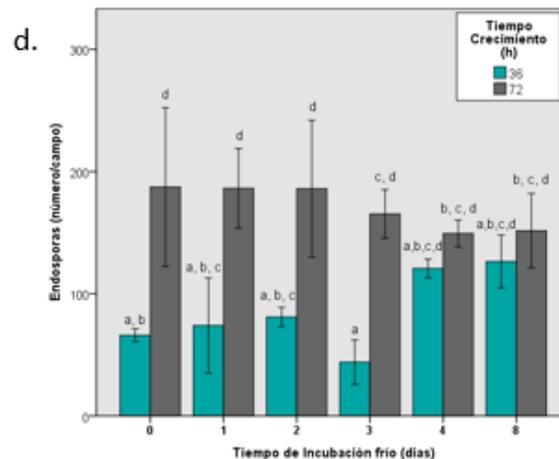
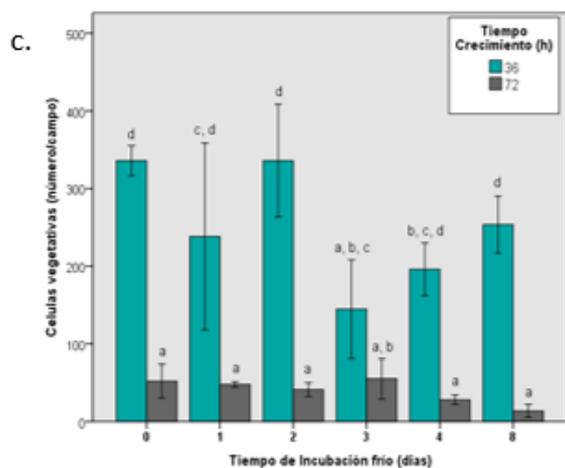


Figura 10. Conteos de endosporas y células vegetativas 36 y 72 h de crecimiento y 0, 1, 2, 3, 4 y 8 días de incubación en frío. Conteos de células vegetativas y endosporas a las 36 y 72 horas de incubación y con 0, 1, 2, 3, 4, y 8 días de tratamiento en frío. a. cepa B (células vegetativas), b. cepa B (endosporas), c. cepa C (células vegetativas), d. cepa C (endosporas). Las letras corresponden a los grupos estadísticamente iguales ($p < 0.05$) luego de realizar un ANOVA y una prueba de Tukey

En la figura se observan los mismos patrones observados en la Figura 9; con la diferencia de que al ampliar los datos de los conteos a 1, 2 y 3 días de tratamiento frío, fue posible establecer a qué tiempo se daba el cambio en el número de endosporas producidas, con la finalidad de determinar si era posible acortar aún más el tiempo de elaboración de los tratamientos. En la cepa B (a) se observa que el aumento en el número de endosporas presentes se da a los 3 días, por lo que sería posible disminuir el número de días de incubación a 4°C a 3. Sin embargo, en la cepa C el aumento del número de endosporas se da a los 4 días de incubación en frío; por lo tanto, debido a que las dos cepas debían recibir los mismos tiempos de crecimiento e incubación en frío; se decidió establecer a los 4 días como el tiempo necesario para que se de el aumento del número de endosporas en las dos cepas.

7.6 Pruebas de eficacia acaricida o Bioensayos

Primeramente, se tomaron muestras de los diferentes tratamientos para realizar conteos de endosporas y células vegetativas, y comprobar si se continuaban obteniendo los patrones observados durante los ensayos de tiempo de crecimiento e incubación en frío (Anexo 8). Luego se realizaron los bioensayos con los 8 tratamientos, más un control positivo (producto comercial) y un control negativo (*E. coli* en T3), cada uno por triplicado y se calculó el porcentaje de mortalidad de ácaros para cada tratamiento al cabo de 3, 5 y 7 días de la aplicación de los tratamientos.

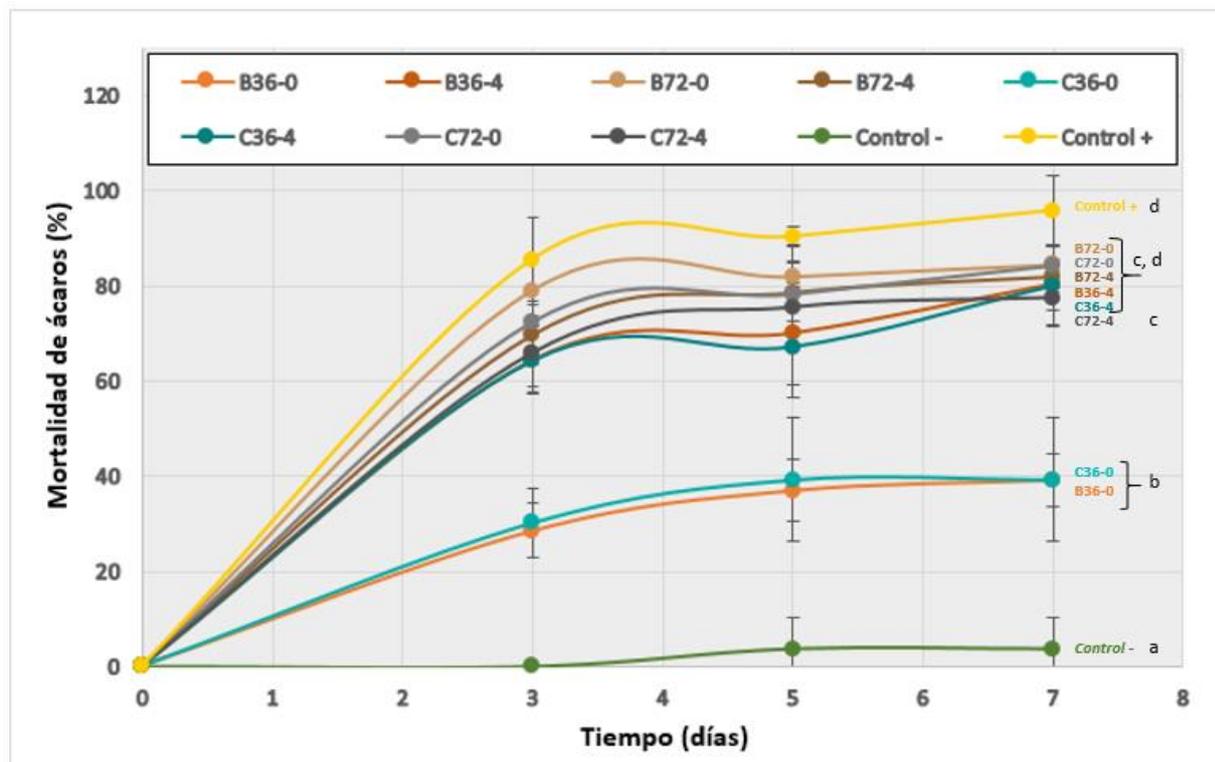


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de ácaros para cada tratamiento de tiempo de crecimiento e incubación en frío. Se observan el efecto acaricida de los 8 tratamientos aplicados, siendo B o C la cepa, 36 o 72 el tiempo de crecimiento y 0 o 4, el tiempo de incubación en frío. Adicionalmente se muestra el efecto del control + (producto comercial) y del control - (*E. coli* en medio T3). Las letras muestran a los grupos estadísticamente iguales en base a un análisis ANOVA de un factor, con 95% de intervalo de confianza y una prueba de Tukey.

En la figura se muestran los porcentajes de mortalidad de cada tratamiento aplicado; se evidencia un alto efecto acaricida en los tratamientos B36-4, B72-0, B72-4, C36-4, C72-0 y C72-4, los mismos que en la figura anterior, mostraron conteos de endosporas altos y similares entre sí; estos tratamientos no mostraron diferencias estadísticas entre sí y tampoco con el control +. Por el contrario, los tratamientos B36-0 y C36-0, si bien presentaron un porcentaje de mortalidad de casi 40% a los 7 días de la aplicación, no lograron tener un efecto acaricida tan marcado como el de los otros tratamientos (entre 70 y 85%), adicionalmente, los resultados del presente experimento, concuerdan con los del gráfico anterior, donde los mismos dos tratamientos presentaron la menor cantidad de endosporas.

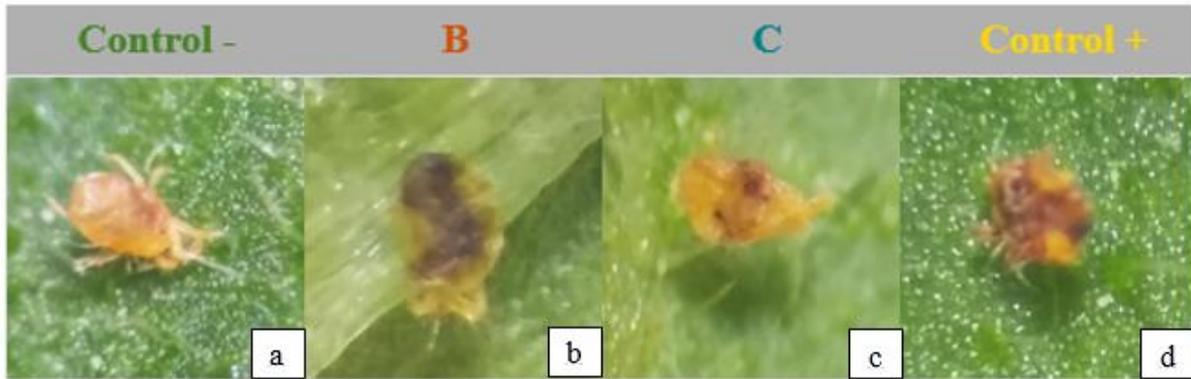


Figura 12. Individuos de *T. urticae* a los 5 días de la aplicación de tratamientos. La figura presenta imágenes de *T. urticae* a los 5 días de la aplicación de los tratamientos. a. Control -, b. Tratamiento cepa B, c. Tratamiento cepa C, d. Control +

Se observan fotografías de individuos de *T. urticae* a los que se les aplicaron diferentes tratamientos; en el tratamiento con el control negativo se observa un individuo vivo que luce voluminoso, mientras que en los tratamientos con las cepas B y C, así como en el control, se observan individuos muertos, con la característica principal de muerte por la toxicidad de los cristales Cry, que es la falta de alimentación, por lo que se observan deshidratados

7.7 Microscopía electrónica de barrido

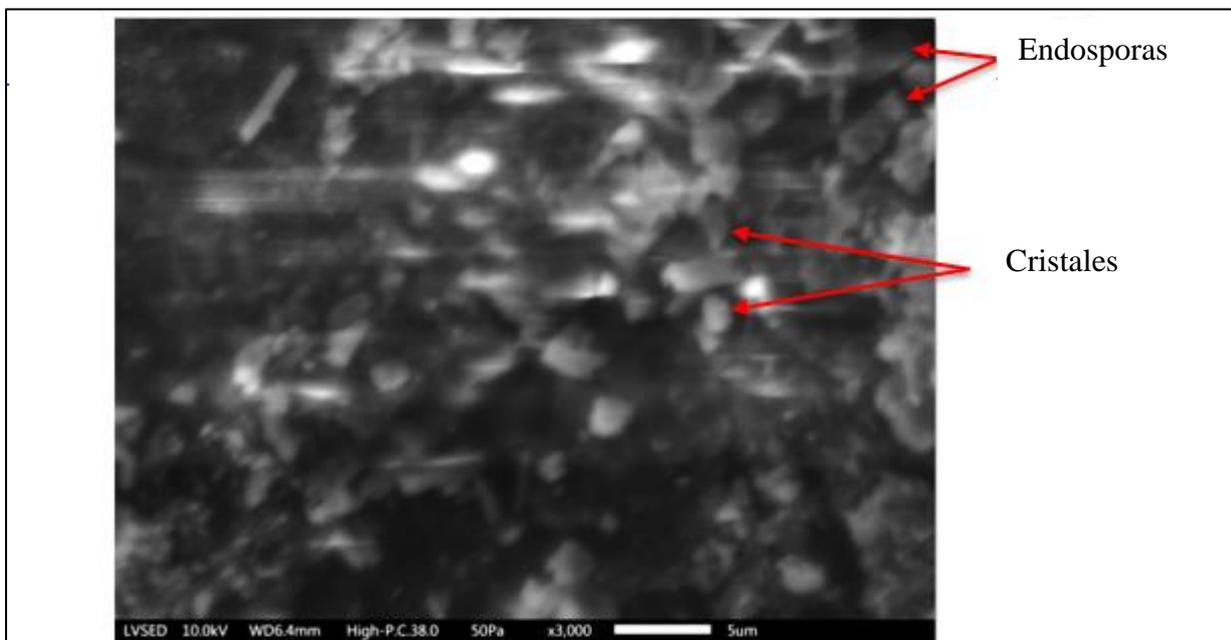


Figura 13. Microscopía electrónica de barrido para a muestra B72-4. Se muestra la microscopía de barrido electrónico realizada en el microscopio JSM-IT300 (JEOL) a 10000 v y un acercamiento de 3000x. Se pueden apreciar cristales proteicos y endosporas, siendo las segundas, de un tamaño mucho mayor y de forma más definida

La microscopía de barrido electrónico, si bien no permitió obtener una imagen del todo clara, si permite distinguir ciertas estructuras como lo son las endosporas, que se presentan como objetos elipsoidales, con bordes más definidos; mientras que los cristales proteicos se observan con diferentes morfologías, en formas paraesporoidales, cuboides, esféricas, etc, y en un tamaño menor que las endosporas

DISCUSIÓN

8.1 Reactivación de cepas de *Bacillus* con potencial acaricida

La metodología empleada para la reactivación de cepas contuvo un paso fundamental de tratamiento térmico a 80°C por 15 minutos; considerando que las cepas habían sido mantenidas en cajas Petri con medio T3 sólido durante varios meses, existía contaminación en los cultivos. Por lo tanto, el someter a los microorganismos a temperaturas tan altas, aseguró que solamente pudieran mantenerse viables las bacterias del género *Bacillus* por su capacidad de esporulación. Este género se caracteriza por formar endosporas cuando se encuentran bajo condiciones de estrés fisiológico, como lo son las temperaturas altas (Prescott, Harley, & Klein, 2009). Por el contrario, para otros microorganismos, temperaturas tan altas tienen un efecto letal ya que una vez que se supera la temperatura óptima de crecimiento, la velocidad de crecimiento comienza a disminuir. A su vez, cuando se llega o se sobrepasa la temperatura máxima, las proteínas bacterianas con funciones enzimáticas esenciales se desnaturalizan y finalmente, las bacterias se lisan y por lo tanto mueren (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2010).

En este caso, como se observa en la figura 4, el tratamiento térmico fue efectivo ya que la microscopía arrojó un solo tipo de morfología para cada cepa. De modo que las cepas B y C presentaron bacilos en cadenas con endosporas elipsoidales y subterminales no deformantes. En el caso de la cepa P, se observaron bacilos cortos con endosporas elipsoidales centrales que ocuparon casi la totalidad de la célula vegetativa. Por último, la cepa I mostró bacilos con endosporas elipsoidales centrales no deformantes. Por lo tanto, tomando en cuenta que todas las cepas concordaron con las morfologías obtenidas en el trabajo previo de Ana Narváez, se puede decir que la reactivación fue exitosa y se trabajó con las mismas bacterias.

8.2 Caracterización bioquímica de cepas

Para la realización de las pruebas bioquímicas se utilizó como referencia el perfil esperado para *Bacillus thuringiensis* presentado por Porcar y otros (2001). En dicho estudio se emplearon las pruebas API 20E y API 50CHB; sin embargo, en el presente trabajo no fue posible la realización de dichas pruebas por los recursos económicos destinados a la investigación; por lo tanto, se realizaron 6 pruebas bioquímicas, para las cuales las cepas B y C, presentaron el perfil esperado para *B. thuringiensis*; mientras que, las cepas P e I difirieron en la prueba de urea y, adicionalmente, la cepa I arrojó un resultado diferente al esperado en a prueba del citrato.

Cabe recalcar que la identificación bioquímica y microscópica sirven como una buena guía para ubicar a los aislados bacterianos dentro del género *Bacillus*; no obstante, no son pruebas definitivas que permitan conocer a ciencia cierta la identidad de las bacterias con las que se está trabajando, ya que no se emplearon las pruebas API que hacen posible identificar las bacterias hasta género y especie (Logan & Berkele, 1984). Además, otra alternativa que permitiría una identificación rápida y más certera de las especies sería la identificación molecular; la secuenciación del gen 16s rRNA específico para la especie suele ser una herramienta importante al momento de identificar especies estrechamente relacionadas como es el caso del género *Bacillus* (Rajashkhar, Shahanaz, & Kalia, 2017). Por lo tanto, si bien los resultados permiten decir que las 4 cepas pertenecen al género *Bacillus*, no se puede aseverar que las cepas B y C se tratan de *B. thuringiensis* por haber coincidido con el perfil esperado para dicha bacteria, ya que no son las pruebas definitivas que distinguen a *B. thuringiensis* de las otras especies del grupo de *B. cereus* (Logan & Berkele, 1984).

8.3 Pruebas de efectividad acaricida

Los bioensayos preliminares arrojaron resultados distintos a lo esperado; puesto que en el estudio realizado por Ana Narváez las 4 cepas utilizadas fueron las que presentaron un mayor

efecto acaricida, se esperaba obtener porcentajes de mortalidad de ácaros estadísticamente diferentes al control negativo. No obstante, solamente las cepas B y C mostraron diferencias significativas con el control, después de la realización de un ANOVA de un factor con un 95% de confianza; mientras que las cepas I y P, fueron estadísticamente iguales al control negativo.

La pérdida del efecto acaricida de estas dos cepas podría explicarse por el largo periodo de tiempo que permanecieron cultivadas en medio T3 sólido, puesto que al permanecer a temperatura ambiente, las bacterias continúan creciendo y se puede dar la pérdida de plásmidos con el paso de las generaciones o con la realización de múltiples subcultivos (Iniesta, 1987). Ya que se conoce que en la mayoría de *B. thuringiensis* los genes Cry se encuentran en plásmidos, es posible pensar que estos tuvieron una baja estabilidad y se perdieron a lo largo de las generaciones. Puesto que el mantenimiento de plásmidos requiere de un gasto energético mayor en las células, las bacterias que tienen un menor número de plásmidos, presentan una ventaja adaptativa sobre las que los presentan en mayor cantidad (Méric, y otros, 2018).

Adicionalmente, en el estudio de Sheppard y otros (2016), se evaluó la estabilidad de dos plásmidos codificantes de toxinas Cry en *B. thuringiensis* cepa MYBT18679, una cepa con alta toxicidad contra nematodos, en condiciones de cultivo estándar de laboratorio. En el trabajo se evidenció una baja estabilidad de uno de los plásmidos, ocurriendo una pérdida sustancial del mismo en tan solo un ciclo de crecimiento; estos resultados tuvieron consecuencias a nivel fenotípico ya que las bacterias perdieron su toxicidad contra nematodos (Sheppard, y otros, 2016). Por lo tanto, existe evidencia de inestabilidad de ciertos plásmidos de *B. thuringiensis*, lo cual explicaría por qué dos de las cepas perdieron su característica de toxicidad contra *T. urticae*.

8.4 Curva de crecimiento microbiano de cepas de *Bacillus*

La Figura 6 muestra la curva de crecimiento para la cepa B y C, en ella, se observan comportamientos de crecimiento muy similares de las dos cepas. Evidenciándose una fase de

adaptación, seguida por una fase exponencial que comienza alrededor de las 2 horas, posteriormente, a las 5 horas, se observa un decaimiento de la absorbancia, el cual vuelve a incrementar, dando paso a una segunda fase exponencial, la misma que cambia a fase estacionaria alrededor de las 36h y continua hasta las 72 horas. En un inicio, se pensaba que el cambio en la absorbancia que se ve a las 5 horas podría ser producido por el comienzo de la esporulación; sin embargo, la microscopía demostró que a las 5 horas, no existía formación de endosporas, por lo tanto, no podría ser la razón de la baja de la absorbancia.

La presencia de una primera fase exponencial, seguida de una fase estacionaria pequeña y de una segunda fase exponencial, suele observarse cuando existe un cambio en la fuente de alimentación que está siendo utilizada por la bacteria, por ejemplo, el cambio de carbohidratos a proteínas o de una proteína más fácil de metabolizar a una un poco más complicada (Maier, Pepper, & Gerba, 2009) (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2010). En este caso, el medio T3, al ser un medio de esporulación, no contiene demasiados nutrientes, por lo que no existe fuente de carbohidratos; no obstante, presenta dos fuentes de proteína: la triptona y la triptosa. De estas dos, la triptona es un hidrolizado de caseína, mientras que la triptosa es un hidrolizado de varias proteínas (Neogen corporation, 2019). Por lo tanto, se podría interpretar que las bacterias utilizan primero la triptona por ser más fácil de digerir, y una vez que esta se acaba, pasan a ocupar la triptosa.

8.5 Ensayos de tiempo de crecimiento e incubación en frío

Los resultados de los ensayos de tiempo de crecimiento e incubación en frío presentados en la Figura 9, muestran una baja cantidad tanto de endosporas como de células vegetativas para las dos cepas con los tratamientos de 5 horas de crecimiento, lo cual indica que no existe una suficiente cantidad de células vegetativas que puedan producir suficientes endosporas al momento de colocar un tratamiento de estrés; razón por la cual, se decidió descartar al tiempo de 5 horas de crecimiento de los tratamientos que se realizarían para el posterior bioensayo.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las dos cepas entre los tratamientos con 4 y 8 días de tratamiento de estrés térmico a 4°C; por lo tanto, también se descartó el tiempo de 8 días de frío del posterior experimento.

Puesto que los tratamientos con 0 y 4 días de frío si mostraron diferencias significativas en las dos cepas, se planteó la pregunta de si serían necesarios 4 días de frío o si se podría disminuir el tiempo del tratamiento. Para responder la pregunta, se realizaron conteos de endosporas y células vegetativas con 1, 2 y 3 días de estrés térmico para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. No obstante, como se observa en la Figura 10, a pesar de que en la cepa B no se vieron diferencias significativas entre 3 y 4 días de tratamiento frío (lo que hubiera permitido disminuir el tiempo de tratamiento aún más); la cepa C si mostró diferencias significativas entre ambos días y debido a que las dos cepas debían seguir los mismos tratamientos para evaluar el efecto acaricida en los bioensayos; se decidió dejar el tiempo de refrigeración en 4 días.

Por el contrario, en los conteos de células vegetativas no se ve un patrón claro de presencia o ausencia de células y además, se obtuvieron resultados con una desviación estándar muy alta, lo cual podría explicarse por el hecho de que la técnica utilizada es semicuantitativa, por lo cual no es posible conocer de forma exacta y certera la cantidad de endosporas o células vegetativas presentes; sin embargo, es una técnica sencilla, rápida, barata y que utiliza pocos recursos, que permite comparar la presencia de muchas o pocas células o endosporas entre tratamientos. Si bien es cierto que lo más correcto sería evaluar la cantidad de endosporas y células por un medio cuantitativo como lo es la microscopía de campo oscuro en cámara de Petroff Hausser, no se contó con el equipo necesario para la realización de dicha técnica, por lo que se buscó una alternativa con los recursos que se tuvieron para la investigación. No obstante, en un estudio realizado por Hiraoka y otros (2015), se comparó el método de tinción de gota fresca con asa calibrada con el conteo en cámara de Petroff Hausser, y se concluyó que

los resultados obtenidos por las dos técnicas eran sumamente similares; por lo tanto, la utilización de esta metodología, no arrojaría resultados del todo alejados de los que serían obtenidos por el otro tipo de conteo ya mencionado.

Por otra parte, con este experimento se buscó determinar si los 12 días que se requerían para la obtención de los tratamientos eran realmente necesarios, puesto que tomando en cuenta que la producción de biopesticidas a base de *B. thuringiensis* ya es un proceso que se encuentra industrializado, es necesario acortar el tiempo de producción de los tratamientos lo más que sea posible para que pueda ser adaptado a la industria y que además, los costos de producción no sean tan altos (Parella & Van Lenteren, 1999).

Adicionalmente, con el ensayo se observó que la producción de endosporas con 72 horas de crecimiento, no aumentaba con el tratamiento con frío, puesto que con 72 horas de crecimiento, los nutrientes del medio se veían agotados, lo cual induce un estrés que provoca la esporulación de las bacterias. Sin embargo, se quería determinar si el tipo de tratamiento de estrés podría tener una relación con la producción de toxinas Cry con efecto acaricida, o si el solo hecho de que se produzcan endosporas y por ende cristales tóxicos es lo que importa para obtener un efecto acaricida, sin importar el tipo de estrés por el cual se llegue a la esporulación. Por lo tanto, se realizaron los bioensayos con los tratamientos de 36h de crecimiento con 0 horas de frío, 36 horas y 4 días; 72 horas y 0 días y 72 horas con 4 días para las dos cepas.

8.6 Pruebas de actividad acaricida con tratamientos térmicos (Bioensayos)

En el Anexo 8 se muestran conteos de endosporas y células vegetativas, los cuales se realizaron para comprobar si se mostraba la misma tendencia observada en la figura 9. Se observa que, tanto la cepa B como la C, presentan un número de endosporas estadísticamente menor en el tratamiento de 36 horas de crecimiento y 0 días de incubación en frío que en los tres tratamientos restantes. El hecho de que los resultados concuerden con los mostrados en la Figura los ensayos de tiempo de crecimiento e incubación en frío, demuestra que el método

empleado para el conteo de endosporas, es bueno para estimar diferencias en la cantidad de las mismas en cada tratamiento.

Por otro lado, los conteos de células vegetativas muestran la tendencia contraria a la observada con las endosporas para las dos cepas estudiadas, ya que el tratamiento que contiene una mayor cantidad de células es el de 36 horas de crecimiento y 0 días de incubación en frío. Estos resultados son coherentes puesto que cada célula vegetativa, cuando se presenta un estrés para la bacteria, empaqueta su material genético en endosporas, por lo que tiene sentido que en los demás tratamientos en los que existen más endosporas, la cantidad de células vegetativas disminuya (Xiaohui, y otros, 2012).

Adicionalmente, en la Figura 12 se observan los resultados de los bioensayos realizados con *T. urticae*, en ellos se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con 72 horas de crecimiento y 0 horas de frío, 72 horas de crecimiento y 4 días de frío y 36 horas de crecimiento y 4 días de frío, tanto para la cepa B como para la C, con el control positivo. También se observa un segundo grupo estadísticamente similar que comprende a los tratamientos con 36 horas y 0 días de tratamiento frío; que a pesar de si haber presentado un efecto tóxico para los ácaros; este es mucho menor que el presentado por el resto de tratamientos. Finalmente, el control negativo presentó una mortalidad muy baja, más que la dada por el ciclo natural de vida de *T. urticae*; con lo cual se comprueba que ningún componente del medio T3 es el que causa la toxicidad.

En base a los resultados de los conteos y bioensayos, es posible deducir que, independientemente del tipo de estrés que se coloque sobre las bacterias, lo que interesa para que los tratamientos tengan efectividad es la producción de endosporas. Esto concuerda con lo reportado en bibliografía que indica que la producción de las toxinas Cry se activa durante la fase de esporulación de las bacterias (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014). Por otra parte, los resultados también permiten interpretar que los metabolitos que son los que

presentan el efecto acaricida, son los producidos durante la fase de esporulación (Cry, Cyt), mas no metabolitos que se producen en la fase vegetativa de las células. Esto debido a que se observó un mayor efecto acaricida cuando existía un mayor número de endosporas.

Existe una gran variedad de toxinas producidas por *B. thuringiensis*, y a pesar de que las más conocidas en cuanto a efecto biopesticida son las endotoxinas Cry y Cyt; también se ha reportado efecto insecticida dado por exotoxinas que son producidas en la fase vegetativa de la célula tales como las toxinas Vip (Vegetative insecticidal proteins), Sip (Secreted insecticidal proteins) y a thuringiensina. El hecho de que no se haya encontrado toxicidad durante la fase vegetativa en este estudio, coincide con lo reportado hasta la fecha en cuanto a las exotoxinas producidas por Bt. Por un lado, no se ha encontrado un efecto tóxico de las toxinas Vip y Sip para *T. urticae*, sino que el efecto insecticida de estas toxinas ha sido observado solo en lepidópteros y coleópteros (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014).

Por el contrario, la thuringiensina si ha presentado efecto acaricida; no obstante, la toxicidad reportada fue mucho más marcada y rápida en individuos en los primeros estadios del desarrollo que en adultos; observándose mortalidad a los 7 días en larvas y ninfas, mientras que en adultos, el tiempo necesario para observar un efecto tóxico fue a los 12 días (Royalty, Hall, & Taylor, 1990). Puesto que los bioensayos del presente trabajo solo fueron realizados con ácaros adultos y que el tiempo de los mismos fue de 7 días, es lógico que no se haya observado ningún efecto en el tratamiento que contenía un mayor número de células vegetativas. Adicionalmente, es necesario recalcar que solo ciertas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen thuringiensina y al no conocer las cepas de Bt a las que los aislados B y C pertenecen, no es posible determinar si podría existir la producción de thuringiensina siquiera (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014) (Xiaoyan, y otros, 2014).

Por último, en la Figura 12 se puede apreciar el efecto de las toxinas Cry sobre los ácaros, puesto que estos presentan los daños característicos que producen estas endotoxinas. En los tratamientos con las cepas B y C y con el control +, se observan ácaros muertos y completamente deshidratados, mientras que el control – muestra un individuo vivo y con una apariencia hinchada saludable. La razón por la que los ácaros muertos se observan de ese modo tiene que ver con el modo de acción de las toxinas Cry; estas son prototoxinas que son activadas en el sistema digestivo de los insectos susceptibles por medio de proteasas; posteriormente, las toxinas se unen a receptores en las células intestinales y llevan a cabo la formación de un poro lítico que provoca un desequilibrio osmótico en el intestino, lo cual hace que los insectos dejen de alimentarse y finalmente mueran; al no poderse alimentar por días, se explica la apariencia deshidratada que presentan (Schnepf, y otros, 1998).

8.7 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía de barrido es una técnica que permite obtener imágenes de alta resolución de una muestra mediante las interacciones entre un haz de electrones que se barre a manera de pincel sobre la muestra, y los átomos de la muestra (Renau & Faura, 2001). Al momento en que los electrones chocan contra la muestra, estos pierden energía, lo cual puede causar que se desprendan otros electrones, conocidos como electrones secundarios, y los cuales son detectados por el equipo para producir la imagen (Ipohorski & Bozzano, 2013). Para que exista una correcta interacción con los átomos de la muestra, estas deben ser conductoras, caso contrario, no existirá el rebote de electrones secundarios que pueda ser captado por el equipo y como consecuencia, se dará una acumulación de electrones en la superficie de la muestra que no permita captar una imagen nítida y de buena calidad (Echlin, 2009) (Ipohorski & Bozzano, 2013). Como se observa en la Figura 13, la imagen presenta muchas áreas brillantes, que no permiten diferenciar por completo las estructuras observadas en la muestra, este es un rasgo característico de la acumulación de electrones ya que las muestras biológicas suelen ser no

conductivas. Para poder observar una muestra no conductiva mediante SEM, es necesario preparar las mismas con un recubrimiento de un material conductor como por ejemplo el oro (Echlin, 2009). Puesto que no se contaba con el material de recubrimiento, las muestras no pudieron ser tratadas adecuadamente, por lo que no se obtuvo una imagen muy clara.

La presente investigación permitió desarrollar un método relativamente sencillo y que no necesita de muchos recursos para poder establecer la efectividad de una cepa de *B. thuringiensis* para controlar *T. urticae*. Por lo tanto, podría utilizarse para realizar bioprospección de nuevas cepas que no hayan sido identificadas o que no se haya reportado efecto acaricida

CONCLUSIONES

- De las cuatro cepas estudiadas inicialmente, solo las cepas B y C presentaron un porcentaje de mortalidad de ácaros significativamente mayor al del control negativo.
- Las cepas B y C presentaron comportamientos muy similares durante la realización de curvas de crecimiento microbiano.
- Los tratamientos con 5 horas de crecimiento no produjeron altas cantidades de endosporas ni células vegetativas para ninguna de las dos cepas.
- Los tratamientos B36-4, B72-0, B72-4, C36-4, C72-0 y C72-4, presentaron altas cantidades de endosporas en los conteos, mientras que los tratamientos B36-0 y C36-0 produjeron una cantidad de endosporas estadísticamente menor.
- Los tratamientos B36-4, B72-0, B72-4, C36-4, C72-0 y C72-4, tuvieron una mortalidad de ácaros de entre el 70 y 85%, siendo mucho más efectivos que los tratamientos B36-0 y C36-0 que presentaron una mortalidad del 30%
- La mortalidad en ácaros viene dada por la formación de endosporas y por ende de cristales proteicos cuando las células son enfrentadas a condiciones de estrés, independientemente del tipo de estrés del que se trate.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una identificación molecular de las cepas B y C por medio de secuenciación del gen 16s rRNA.
- Comparar la metodología semicuantitativa de conteo de endosporas, con método cuantitativo como lo es el conteo en cámara Petroff-Hausser, para determinar si se obtienen resultados similares.
- Evaluar otros medios de crecimiento con mayor cantidad de nutrientes para tener un crecimiento más rápido de las cepas B y C, así como otros tratamientos de estrés que puedan disminuir aún más el tiempo necesario para la obtención de cristales y endosporas.
- Realizar bioensayos para determinar el efecto de los tratamientos en la ovoposición de los ácaros, así como el efecto sobre larvas y ninfas.
- Realizar una microscopía de barrido electrónico con un recubrimiento de oro para las muestras, de modo que se obtengan imágenes más claras

REFERENCIAS

- Aktar, M., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscipt Toxicol*, 1-12.
- Bayer AG. (2019). *Crop Sciece*. Obtenido de *Tetranychus urticae*:
<https://www.cropscience.bayer.com/en/crop-compendium/pests-diseases-weeds/pests/tetranychus-urticae>
- Bechtel, D. B., & Bulla, J. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol*, 127(14), 136-148.
- Bolland, H., Gutierrez, J., & Flechtmann, C. (1998). *World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae)*. Leiden, Netherlands: K. Brill.
- Bondada, B., Oosterhuis, D., Tugwell, N., & Kim, K. (1995). Physiological and cytological studies of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* K., injury in cotton. *Southwestern Entomologist*, 20(2), 171-180.
- Catañeda, E., & Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *NOVA*, 13(26), 53-65.
- Celso, C., Barbosa, C., Días, V., & Guilhermetti, M. (1998). Simplified Technique for Detection of Significant Bacteriuria by Microscopic Examination of Urine. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 36(3), 820-823.
- Centinkaya, F. (2002). Isolation of *Bacillus thuringiensis* and investigation of its Crystal protein genes. *Izmir Institute of Technology*.
- Coppel, H., & Mertins, J. (1977). *Biological insect pest suppression*. Berlín: Springer Verlag
- Cranshaw, W. (2009). *Bacillus thuringiensis*. *Insect series: Home and Garden*, 1-3.

- De Castro, T., Ausique, J., Nunes, D., Ibahnes, F., & Junior, I. (2001). Risk assessment of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* on the predatory mite *Euseius concordis*. *Experimental and applied acarology*, 59(4), 421-433.
- De Maagd, R., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 17, 193-199.
- Echlin, P. (2009). *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York: Springer.
- Flint, M., & Gouveia, P. (2001). IPM in Practice Principles and Methods of Integrated Pest. *Agriculture and Natural Resources* .
- García, D. (2011). *Caracterización del perfil protéico de una cepa entomopatógena de Bacillus pumilis*. Granada, España: Instituto de Biotecnología. Máster en Biotecnología.
- Hiraoka, M., Hida, Y., Mori, Y., Tsukahara, H., Ohshima, Y., Yoshida, H., & Mayumi, M. (2005). Quantitative unspun-urine microscopy as a quick, reliable examination for bacteriuria. *Scand Journal Clinical Laboratory Investigation*, 126-132.
- Iniesta, M. (1987). ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE PÉRDIDA DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pTG201 EN CELULAS DE *E. coli* LIBRES E INMOVILIZADAS. *Anales de Biología*, 14, 13-24.
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. (2013). MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LA CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES. *Ciencia e Investigación*, 63(3), 41-52.
- c
- Logan, N., & Berkele, R. (1984). Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *Microbiology*, 130, 1871-1872. doi:10.1099/00221287-130-7-1871

- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. (2010). *Brock Biology of microorganisms, 13th edition*. UK: Pearson Benjamin Cummings.
- Maier, R., Pepper, I., & Gerba, C. (2009). *Environmental Microbiology* (2 ed.). Elsevier.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.X0001-6>
- Méric, G., Mageiros, L., Pascoe, B., Woodcock, D., Mourkas, E., Lamble, S., . . . Sheppard, S. (2018). Lineage- specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. *Molecular ecology*, 27(7), 1524-1540. doi:10.1111/mec.14546
- Mota-Sanchez, D., & Wise, J. (2019). *The Arthropod Pesticide Resistance Database*.
Obtenido de Michigan State University: <http://www.pesticideresistance.org>
- Neogen Corporation. (2019). *Tryptone*.
- Neogen corporation. (2019). *Tryptose (7639)*.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6, 3296-3325.
doi:10.3390/toxins6123296
- Parella, M., & Van Lenteren, J. (1999). *Handbook of Biological Control*. California: Elsevier Inc.
- Porcar, M., Iriarte, J., Cosmao, V., Ferrandis, M., Lecadet, M., Ferré, J., & Caballero, P. (2001). Identification and characterization of the new *Bacillus thuringiensis* serovars pirenaica (serotype H57) and iberica (serotype H59). *Journal of Applied Microbiology*, 640-648.
- Portela, D., Chaparro, A., & López, S. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 11(20), 87-97.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, G. (2009). *Microbiología 3ra edición* . Madrid: McGrawHill.

- Rajashekhar, M., Shahanaz, S., & Kalia, V. (2017). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(5), 581-588.
- Renau, J., & Faura, M. (2001). *Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido*. Valencia: Centro de Investigación Hospital La Fe.
- Royalty, R., Hall, F., & Taylor, R. (1990). Effects of Thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) Mortality, Fecundity, and Feeding. *Journal of Economic Entomology*, 83(3), 792-798.
- Sadof, C., O'Neil, R., Heraux, F., & Wiedenmann, R. (2004). Reducing insecticide use in home gardens: effects of training and volunteer research on adoption of biological control. *HortTechnology*, Vol. 14, No. 1, 149-154.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., . . . Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol.*, 62, 775-806.
- Sheppard, A., Nakad, R., Saebelfeld, M., Masche, A., Dierking, K., & Schulenburg, H. (2016). High instability of a nematocidal Cry toxin plasmid in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 34-40.
- Soberón, M., & Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14(2), 303-314.
- Tapia, F., & Moreno, P. (2014). *FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE Bacillus thuringiensis var. kurstaki A NIVEL DE LABORATORIO*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Thieme, T., Heimbach, U., & Müller, A. (2010). *Chemical Control of Insect Pests and Insecticide Resistance in Oilseed Rape*. Dordrecht: Springer.

- Torres, E., & Fernandez, J. (2015). Control Biológico de ácaros plaga o través de Bacillus Thuringiensis. *Conexagro JDC*, 5(1), 58-73.
- Van Driesche, R., & Bellows, T. (1996). *Biological control*. New York: Chapman & Hall.
- Van Leewen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, W., & Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *T. urticae* and other important acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 563-572.
- Victoria State Government. (7 de 11 de 2019). *Agriculture Victoria*. Obtenido de Two spotted mite: <http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/pest-insects-and-mites/two-spotted-mite>
- Ware, G., & Whitacre, D. (2004). *The Pesticide Book (6th edition)*. Ohio: MeisterPro.
- Xiaohui, L., Xuezhi, D., Liqiu, X., Yunjun, S., Can, Y., & Jia, Y. (2012). Proteomic Analysis of Bacillus thuringiensis Strain 4.0718 at Different Growth Phases. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/798739
- Xiaoyan, L., Lifang, R., Donghai, P., Lin, L., Ming, S., & Ziniu, Y. (2014). Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from Bacillus thuringiensis with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects. *Toxins*, 6, 2229-2238.
doi:10.3390/toxins6082229
- Zhang, Z. (2003). *Mites of Greenhouses. Identification, Biology and Control*. Cambridge: CABI Publishing.

ANEXOS

Anexo 1. Receta medio T3 líquido

Ingredientes	Cantidad (1L)
Triptona	3g
Triptosa	2g
Extracto de levadura	1.5g
Fosfato de sodio	6.9g
MnCl	0,005g

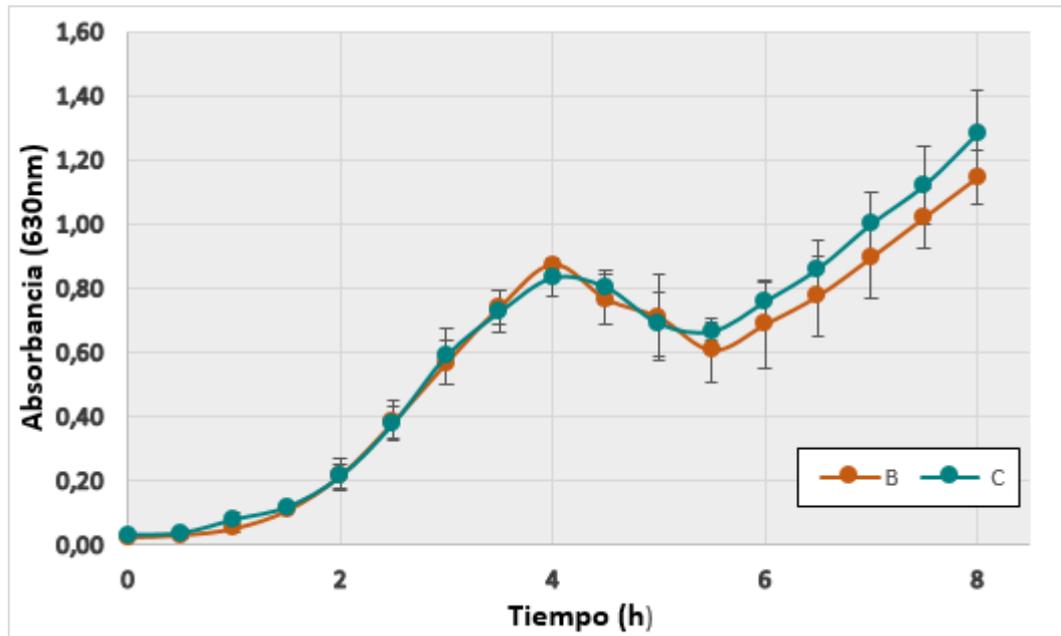
Anexo 2. Receta medio T3 sólido

Ingredientes	Cantidad (1L)
Triptona	3g
Triptosa	2g
Extracto de levadura	1.5g
Fosfato de sodio	6.9g
MnCl	0,005g
Agar	20g

Anexo 3. Datos Bioensayos preliminares

Tiempo (d)	Cepa	Mortalidad de ácaros (%)
0	B	0
3	B	56,7
5	B	66,7
7	B	76,7
0	C	0
3	C	26,7
5	C	33,3
7	C	63,3
0	I	0
3	I	0
5	I	0
7	I	6,7
0	P	0
3	P	0
5	P	0
7	P	3,3
0	C-	0
3	C-	0
5	C-	3,3
7	C-	3,3

Anexo 4. Curva de Crecimiento Microbiano 0-8h



Anexo 5. Datos absorbancia Curva de Crecimiento Microbiano

Cepa	tiempo de crecimiento (h)	Absorbancia 630nm
BTC	0	0,03
BTC	0,5	0,03
BTC	1	0,05
BTC	1,5	0,11
BTC	2	0,22
BTC	2,5	0,38
BTC	3	0,57
BTC	3,5	0,74
BTC	4	0,87
BTC	4,5	0,76
BTC	5	0,71
BTC	5,5	0,61
BTC	6	0,69
BTC	6,5	0,78
BTC	7	0,89
BTC	7,5	1,02
BTC	8	1,14
BTC	16	1,66
BTC	24	1,82
BTC	36	1,95
BTC	48	2,10

BTC	72	1,98
C2.4	0	0,03
C2.4	0,5	0,04
C2.4	1	0,08
C2.4	1,5	0,12
C2.4	2	0,21
C2.4	2,5	0,38
C2.4	3	0,59
C2.4	3,5	0,73
C2.4	4	0,83
C2.4	4,5	0,80
C2.4	5	0,69
C2.4	5,5	0,66
C2.4	6	0,76
C2.4	6,5	0,86
C2.4	7	1,00
C2.4	7,5	1,12
C2.4	8	1,28
C2.4	16	1,70
C2.4	24	1,88
C2.4	36	1,92
C2.4	48	2,07
C2.4	72	1,90

Anexo 6. Datos ensayos tiempo de crecimiento e incubación en frío

Cepa	Tiempo crecimiento (h)	Tiempo incubación frío (d)	Células vegetativas	Endosporas
BTC	36	1	200	52
BTC	36	1	265	106
BTC	36	1	148	51
BTC	72	1	38	130
BTC	72	1	85	119
BTC	72	1	26	216
BTC	36	2	90	56
BTC	36	2	106	50
BTC	36	2	90	64
BTC	72	2	56	202
BTC	72	2	84	140
BTC	72	2	53	168
BTC	36	3	235	128
BTC	36	3	405	153
BTC	36	3	265	134
BTC	72	3	162	156
BTC	72	3	39	260

BTC	72	3	36	234
BTC	5	4	48	30
BTC	5	4	24	7
BTC	5	4	26	4
BTC	36	4	236	157
BTC	36	4	272	179
BTC	36	4	250	167
BTC	72	4	81	163
BTC	72	4	82	184
BTC	72	4	49	124
C2.4	5	0	25	3
C2.4	5	0	40	4
C2.4	5	0	31	0
C2.4	36	0	343	70
C2.4	36	0	351	68
C2.4	36	0	314	60
C2.4	72	0	77	203
C2.4	72	0	43	243
C2.4	72	0	36	116
C2.4	72	2	31	130
C2.4	72	2	48	242
C2.4	72	2	44	186
C2.4	36	3	110	53
C2.4	36	3	106	23
C2.4	36	3	218	56
C2.4	72	3	25	181
C2.4	72	3	72	172
C2.4	72	3	68	143
C2.4	5	8	24	17
C2.4	5	8	10	13
C2.4	5	8	12	19
C2.4	36	8	213	103
C2.4	36	8	284	130
C2.4	36	8	264	146
C2.4	72	8	23	174
C2.4	72	8	11	117
C2.4	72	8	7	164

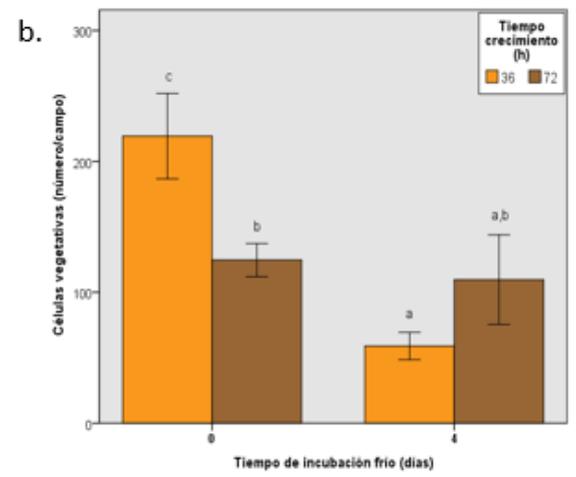
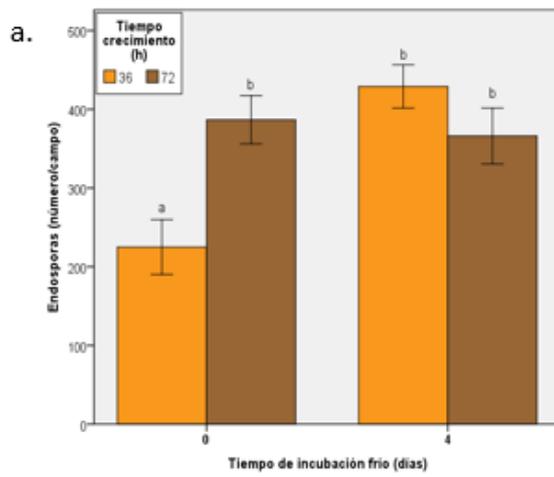
Anexo 7. Datos Bioensayos Finales

Tratamiento	Tiempo (Días)	Mortalidad (%)	desv. Estándar
B36-0	0	0	0
B36-0	3	28,5	5,7
B36-0	5	37,0	6,4

B36-0	7	39,2	5,6
B36-4	0	0	0
B36-4	3	64,3	7,1
B36-4	5	70,0	10,7
B36-4	7	80,3	5,4
B72-0	0	0	0
B72-0	3	79,0	7,2
B72-0	5	81,9	3,3
B72-0	7	84,4	3,9
B72-4	0	0	0
B72-4	3	69,6	6,4
B72-4	5	78,6	6,2
B72-4	7	81,9	3,3
C36-0	0	0	0
C36-0	3	30,2	7,2
C36-0	5	39,3	12,9
C36-0	7	39,3	12,9
C36-4	0	0	0
C36-4	3	64,3	7,1
C36-4	5	67,2	10,7
C36-4	7	80,1	8,3
C72-0	0	0	0
C72-0	3	72,2	13,4
C72-0	5	78,0	10,6
C72-0	7	84,0	4,4
C72-4	0	0	0
C72-4	3	65,8	8,0
C72-4	5	75,5	4,3
C72-4	7	77,5	6,0
E. coli	0	0,0	0,0
E. coli	3	0,0	0,0
E. coli	5	3,7	6,4
E. coli	7	3,7	6,4
Producto	0	0,0	0,0
Producto	3	85,5	8,7
Producto	5	90,3	2,1

Anexo 8. *Conteos de endosporas y células vegetativas comprobatorios bioensayos finales*

BTC



C2.4

