

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DEL ECUADOR

Escuela de Biología Aplicada

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
AGROBIOTECNÓLOGO

TEMA:

**“*BACILLUS SPP.* EN *TETRANYCHUS URTICAE* EN ROSAS
(*ROSA SPP.*) BAJO INVERNADERO Y SUS EVENTOS DE PATOGENICIDAD”**

AUTOR:

MARÍA ISABEL LARREA IZURIETA

DIRECTOR DE TESIS

ING. ANDREA ARCOS

QUITO, ECUADOR

2014

CERTIFICACIÓN

Yo, María Isabel Larrea Izurieta, con cédula de identidad N° 0604267765, declaro que soy el autor exclusivo de la presente investigación y que ésta es original, auténtica y personal mía. Todos los efectos académicos y legales que se desprenden de la presente investigación, serán de mi sola y exclusiva responsabilidad. Además, cedo los derechos de propiedad intelectual a la Universidad Internacional del Ecuador para que sea publicado y divulgado en internet.

María Isabel Larrea Izurieta

Yo, Andrea Elizabeth Arcos Andrade, con cédula de identidad N° 1720871019, declaro que, en lo que yo personalmente conozco, la Srta. María Isabel Larrea Izurieta, es el autor exclusivo de la presente investigación y que ésta es original, auténtica y personal.

Ing. Andrea Arcos Andrade

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por guiarme y darme fuerza para enfrentar cada cosa que se presenta. A mi papá Carlitos y mi mamá Negrita por ser mi ejemplo, fortaleza y apoyo incondicional. A mis hermanos Carlos y Jorge, y mis sobrinas Ma. Victoria y Ma. Eduarda que con todo su apoyo y ocurrencias me han alegrado cada momento. A mi novio Javier que ha sido un gran apoyo para mí en las buenas y en las malas durante toda esta etapa. A mí cuñada Ma. Isabel, mi mejor amiga Marijo y mi mama Nachi por alentarme y apoyarme siempre. Tía Ani por su apoyo incondicional al igual que mis primas Chinita y Marcia. A mis abuelitas, tíos, tías, primos, primas, amigas y amigos, por cada uno de esos momentos compartidos y por apoyarme.

Un agradecimiento especial al Dr. Carlos Falconí (Gerente General de Plantsphere Laboratories) por sus consejos, apoyo y por transmitirme sus conocimientos, al igual que el Dr. Esteban Terneus (Director de la Escuela de Biología), Ing. Emilia Vásquez y MSc. Andrea Dávalos, personas dignas de admiración. A la Ing. Andrea Arcos, por sus consejos y apoyo incondicional durante la elaboración de este trabajo. A mis lectoras Dra. Damarys García y Dra. Aída Álvarez, y cada uno de mis profesores de la UIDE, por sus enseñanzas, comentarios y sugerencias, especialmente a Pablo Salvador.

De igual manera un agradecimiento especial a cada una de las personas que fueron parte tanto al inicio como en la culminación de este proyecto, Ing. Raúl Camacho, Ing. Rigoberto Mancheno, MSc. Sebastián Robalino, Tía Rachi, Alejandro Alvear, Priscila Merino, Cristina Troya, Florícola Naranjo Roses S.A. sobre todo al Ing. Enrique León y Edison Tipantuña.

Además quiero agradecer a cada una de las personas que han sido parte de mi crecimiento y formación en esta etapa, mis amigos del colegio, universidad y miembros de la empresa Biocontrol Science.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Carlos y Eulalia, a mis hermanos Carlos y Jorge, a mis sobrinitas M. Victoria y M. Eduarda, y mi novio Javier; porque son mis héroes, mi motor fundamental y parte esencial de mi vida. A mi cuñada María Isabel, que es como mi hermana, a toda mi familia y amigos que siempre me han brindado su confianza y apoyo incondicional para seguir adelante, por todos los momentos compartidos para fortalecerme y enriquecerme, porque cada momento juntos ha sido la mejor muestra de saber que tu familia nunca te abandona.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO II.....	6
METODOLOGÍA.....	6
2.1 Área de Estudio.....	6
2.2 Manejo de muestras.....	6
2.3 Fase de campo.....	7
2.4 Fase de laboratorio.....	8
2.4.1 Cámaras de atmósfera modificada.....	8
2.4.2 Identificación de estadios.....	9
2.4.2 Aislamiento de <i>Tetranychus urticae</i>	10
2.4.3 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus</i> spp.....	11
2.4.4 Pruebas bioquímicas.....	13
2.4.5 Patogenicidad.....	17
2.4.6 Postulados de Koch.....	22
2.5 Análisis de datos.....	22

CAPÍTULO III	24
MARCO TEÓRICO	24
3.1 Control biológico	24
3.1.1 Tipos de control biológico	25
3.1.2 Consideraciones importantes	26
3.2 <i>Bacillus</i> spp.....	27
3.2.1 Clasificación taxonómica.....	27
3.2.2 Generalidades	27
3.2.3 <i>Bacillus</i> utilizados en la agricultura.....	29
3.3 <i>Tetranychus urticae</i>	32
3.3.1 Generalidades	32
3.3.2 Clasificación taxonómica.....	32
3.3.3 Ciclo de vida	33
3.3.4 Alimentación.....	35
3.3.5 Características morfológicas.....	35
3.3.6 Daños	38
3.4 Postulados de Koch.....	38
3.5 Efectores biocatalíticos	40
3.6 Tinción de Gram	41
3.7 Pruebas bioquímicas	42
3.7.1 Prueba de la catalasa	43
3.7.2 Fermentación en Agar Hierro Triple Azúcar	43
3.7.3 Voges Proskaur	44
3.7.4 Hidrólisis del almidón.....	44
3.8 Medios de cultivo	44
3.8.1 Agar Nutritivo.....	45

3.8.2 Agar Hierro Triple Azúcar.....	46
3.8.3 MR-VP Broth.....	47
3.8.4 Agar de Almidón	48
3.9 Citohistoquímica.....	48
CAPÍTULO IV	50
RESULTADOS	50
CAPÍTULO V	59
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	62
LITERATURA CITADA.....	63
APÉNDICES	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Florícola Naranjo Roses S.A., Cotopaxi - Ecuador	7
Figura 2. Plantsphere Laboratories (PSL), Pichincha - Ecuador.....	7
Figura 3. Foco de infección 3 (F3) de la variedad Freedom. a) Tercio superior (Ts), b) Tercio medio (Tm) y c) Tercio bajo (Tb).	8
Figura 4. Cámara de atmósfera modificada en donde se observa la disposición de las hojas de rosas de la variedad Freedom con el envés hacia abajo	9
Figura 5. Diferentes estadios de <i>Tetranychus urticae</i> . a) huevo, b) larva, c) protoninfa, d) deutoninfa, e) adulto hembra, f) adulto macho.	10
Figura 6. a) Reverso de la caja Petri con individuos de <i>T. urticae</i> en la que se observa la nomenclatura de los estadios (H: huevo, L: larva, P: protoninfa, D: deutoninfa, A: adulto hembra, M: adulto macho). b) Anverso de la caja Petri en donde se observa el crecimiento	

de microorganismos en cada uno de los individuos de <i>T. urticae</i> sembrados en medio de cultivo.	11
Figura 7. a) Presencia de colonia con bordes irregulares, color blanco mate, aspecto ceroso brillante, originario de un huevo de <i>Tetranychus urticae</i> . b) Colonia con características de <i>Bacillus</i> purificada en PDA.....	12
Figura 8. Tinción Gram. a) <i>Bacillus</i> Gram+ por su forma de bastón y coloración morada oscura (Cepa PSL 114). b) <i>Bacillus</i> Gram- por su forma de bastón y coloración rosada (Cepa PSL 103).	12
Figura 9. Prueba de la catalasa positiva de <i>Bacillus</i> spp. Cepa PSL 101.	13
Figura 10. (a) Medio de cultivo original (TSI) tubo izquierdo, tubo derecho presencia de oxígeno y fermentación de la glucosa y lactosa (Cepa PSL 100). (b) Medio de cultivo original (TSI) tubo izquierdo, tubo derecho presencia de oxígeno y fermentación de la glucosa (Cepa PSL 114).	15
Figura 11. a) Testigo con medio de cultivo RM/VP; b) Colocado α -naftol y KOH al 40%, después de 20 minutos se observa que la prueba fue positiva ya que el caldo se tornó de color rojo (Cepa PSL 113).	16
Figura 12. Prueba de la hidrólisis, se observa la formación de un halo alrededor de las gotas de lugol, lo cual demuestra que la prueba es positiva (cepa PSL 112).	17
Figura 13. a) Corte en cuadrados pequeños del PDA en el que creció una de las cepas. b) Obtención de la solución madre de una de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	18
Figura 14. Aplicación de una de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en el haz de la hoja de rosa afectada con <i>T. urticae</i>	19
Figura 15. Presencia de colonias de <i>Bacillus</i> spp. en los individuos de <i>T. urticae</i> aislados en PDA del tratamiento con la cepa PSL 101. (H: huevo, L: larva, P: protoninfa, D: deutoninfa, A: adulto hembra, M: adulto macho)	20
Figura 16. Portaobjetos con 3 gotas del reactivo PSL-CHQ 127 reposando a temperatura ambiente	21
Figura 17. Hembras de <i>T. urticae</i> observadas después de 12 días de haber aplicado el tratamiento. a) Presenta irregularidad en la pared externa del abdomen por causa de la	

actividad de la cepa PSL 104. b) Pared externa normal del abdomen. c) Irregularidad en la pared externa de la cutícula y tejido dañado en el tarso y la tibia de la pata III por causa de la cepa PSL 107. d) Pata III sin irregularidades.	21
Figura 18. Cultivo de <i>B. thuringiensis</i> (CVCM 1813), en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de fases a 1000X.....	29
Figura 19. Colonias de <i>B. subtilis</i> en agar sangre de cordero al 5%, incubadas a 35°C durante 24horas	30
Figura 20. Colonias de <i>B. thuringiensis</i> en agar sangre de cordero al 5%, incubadas a 35°C durante 24horas	32
Figura 21. Ciclo de vida <i>T. urticae</i>	34
Figura 22. Vista dorsal (A), ventral (B), palpo (C) de <i>Tetranychus urticae</i> , (D) vista lateral de la pata y de sus segmentos (1,2,3,4,5,6)	36
Figura 23. Vista dorsal y ventral del gnathosoma de Tetranychidae	38
Figura 24. Preparacion de frotis para la tinción	41
Figura 25. Análisis de componentes principales (PCA) según la patogenicidad de los diferentes tratamientos en el gnathosoma, prodorsum, opistosoma y patas de hembras de <i>T. urticae</i> en los componentes 1 y 2.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades del medio de cultivo agar nutritivo	45
Tabla 2. Propiedades del medio de cultivo agar hierro triple azúcar.....	46
Tabla 3. Propiedades del medio de cultivo MR/VP Broth	47
Tabla 4. Propiedades del medio de cultivo agar de almidón	48
Tabla 5. ANOVA (Analysis of variance) y comparaciones múltiples entre tercios (Tercio superior (Ts), Tercio medio (Tm), Tercio bajo (Tb)) según el número de individuos...	51
Tabla 6. Individuos de <i>T. urticae</i> distribuidos por tercio en cada uno de los focos de infección.	52

Tabla 7. Porcentaje total de los diferentes estadios de <i>T. urticae</i> presentes en cada uno de los tercios.....	53
Tabla 8. Número de colonias con características de <i>Bacillus</i> spp. presentes en cada uno de los focos de infección, en los diferentes tercios y estadios.....	54
Tabla 9. Reacción positiva y negativa de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. frente a la tinción de Gram y pruebas bioquímicas	55
Tabla 10. Número de colonias por ml y determinación de UFC/ml de cada tratamiento aplicado.....	56
Tabla 11. Extracción de análisis de componentes principales.....	57

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Detalle del número de individuos de cada uno de los focos de infección (F1, F2, F3, F4, F5, F6) por estadios encontrados en cada uno de los tercios: superior (Ts), medio (Tm) y bajo (Tb) de la variedad de rosa Freedom.....	74
Apéndice 2. Cepas con características de <i>Bacillus</i> spp. aisladas a partir de <i>Tetranychus urticae</i> en PDA después de 48 horas.....	75
Apéndice 3. Fotos de Tinción Gram de cada una de las cepas. Los Bacilos de color morado determinan que las bacterias son Gram +, mientras que los Bacilos que presentan sus paredes de color rosado son bacterias Gram -.....	76
Apéndice 4. Prueba de la catalasa de cada una de las cepas. La presencia de burbujas determina que la prueba es positiva.....	77
Apéndice 5. Prueba de la hidrólisis de almidón de cada una de las cepas. La formación de un halo transparente alrededor de las gotas determina que la prueba es positiva.....	78
Apéndice 6. Prueba de Voges Proskauer. El cambio del medio de color amarillo (tubo izquierdo) a rojo-fucsia determina que la prueba es positiva.....	79

Apéndice 7. Prueba de la fermentación de la glucosa (pico de flauta rojo y fondo amarillo); glucosa, lactosa y/o sacarosa (pico de flauta amarillo y fondo amarillo); producción de gas de cada una de las cepas (ruptura del medio y/o producción de burbujas). Tubo de color rojo es el color del medio original.....	80
Apéndice 8. Patogenicidad en hembras adultas de <i>T. urticae</i>	82

RESUMEN

Una de las especies de ácaros que producen considerables pérdidas cualitativas y cuantitativas en el cultivo de rosas es *Tetranychus urticae*. El control con agroquímicos convencionales no es efectivo; por lo cual se busca identificar cepas de *Bacillus* spp. mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas y determinar escenarios anatómicos patogénicos de *Bacillus* spp. a partir de *T. urticae* como Efectores Biocatalíticos (EBc[®]) para el control de dicha plaga. La fase de campo se realizó en un cultivo de rosas bajo condiciones orgánicas en la florícola Naranjo Roses S.A. en Latacunga, en donde se recolectaron 15 hojas de cada tercio de seis plantas con presencia de *T. urticae*, las muestras fueron trasladadas al laboratorio Plantsphere Laboratories (PSL), Quito, en donde se las procesaron. Se identificaron y cuantificaron los diferentes estadios de la plaga, se aislaron individuos para determinar la presencia de cepas patogénicas de *Bacillus* spp., las cepas encontradas fueron aisladas, purificadas e identificadas mediante tinción de Gram y cuatro pruebas bioquímicas. Los tratamientos aplicados fueron las cepas, agua destilada (testigo) y Biosan[®] con lo que se determinó los eventos de patogenicidad en hembras adultas de *T. urticae* mediante citohistoquímica. Como resultado se determinó que el mayor número de individuos plaga se encuentran en el tercio bajo (59,4%) y en relación a los estadios existe mayor presencia de huevos (63,3%); se identificó 15 cepas de *Bacillus* spp. y el número de UFC/ml de las mismas, finalmente se observó la ruptura de las paredes externas, precipitación de contenido celular, etc. como eventos patogénicos de los tratamientos. Mediante análisis de componentes principales (PCA) se determinó que de los 17 tratamientos aplicados, los más eficientes como EBc[®] fueron las cepas PSL 104, PSL 113, PSL 114 y BIOSAN[®], mientras que los tratamientos que no presentaron ningún escenario patogénico en la plaga fueron PSL 102 y el testigo, determinándose que a pesar de que todas las cepas fueron aisladas de un mismo bloque no todas actúan patogénicamente de forma similar.

Palabras clave: *Bacillus* spp., *Tetranychus urticae*, patogenicidad, Efectores Biocatalíticos (EBc[®]), citohistoquímica.

ABSTRACT

One species of mites that cause considerable qualitative and quantitative losses in growing roses is *Tetranychus urticae*. Agrochemical conventional control is not effective; therefore it seeks to identify strains of *Bacillus spp.* by Gram Staining, biochemical tests and determine pathogenic anatomical *Bacillus spp.* scenarios from *T. urticae* as Biocatalytic Effectors (EBc[®]) to control this pest. The field work was conducted in a rose crop under organic conditions in the flower Naranjo Roses S.A. Latacunga, where 15 leaves of each third of six plants with presence of *T. urticae* were collected, the samples were transported to the laboratory Plantsphere Laboratories (PSL), Quito, where the process was carried out. They were identified and quantified the different stages of the pest, some individuals were isolated for the presence of pathogenic strains of *Bacillus spp.* Encountered strains were isolated, purified and identified by Gram Staining and four types of Biochemical Testing. The applied treatments were strains encountered, distilled water (witness) and thus Biosan[®] events pathogenicity in adult females of *T. urticae* was determined by citohistochemistry. As a final result it was determined that the largest number of pest individuals are in the lowest third (59.4%) and in relation to the stages there is a greater presence of eggs (63.3%); 15 strains of *Bacillus spp.* was identified as its number of CFU/ml, finally the outer walls rupture, precipitation of cellular contents, etc. was observed as treatments pathogenic events. Through principal component analysis (PCA) was determined that of the 17 treatments applied, the most efficient as EBc[®] were PSL 104, PSL 113, PSL 114 and BIOSAN[®], while treatments that showed no pathogenic scenario in the plague were PSL 102 and the witness, determining that although all strains were isolated from one place not all pathogenically act in similar way.

Key words: *Bacillus spp.*, *Tetranychus urticae*, pathogenicity, Biocatalytic Effectors (EBc[®]), citohistochemistry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Existen aproximadamente 1500 microorganismos que poseen propiedades insecticidas, acaricidas, nematocidas, entre otros. El uso potencial de éstos se debe a su alta especificidad afectando a las plagas sin causar daño ecológico al resto del sistema al cual pertenecen (Niedmann y Meza, 2006).

El control biológico de plagas requiere una comprensión de la dinámica de poblaciones e interacciones hospedero – parásito. El uso de microorganismos causantes de alteraciones fisiológicas, funcionales, anatómicas y enfermedades en general, originadas en artrópodos es una manera de control biológico o de regulación de poblaciones, ya que bacterias, virus, protozoos u hongos denominados entomopatógenos, son una alternativa para el manejo integrado de plagas importantes en agricultura. A diferencia de los plaguicidas químicos convencionales el control biológico tiene un menor impacto ecológico, siendo las bacterias los organismos más utilizados y dentro de este grupo el uso de *Bacillus* considerado como el principal agente de control biológico de lepidópteros, dípteros, coleópteros y arácnidos. Este bacilo es un patógeno de invertebrados muy versátil, posee una amplia gama de mecanismos de acción. Está comprobado que ciertas variedades de *Bacillus* no tienen efecto sobre otros insectos benéficos, animales domésticos o plantas (Flores et al., 2011; Cory y Franklin, 2012).

Una de las familias de bacterias con mayor actividad bioquímica es la familia Bacillaceae, a la cual pertenece el género *Bacillus*, estos pueden ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos, son gram positivos, presentan flagelos laterales los cuales les ayuda a su movilidad. Los *Bacillus* son encontrados fácilmente en el suelo, aire, agua, plantas, etc., algunas variedades presentan cristales con propiedades insecticidas y nematocidas (Veitía et al., 2003; Layton et al., 2011).

En la economía del Ecuador, el cultivo de rosas ha sido de gran importancia desde la década de los 80, cuando se inició con auge la exportación de las mismas (Vásquez,

2014). Según la Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones (2013) el sector florícola es una industria de gran importancia en varios países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, donde se menciona, las flores ecuatorianas están consideradas entre las mejores del mundo, y donde se cultiva más de 300 variedades de rosas.

1.1 Antecedentes

Según Cerna et al. (2009), *T. urticae* es un ácaro conocido comúnmente como araña de dos manchas o araña roja, y se la considera como una de las especies que ocasiona mayor perjuicio en la agricultura a nivel mundial. Para su control se utiliza principalmente agroquímicos, que con el paso del tiempo resultan menos efectivos debido a la resistencia que produce la plaga. En la mayoría de las regiones donde se cultiva rosas bajo invernadero *Tetranychus urticae* se ha convertido en una plaga difícil de controlar y los daños producidos se han incrementado de forma progresiva. Este ácaro genera pérdidas en la calidad de la flor, disminución en el crecimiento de las plantas y reduce la producción de los botones (Rojas et al., 2011).

Plantsphere Laboratories (PSL) apoya esta investigación y busca aislar cepas de *Bacillus* spp. a partir de la *Tetranychus urticae* para controlar plagas de ácaros de manera más limpia. Al igual que la Florícola Naranja Roses S.A. busca alternativas para una producción más sana de rosas.

Durante la Revolución Verde se crearon y aplicaron plaguicidas químicos para combatir una gran variedad de plagas, evitando una disminución significativa en cantidad y calidad de los insumos alimenticios, convirtiéndose la producción agropecuaria en una de las pocas actividades en la cual se descarga deliberadamente productos químicos al medio ambiente (Ongley, 1997).

El uso irracional de químicos agrícolas ha ido afectando tanto al ecosistema como a la salud de los seres humanos, en los cuales se observa una gran cantidad de enfermedades como cáncer, intoxicaciones, alteraciones genéticas, esterilidad, alergias,

entre otras; tanto plagas como enfermedades y malezas han ido creando resistencia y cada vez son más abundantes (Ramón y Rodas, 2007). Algunos de los efectos en los ecosistemas, se debe a que los agroquímicos incrementan la salinidad del suelo, además del agotamiento del mismo; causando que la producción y rendimiento cada vez sea menor y una potencial disminución de biodiversidad (Quezada et al, 2005). Torres y Capote (2004) reportan que un alto porcentaje de los plaguicidas aplicados se pierde en el ambiente contaminando el suelo, agua y biota ya que solo el 0,1 % llega a la plaga.

La eficacia demostrada por *Bacillus* como bioplaguicida ha incentivado a varios autores desde años atrás a evaluar su efecto sobre diferentes plagas. Tal es el caso de Sauka y Benintende (2008) que estudiaron las generalidades, el mecanismo de acción y la genética de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* relacionados con el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Tamez et al. en el 2005 en México y Flores et al. (2011a) en Perú identificaron cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para evaluar su potencial entomotóxico para el control biológico de lepidópteros y coleópteros principalmente plagas como *Spodoptera frugiperda* que afecta al maíz. En el 2003, Veitía et al. evaluaron cepas de *Bacillus thuringiensis* en el control del ácaro *Eriophyes tulipae* en el cultivo del ajo, siendo la cepa 13 la mejor para el control de la plaga.

En el 2014, Trevisoli et al., realizaron estudios sobre la compatibilidad de insecticidas, acaricidas y *Bacillus thuringiensis* utilizados tanto en el control de *Tetranychus urticae* como en *Heliothis virescens* en campos de algodón. Sá en el 2012 realizó un estudio sobre la optimización de control biológico de *Tetranychus urticae* en clementinos, España mediante la utilización de *Phytoseiulus persimilis*.

White et al. en el 2012 describen algunos criterios sobre el uso de agentes de control biológico vs. el control químico en plagas específicas y enfermedades en cultivos bajo invernadero, en el cual mencionan la utilización de *Bacillus subtilis* para el control de ácaros, en el cual realizan una comparación entre la aplicación química y biológica, siendo la última la de mejor resultado. Lozada (2011) evaluó dos productos orgánicos (Biosan® y Tarssus) para el control de *Tetranychus urticae* en el cultivo de fresa. Uno de

los componentes de formulación de Biosan® son metabolitos microbianos de *Bacillus thuringiensis*, dicho producto en la evaluación fue el que produjo mejores resultados, en donde se reportó el menor grado de infestación de la plaga a los 60 días.

1.2 Justificación

Los resultados obtenidos a nivel de campo para el control de diferentes plagas mediante la utilización de *Bacillus*, constituyen un estímulo para realizar estudios especialmente para el control de *Tetranychus urticae* mediante la utilización de *Bacillus* spp. ya que los estudios relacionados a esta investigación son escasos.

Los efectos perjudiciales que han demostrado tener los agroquímicos tanto para el ambiente como para la salud humana, justifican buscar y aplicar técnicas agrícolas que sean amigables con el medio (agroecología) como el control biológico, con la utilización de entomopatógenos contra *Tetranychus urticae* para evitar los efectos negativos causados, y así recuperar la productividad del suelo y disminución de la contaminación provocada con prácticas agrícolas tradicionales; además la exportación de rosas es una importante fuente de ingresos económicos para el Ecuador.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Aislar cepas de *Bacillus* spp. a partir de *Tetranychus urticae* de rosas bajo invernadero y determinar eventos de patogenicidad.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar cepas de *Bacillus* spp. mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas.
- Determinar escenarios anatómicos patogénicos de *Bacillus* spp. a partir de *Tetranychus urticae*.

CAPÍTULO II

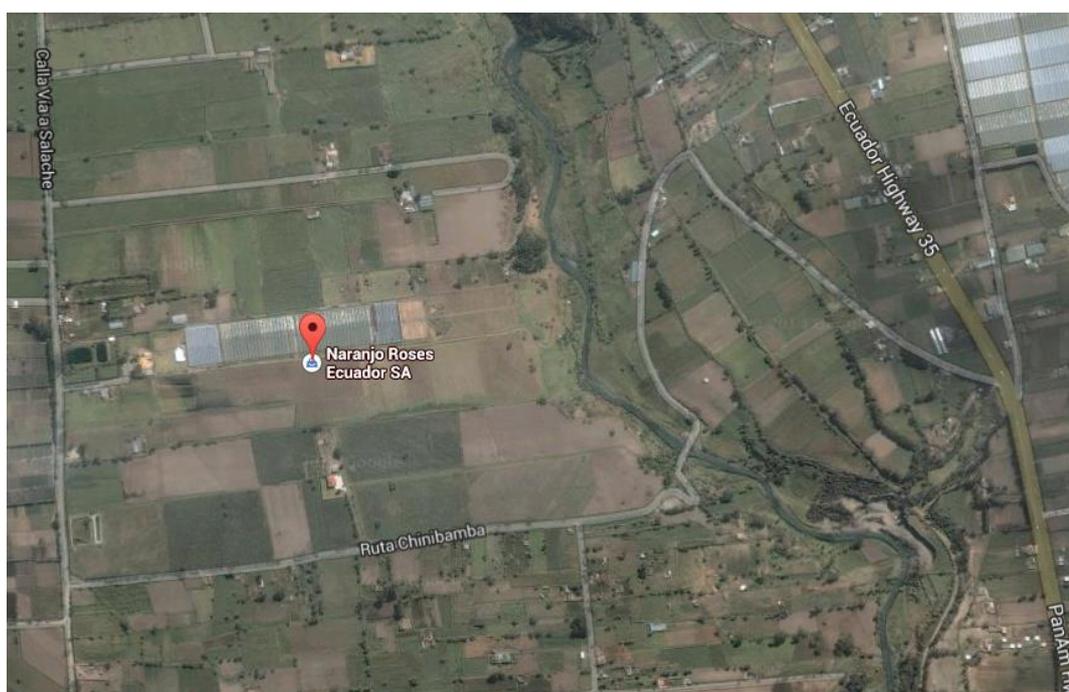
METODOLOGÍA

2.1 Área de Estudio

La florícola Naranjo Roses Ecuador S.A. está ubicada a $0^{\circ}59'46.44''$ de latitud sur y a $78^{\circ}36'23.52''$ de longitud oeste en Salache, Latacunga, provincia de Cotopaxi, región Sierra, su altitud es de 2747 msnm, con una temperatura promedio de 14°C (Figura 1).

2.2 Manejo de muestras

Las muestras de ácaros fueron recolectadas en plantas de rosas, variedad freedom que presentaban la afección de *Tetranychus urticae* y en las que no fue aplicado ningún tipo de acaricida. La fase de laboratorio se realizó en Plantsphere Laboratories (PSL), ubicado en Bellavista de Carretas Psje. N75B y Gonzalo Correa, Quito, provincia Pichincha, región Sierra (Figura 2).



(2013), en la cuál se determina que es una muestra representativa por la cantidad de individuos plaga presentes en las hojas en los diferentes tercios.

Las hojas colectadas fueron colocadas en fundas plásticas sin evacuar el aire, en las cuales se procuraba mantener una atmósfera física de oxígeno, con el objeto de conservar intactas las muestras biológicas. Además fueron cuidadosamente bien cerradas y debidamente etiquetadas para ser transportadas al laboratorio. Finalmente fueron colocadas en un recipiente grande de plástico con tapa evitando que éstas se aplasten, esta metodología fue adaptada de Falconí-Borja, 2013.



Figura 3. Foco de infección 3 (F3) de la variedad Freedom. a) Tercio superior (Ts), b) Tercio medio (Tm) y c) Tercio bajo (Tb).

2.4 Fase de laboratorio

2.4.1 Cámaras de atmósfera modificada

Se utilizaron 18 cajas plásticas con tapa, las cuales fueron cuidadosamente desinfectadas con alcohol, en la base se colocó papel de cocina y éste fue humedecido con agua destilada estéril. Cada una de las cajas fue etiquetada con el código referente al

foco de infección (F1, F2, F3, F4, F5, F6), tercio al que pertenece: superior (Ts), medio (Tm) o bajo (Tb); además de la fecha y la variedad de la rosa. En cada una de las cajas se colocó las hojas recolectadas con el envés hacia abajo (Figura 4). Las cámaras fueron ubicadas en un lugar claro, no expuestas directamente al sol (Falconí-Borja, 2013).



Figura 4. Cámara de atmósfera modificada en donde se observa la disposición de las hojas de rosas de la variedad Freedom con el envés hacia abajo.

2.4.2 Identificación de estadios

Esta fase de la investigación se realizó con ciertas modificaciones de la metodología propuesta por Falconí-Borja (2013).

Mediante un estereomicroscopio se observó cada una de las hojas y se identificó y cuantificó los diferentes estadios de los ácaros (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa, hembra y macho) (Figura 5).

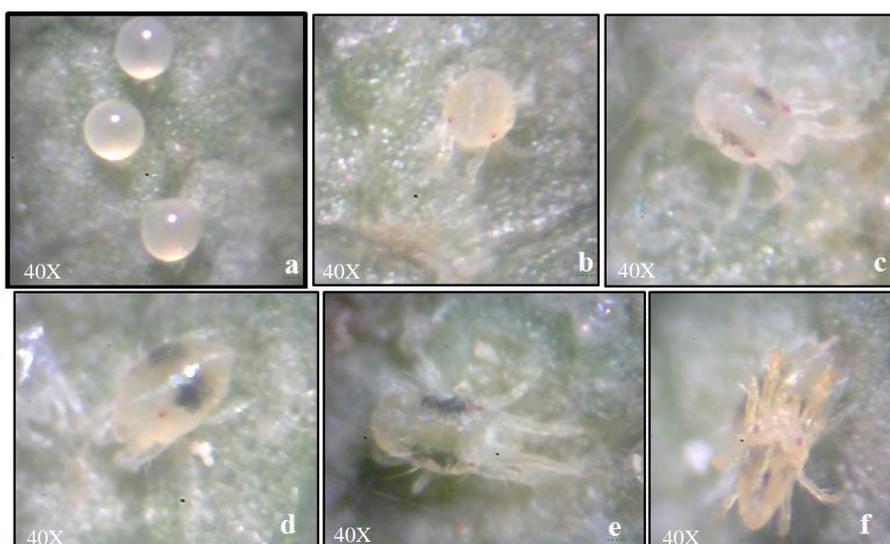


Figura 5. Diferentes estadios de *Tetranychus urticae*. a) huevo, b) larva, c) protoninfa, d) deutoninfa, e) adulto hembra, f) adulto macho.

A medida que se realizaba el conteo se consideró la presencia de posibles patógenos que se podían evidenciar en los ácaros, los cuales se manifestaban en forma de necrosis, tumoraciones, lisis, precipitación de fluidos, disolución de tejido.

2.4.2 Aislamiento de *Tetranychus urticae*

La metodología descrita a continuación fue adaptada del protocolo utilizado por Falconí-Borja (2013); en donde se prepararon 18 cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), como medio básico, para colocar 20 ácaros por caja y de esta forma obtener 360 individuos. Se utilizó una caja Petri por cámara húmeda, en donde se obtuvo un total de 18 cajas entre los dos muestreos.

Si un individuo presentaba algún tipo de patología debidamente verificado mediante la observación por estereomicroscopio (20X, 40X), este se aislaba y se lo colocaba directamente en PDA. No obstante debido a que no todos los individuos presentaban algún tipo de patología, se aisló al azar cuatro huevos, cuatro larvas, cuatro protoninfas, cuatro deutoninfas y cuatro adultos (hembras y machos), por cada uno de los niveles. Cada una de las cajas Petri fue etiquetada con el código y la fecha de aislamiento,

además en la base se escribió un código para saber el estadio: H (Huevo), L (Larva), P (Protoninfa), D (Deutoninfa), A (Hembra), M (Macho) (Figura 6a). Las cajas Petri fueron incubadas a 28°C por 72 horas, las mismas fueron observadas a diario para identificar algún tipo de patología, principalmente si era originada por las características patológicas de una bacteria (Figura 6b).

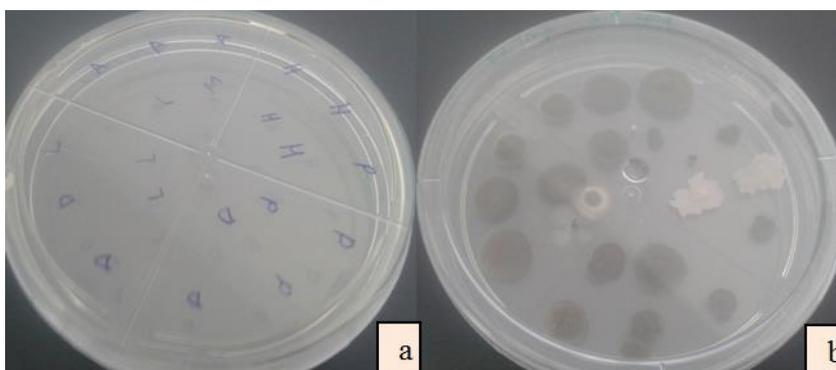


Figura 6. a) Reverso de la caja Petri con individuos de *T. urticae* en la que se observa la nomenclatura de los estadios (H: huevo, L: larva, P: protoninfa, D: deutoninfa, A: adulto hembra, M: adulto macho). b) Anverso de la caja Petri en donde se observa el crecimiento de microorganismos en cada uno de los individuos de *T. urticae* sembrados en medio de cultivo.

2.4.3 Aislamiento e identificación de *Bacillus* spp.

La caracterización de bacterias gram positivas tipo *Bacillus* spp., se llevó a cabo por medio de la capacidad de mostrar en placas de Petri el crecimiento de alguna colonia típica para este tipo de bacteria. La cual presentaba bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, aspecto harinoso, ceroso, seco o cremoso como lo demuestra la Figura 7a, ésta era aislada en una nueva caja Petri con PDA, para su purificación y luego fueron etiquetadas con números y nombradas como cepas o aislados al no poder diferenciar una de la otra, se incubó a 28°C y se observó a diario durante un periodo de 5 días para

determinar que no haya contaminación (Figura 7b). Posteriormente se realizó tinción de Gram para determinar que sea una bacteria Gram+ (Carrera, 2009).

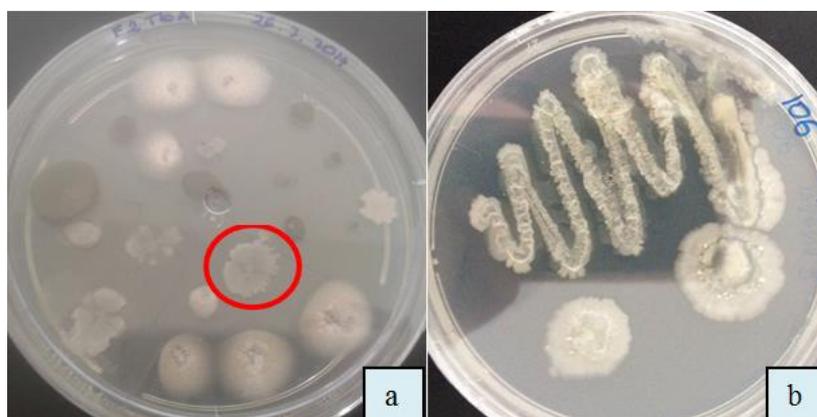


Figura 7. a) Presencia de colonia con bordes irregulares, color blanco mate, aspecto ceroso brillante, originario de un huevo de *Tetranychus urticae*. b) Colonia con características de *Bacillus* purificada en PDA.

2.4.3.1 Tinción de Gram

La metodología empleada para la tinción de Gram fue la utilizada por Carrera en el 2009. En la figura 8a se observa bacilos Gram+, mientras que en la figura 8b se observa bacilos Gram- .

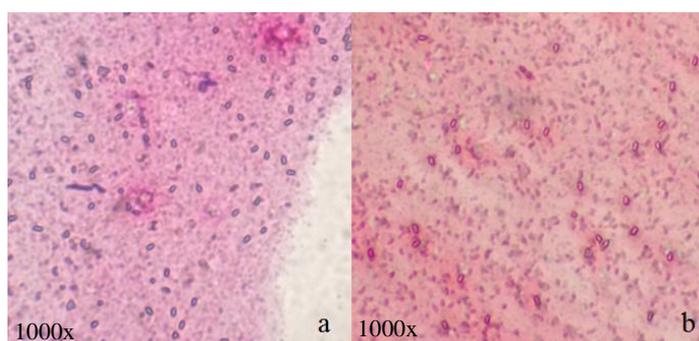


Figura 8. Tinción Gram. a) *Bacillus* Gram+ por su forma de bastón y coloración morada oscura (Cepa PSL 114). b) *Bacillus* Gram- por su forma de bastón y coloración rosada (Cepa PSL 103).

2.4.4 Pruebas bioquímicas

2.4.4.1 Prueba de la catalasa

La metodología empleada para la determinación de la prueba de las catalasa fue adaptada de Zapata (2012).

- Cada cepa fue sembrada por estría cruzada en medio de cultivo Agar Nutritivo, se incubó a 28°C por 24 horas.
- Por cada cepa se colocó en un portaobjetos etiquetado y codificado tres gotas de agua oxigenada (H₂O₂).
- Con un palillo se tomó un poco de la bacteria y se colocó en la primera gota, lo mismo se realizó para las dos gotas restantes con diferentes palillos, teniendo así tres repeticiones para comprobar la reacción.
- La prueba fue positiva una vez que se observó la formación de burbujas (Figura 9) debido a la producción de O₂ por la actividad enzimática.



Figura 9. Prueba de la catalasa positiva de *Bacillus* spp. Cepa PSL 101.

2.4.4.2 Prueba de Hierro Triple Azúcar

La metodología empleada para realizar la prueba de Hierro Triple Azúcar por sus siglas en inglés Iron Triple Sugar (TSI) fue adaptada de Cuervo (2010).

- En tubos de ensayo se colocó 10ml de Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) en pico de flauta con una longitud de aproximadamente 3cm.
- Con ayuda del asa se inoculó cada una de las cepas en forma de picadura localizándola hasta el fondo del tubo y por estría en el pico de flauta. Por cada cepa se realizó tres repeticiones.
- Posteriormente los tubos de ensayo fueron incubados durante 24 horas a 32°C.
- Según los colores que se presentaron se identificó el tipo de fermentación, en función de la fermentación que la glucosa produce bajo condiciones de anaerobiosis y se evaluó en el fondo del tubo (Figura 10).
 - Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): fermentación de glucosa.
 - Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa.
 - Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): microorganismo no fermenta azúcares.
 - Presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo: microorganismos produce gas.
- Es positivo para *Bacillus* si se produce la fermentación de glucosa, o si se da también la fermentación de la lactosa y/o galactosa y la producción de gas.

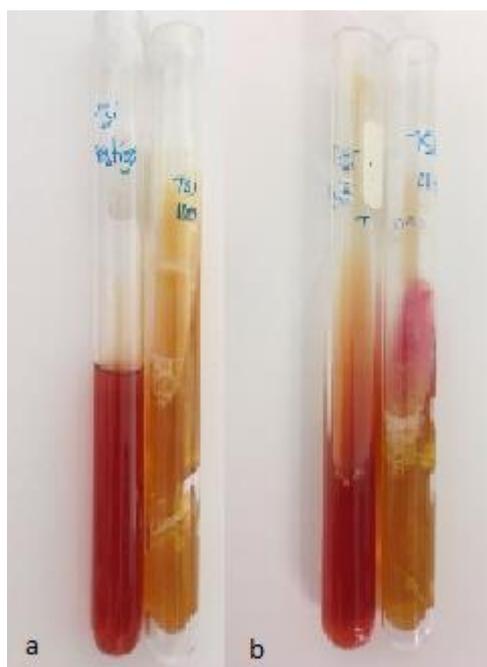


Figura 10. (a) Medio de cultivo original (TSI) tubo izquierdo, tubo derecho presencia de oxígeno y fermentación de la glucosa y lactosa (Cepa PSL 100). (b) Medio de cultivo original (TSI) tubo izquierdo, tubo derecho presencia de oxígeno y fermentación de la glucosa (Cepa PSL 114).

2.4.4.2 Voges Proskauer

La metodología utilizada en la prueba de Voges Proskauer (VP) fue la misma que emplearon Aquiahuatl et al. en su estudio en el 2012.

- En tubos de ensayo que contenían 1ml de caldo Methyl Red / Voges Proskauer (MR/VP) se inoculó cada una de las cepas con ayuda de un asa estéril. Se incubó a 32°C por 48h; en total se realizaron tres repeticiones por cada cepa.
- En cada uno de los tubos inoculados se colocó 0,6ml de α -naftol en una solución alcohólica al 6% y 0,2ml de una solución de KOH al 40%, se sacudió vigorosamente y se dejó reposar de 5 a 20 minutos.

- La prueba fue positiva una vez que el caldo se tornó de color rosado rojo (Figura 11).

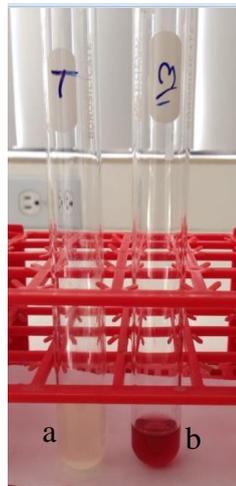


Figura 11. a) Testigo con medio de cultivo RM/VP; b) Colocado α -naftol y KOH al 40%, en donde se observa que la prueba fue positiva ya que el caldo se tornó de color rojo (Cepa PSL 113).

2.4.4.4 Prueba de la hidrólisis del almidón

Se adaptó la metodología utilizada por Carrera (2009), en donde:

- En cajas Petri con agar de almidón se sembró en forma de estría cada una de las cepas de *Bacillus*, incubándolas por 48h a 30°C.
- Posteriormente se pipetearon 2 gotas de lugol.
- La prueba se determinó como positiva una vez que el borde de la gota de lugol se tornó clara (Figura 12).

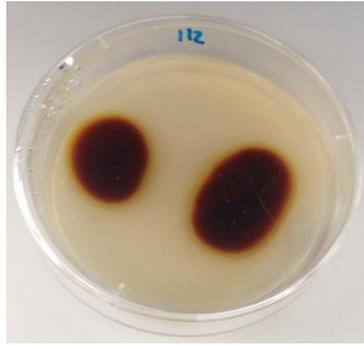


Figura 12. Prueba de la hidrólisis, se observa la formación de un halo alrededor de las gotas de lugol, lo cual demuestra que la prueba es positiva (cepa PSL 112).

2.4.5 Patogenicidad

Para el desarrollo de la fase de patogenicidad, se adaptó la metodología del protocolo de Falconí-Borja (2014b).

2.4.5.1 Cosecha de cepas de *Bacillus* spp.

- Cada una de las cepas identificadas como *Bacillus* spp., se sembró en PDA por inoculación masiva incubándolas a 28°C durante 4 días.
- En botellas de vidrio de 300ml, se prepararon 100ml de Buffer PK+tween80 estériles.
- El PDA en el que creció cada una de las cepas fue cortado en cuadrados pequeños con ayuda de un bisturí flameado (Figura 13a) y fueron colocadas individualmente en las botellas con buffer, se agitó bien y posteriormente se cernió (Figura 13b), obteniendo así una solución madre de cada una de las cepas. Todo esto se realizó en la cámara de flujo y dentro de una atmósfera estéril.



Figura 13. a) Corte en cuadrados pequeños del PDA en el que creció una de las cepas. b) Obtención de la solución madre de una de las cepas de *Bacillus* spp.

2.4.5.2 Conteo en placa

Se realizaron diluciones de cada una de las soluciones madre hasta 10^{-4} , en los platos de Petri con PDA se pipeteó 1ml de la dilución 10^{-4} y con ayuda del bastón de vidrio se extendió la muestra en toda la superficie, en donde se realizó 3 repeticiones por muestra, estas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas. Las evaluaciones fueron determinadas por medio de conteo de colonias presentes y se reemplazó en la siguiente fórmula para determinar UFC/ml.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{inversa del factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

2.4.5.3 Aplicación de cepas de *Bacillus* spp.

En cámaras húmedas (cajas Petri) se localizó una hoja de rosa variedad Freedom del tercio inferior la cual presentaba *T. urticae*. Por cada una de las 15 cepas, el testigo y el tratamiento positivo con Biosan[®] se realizaron tres cámaras húmedas (repeticiones). Para la evaluación se observaron las muestras en el estereomicroscopio bajo aumentos de 20X a 40X, en donde se contabilizó el número de individuos y estadios para proceder a la inoculación de cepas bacterianas aisladas y caracterizadas genéricamente.

En tubos de ensayo se colocaron 1ml de la solución madre de cada una de las cepas y los tratamientos, con ayuda de un aspersor se procedió a impregnar de bacterias

dos veces tanto en el haz (Figura 14) como el envés de la hoja. Constantemente se controló que las cámaras húmedas tengan 50% de humedad.



Figura 14. Aplicación de una de las cepas de *Bacillus* spp. en el haz de la hoja de rosa afectada con *T. urticae*.

Después de 8 días se observó en el estereomicroscopio si los individuos presentaban o no algún tipo de anomalía patogénica.

2.4.5.4 Presencia patogénica de *Bacillus* spp. en individuos de *T. urticae* aislados

Con ayuda de una pinza se aisló 20 individuos que mostraban anomalías patogénicas, se trató de que éstos sean cuatro huevos, cuatro larvas, cuatro protoninfas, cuatro deutoninfas y cuatro adultos (machos y/o hembras) que fueron colocados en cajas Petri con PDA e incubados a 28°C durante 72 horas, se observó la presencia o no de *Bacillus* spp. (Figura 15) en cada uno de los individuos para cumplir con los postulados de Koch.

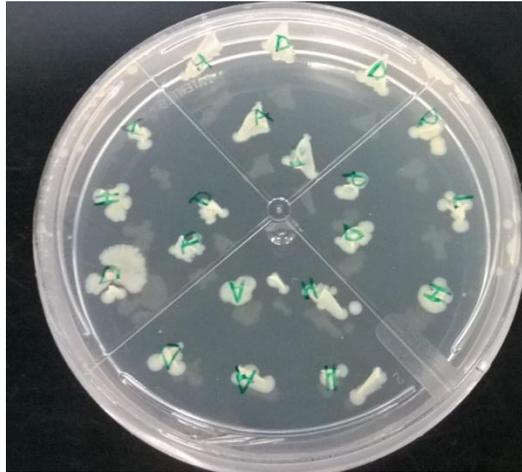


Figura 15. Presencia de colonias de *Bacillus* spp. en los individuos de *T. urticae* aislados en PDA del tratamiento con la cepa PSL 101. (H: huevo, L: larva, P: protoninfa, D: deutoninfa, A: adulto hembra, M: adulto macho).

2.4.5.5 Citohistoquímica

En un porta objetos previamente limpio con alcohol al 98%, se colocaron tres gotas del reactivo PSL-CHQ 127 (Plantsphere Laboratories Citohistoquímica 127) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante tres minutos (Figura 16), posteriormente con aumentos de 20X a 40X se observó en las hojas tratadas individuos de *T. urticae*. En cada uno de los tratamientos se identificaron tres hembras y fueron colocadas una en cada una de las gotas, una vez protegidas con el cubre objetos se observó al microscopio (1000X), metodología empleada para la identificación de las hembras. En cada una de las muestras se procuró determinar hembras con alguna alteración en su morfología externa como por ejemplo ruptura de sus paredes, tejidos dañados, etc. en donde se determinaron que áreas se encontraban más afectadas por las cepas de *Bacillus* spp., comparándose con una placa testigo (Figura 17).

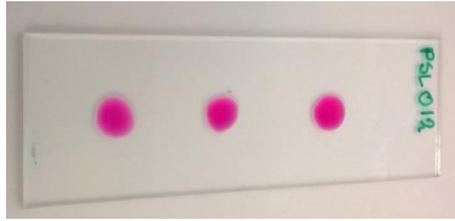


Figura 16. Portaobjetos con 3 gotas del reactivo PSL-CHQ 127 reposando a temperatura ambiente.

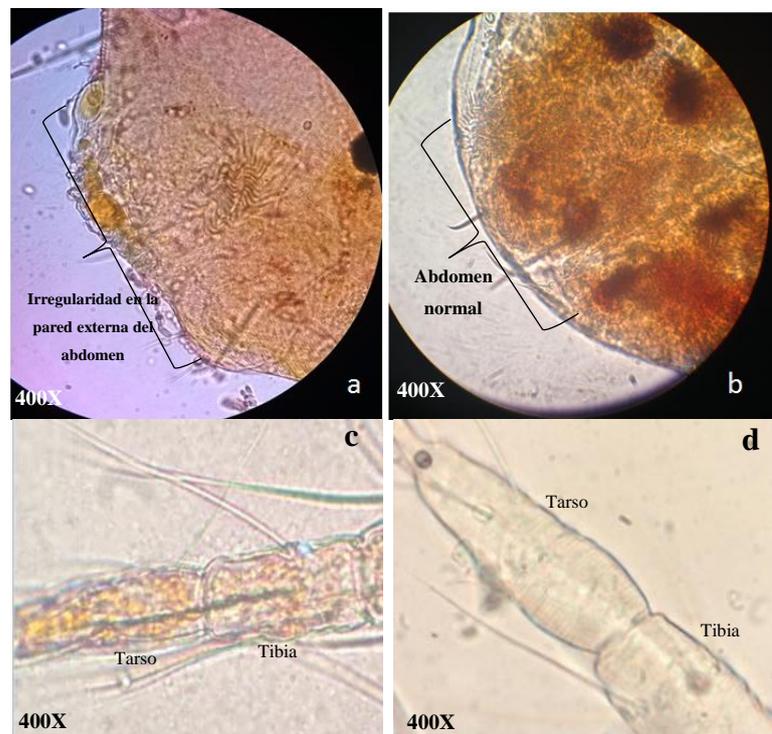


Figura 17. Hembras de *T. urticae* observadas después de 12 días de haber aplicado el tratamiento. a) Presenta irregularidad en la pared externa del abdomen por causa de la actividad de la cepa PSL 104. b) Pared externa normal del abdomen. c) Irregularidad en la pared externa de la cutícula y tejido dañado en el tarso y la tibia de la pata por causa de la cepa PSL 107. d) Pata sin irregularidades.

2.4.6 Postulados de Koch

En este estudio se realizó adaptaciones de los Postulados de Koch descritos por Fuentes (2007), para evaluar eventos generales del patosistema *Bacillus* spp. y *T. urticae* habiéndose aislado cepas de *Bacillus* spp. a partir de individuos de *T. urticae* aparentemente sanos.

Una vez que los individuos presentaron la bacteria con las características morfológicas de *Bacillus*, estas fueron aisladas en PDA para su purificación. Se recolectó hojas de rosas variedad Freedom con *Tetranychus urticae*, éstas fueron trasladadas al laboratorio y colocadas en cámaras húmedas en cajas Petri individualmente cada hoja, se realizaron tres repeticiones por cada cepa encontrada y por cada testigo, se aplicaron cada uno de los tratamientos como anteriormente ya se mencionó. Finalmente se escogió al azar individuos de *Tetranychus urticae* de las tres cámaras húmedas que se realizaron para cada una de las cepas y para los testigos. Los ácaros (cuatro huevos, cuatro larvas, cuatro protoninfas, cuatro deutoninfas y cuatro adultos (hembras y machos)) fueron colocados en PDA y llevados a la incubadora a 28°C por un periodo de tres días. Posteriormente se realizó la identificación morfológica de las bacterias (Falconí-Borja, 2014a).

2.5 Análisis de datos

Para determinar si las diferencias entre las medias de los grupos (superior (Ts), medio (Tm) y bajo (Tb)) son significativas o no, se utilizó la prueba de ANOVA (Análisis de Varianza) de una vía y la prueba de DMS (Diferencia Mínima Significativa) para la comparación múltiple entre las medias al 95% de confiabilidad, empleando el paquete estadístico IBM® SPSS STATISTICS 22.0, además se realizó un análisis porcentual para determinar el número de individuos en cada tercio (superior (Ts), medio (Tm) y bajo (Tb)).

Porcentualmente se determinó la cantidad de individuos por estadio que se presentaba en cada uno de los tercios en promedio de los focos de infección.

Mediante observación se determinó el número de colonias con características de *Bacillus* spp. presentes en los diferentes individuos de *Tetranychus urticae* aislados a partir de hojas de rosas de los diferentes tercios.

La tinción de Gram y pruebas bioquímicas se determinaron mediante la reacción positiva y negativa determinándose así el porcentaje de las cepas que produjeron una reacción positiva.

Mediante conteo y aplicación de la fórmula de UFC/ml se determinó el número de UFC/ml de cada una de las cepas aisladas y del tratamiento con Biosan®.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) como método de síntesis y ordenación de los tratamientos que produjeron un mismo tipo o similar tipo de afección patológica en *T. urticae*. Para esto se utilizó el mismo programa estadístico mencionado anteriormente (SPSS).

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1 Control biológico

El control biológico se origina a inicios del siglo XIX, cuando varios naturalistas de diferentes lugares recalcaron el papel importante que desempeñan los organismos entomófagos en la naturaleza, por lo que llegan a la conclusión de que el empleo del control biológico intenta restablecer el alterado equilibrio ecológico, utilizando organismos vivos o sus metabolitos, para así eliminar o reducir los daños provocados por organismos perjudiciales (Badii y Abreu, 2006).

Según Rodríguez et al. (2010) control biológico es la “regulación de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, lográndose con ello un equilibrio poblacional”. Control biológico o biocontrol es un método que emplea organismos vivos para reducir o regular la densidad de poblaciones plaga, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos benéficos para las plantas, los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo de los patógenos (Villacide y Corley, 2012). Una plaga es un organismo que produce daño o disminuye la disponibilidad y la calidad de un recurso humano, es decir desde la salud del humano hasta animales y plantas que son utilizados en la alimentación (Porcuna, Boix y Jiménez, 2003).

La mayoría de las especies viven o vivían bajo la influencia del control natural en cada uno de sus hábitats, es decir las poblaciones se regulan generalmente por la acción natural de sus parásitos, depredadores, patógenos y competidores, el problema se da cuando se introduce alguna especie nueva a lugares en donde sus enemigos naturales no se encuentran; o cuando se da una alta aplicación de un mismo producto químico, ya que la plaga empieza a evolucionar y se va haciendo cada vez más resistente, lo que causa el incremento de dosificación del producto contaminando así cada vez más los ecosistemas y afectando a cada uno de sus organismos, incluido el hombre (Villacide y Corley, 2012; Ezziyyani et al., 2006).

Existe el control biológico natural y el control biológico aplicado; el primero se da cuando los enemigos naturales mantienen estable la población dañina, evitando daños graves, mientras que el segundo se da cuando los enemigos naturales son aplicados por el hombre, ya con criterios técnicos y científicos (Cabrera, 2010).

Para lograr el control biológico se pueden seguir tres vías (Ezziyyani et al. 2006):

- Exploración en el propio medio de los agentes biocontroladores.
- Introducción o liberación masiva de agentes de control.
- Manipulación del ambiente para favorecer el desarrollo de los antagonistas naturales presentes en el mismo.

El concepto práctico de control biológico, implica el manejo racional y dirigido de organismos apropiados, componentes comunes de los agrosistemas para proteger a la planta frente al ataque de diversos patógenos. Debido a que esta actividad natural no está controlada específicamente, sus resultados son impredecibles. Durante los últimos años, el uso de microorganismos antagonistas es una de las alternativas que ha recibido mayor atención (Ezziyyani et al., 2006).

El control biológico de plagas requiere una comprensión de la dinámica de población, interacciones depredador - presa y la competencia intra e inter específica. El uso de microorganismos causantes de enfermedades en los insectos es una manera de control biológico ya que bacterias, virus, protozoos u hongos, son denominados como entomopatógenos, los cuales son una alternativa para el manejo integrado de plagas importantes en la agricultura. A diferencia de los plaguicidas químicos el control biológico tiene un menor impacto ecológico, siendo las bacterias uno de los grupos más utilizados (Gutiérrez et al., 2013).

3.1.1 Tipos de control biológico

Según Rodríguez et al. (2010) los tipos de control biológico son:

Conservativo: se fundamenta en prácticas y estrategias para que tanto el establecimiento como la proliferación de organismos del mismo lugar sean mucho mejor, evitando el uso de prácticas que los desfavorezcan, estableciendo únicamente las practicas favorables.

Clásico: es cuando se introduce un agente controlador desde otro lugar para combatir una plaga, esto surge por la ausencia de agentes de control biológico en la misma zona, ya que la plaga pudo haber sido introducida.

Aumentativo: se da cuando se ve la necesidad de incrementar la población de agentes de control biológico en un determinado lugar, por su escasa presencia o imposibilidad de mantener poblaciones suficientes. Dentro de este control se maneja dos tipos de uso, el primero se refiere a aplicación masiva y el segundo a aplicación inoculativa.

3.1.2 Consideraciones importantes

3.1.2.1 Ventajas

Algunos autores, entre ellos Cisneros (1995) destacan algunas ventajas del control biológico:

- Los parásitos y predadores buscan a sus hospederos y presas en los lugares donde éstos se encuentran, incluyendo sus refugios.
- Los enemigos biológicos, a diferencia de los pesticidas, no dejan residuos tóxicos sobre las plantas ni contaminan el medioambiente.
- La acción de los enemigos biológicos tiende a intensificarse cuando las sucesiones de las plagas son más altas.

- Los enemigos biológicos no producen desequilibrios en el ecosistema agrícola.
- Las plagas no desarrollan resistencia a sus enemigos biológicos. Existe el fenómeno de "encapsulamiento" que consiste en la formación de un tejido especial o sustancia que rodea al huevo del parásito, o a su larva recién emergida, causándole la muerte; pero no se conocen casos en que este fenómeno se haya incrementado como una manera de adquirir resistencia.

3.1.2.2 Desventajas

Según Rodríguez et al. (2010), el biocontrol debe formar parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP) por lo que implica modificaciones en las prácticas agrícolas, además es susceptible a factores bióticos y abióticos; otra desventaja es que su efecto no es inmediato y la plaga no es eliminada completamente sino que busca un equilibrio.

3.2 *Bacillus* spp.

3.2.1 Clasificación taxonómica

El género *Bacillus* se ubica en los siguientes rangos taxonómicos (Aguavil y Enríquez, 2011):

Reino: Bacteria
Phylum: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Bacillaceae
Género: *Bacillus*

3.2.2 Generalidades

Una de las primeras bacterias en ser descritas fueron las del género *Bacillus*, descubiertas en 1872 por Cohn, desde entonces estas bacterias han jugado un rol importante en el desarrollo de la microbiología (Márquez, 2007).

Los *Bacillus* son bacterias gram positivas de gran tamaño (4-10 μm), aerobias estrictas o anaerobias facultativas encapsuladas, los bacilos forman parte de las familias bacterianas que presentan mayor actividad bioquímica (Cuervo, 2010). Una de las características más importantes de este género es que forma esporas resistentes a condiciones desfavorables, las cuales presentan morfología oval o cilíndrica; son móviles ya que presentan flagelos laterales. *Bacillus* spp. se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, como suelo, agua, materia vegetal en descomposición, insectos y plantas, así como en la Antártida, ambientes desérticos, etc. Son microorganismos activos en un rango de pH entre 5.5 a 8.5. Debido a su actividad bioquímica varias especies del género *Bacillus* son utilizadas tanto en control biológico como en la producción industrial debido a sus reacciones metabólicas (Calvo y Zúñiga, 2010; Layton et al., 2011).

Varias especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir enzimas que por hidrólisis degradan los compuestos disponibles del suelo y plantas como fuente de carbono, entre las enzimas más comunes que secretan los *Bacillus* se encuentra la amilasa que degrada el almidón y lo convierte en dextrina (Márquez, 2007).

Las colonias de *Bacillus* presentan una superficie rugosa o plana, de color claro y blanco, ocasionalmente son planas ligeramente convexas, sus bordes son redondos irregulares y de consistencia espesa, cerosa o babosa (Carrera, 2009).

Las especies del género *Bacillus* forman esporas o endosporas (Figura 18), que son estructuras que pueden sobrevivir independientemente de la célula madre, son especializadas para resistir condiciones adversas del ambiente como calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos. Las endosporas se forman debido a una serie de cambios controlados genéticamente, estas estructuras son consideradas una forma primitiva de diferenciación celular (Márquez, 2007). Generalmente las endosporas de los *Bacillus* está formada por proteínas deshidratadas que usan el ácido poli- β -hidroxibutírico

en aerobios y polisacáridos en los anaerobios. Se ha reportado que algunas endosporas llegan a vivir de 200 a 400 años, pero el grado de resistencia de la endospora depende ampliamente de las condiciones del entorno bajo las cuales fueron formadas (Holt et al., 1984).

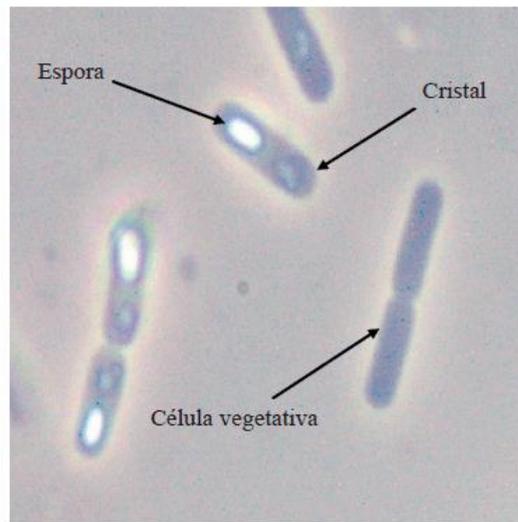


Figura 18. Cultivo de *B. thuringiensis* (CVCM 1813), en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de fases a 1000X. **Fuente:** Vitelli et al., 2010.

Existen especies de *Bacillus* que son patógenas para el hombre, como *Bacillus anthracis* la cual puede afectar el tracto gastrointestinal, cutáneo y aparato respiratorio, esta especie fue utilizada como arma terrorista llegando a causar la muerte de miles de personas, otra especie patógena es *B. cereus* la cual se desarrolla fácilmente en los alimentos produciendo una enfermedad emética, comúnmente diarrea y vómito (Castellanos et al., 2005).

3.2.3 *Bacillus* utilizados en la agricultura

Entre las especies frecuentemente empleadas en actividades agrícolas se encuentran:

3.2.3.1 *Bacillus subtilis*

B. subtilis a lo largo del tiempo se ha convertido en un microorganismo muy importante para diferentes usos ya que ayuda a descomponer residuos vegetales, produce enzimas para la elaboración de productos químicos, elaboración de fertilizantes, controla bacterias y hongos patógenos. No es considerado patógeno para el hombre, sin embargo puede contaminar alimentos, es manejable para la manipulación genética por lo cual es un organismo modelo para estudios en laboratorio (Leidy, 2010).

En Agar sangre de cordero presenta colonias (Figura 19) de dos a cuatro mm de diámetro, beta hemolíticas con hemólisis completa, que pueden presentar aspecto liso, mucoso o rugoso; sus bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos (Realpe et al., 2002).



Figura 19. Colonias de *B. subtilis* en agar sangre de cordero al 5%, incubadas a 35°C durante 24 horas. **Fuente:** Realpe et al., 2002.

3.2.3.2 *Bacillus thuringiensis*

Uno de los microorganismos más utilizados y el cual ha dado un mayor resultado en el control biológico a nivel mundial ha sido el grupo de las bacterias, especialmente *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas de insectos principalmente dípteros, lepidópteros y coleópteros, además de la utilización de la variedad *acari* como controlador de ácaros (Fernández et al., 2010; Flores et al., 2011b).

Esta especie bacteriana, durante su ciclo de vida, presenta tres fases: la fase de crecimiento exponencial (vegetativo), fase de transición y fase de esporulación (Lara, 2008). Produce cuerpos paraesporales de origen proteico conocidos como cristal paraesporal durante su fase esporulante, este cristal presenta propiedades insecticidas y está constituido por proteínas denominadas delta-endotoxinas también llamadas proteínas Cry las cuales una vez que el insecto susceptible las ingiere empiezan a ser procesadas en el intestino, liberando así fragmentos tóxicos provocándoles ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y la muerte (Soberón y Bravo, 2007). Es una bacteria inocua al hombre, animales domésticos, flora y fauna silvestre (Carrera, 2009).

En agar sangre de cordero presenta colonias (Figura 20) de tres a ocho mm de diámetro, hemólisis completa, de color amarillo a gris, pueden presentar aspecto de vidrio esmerilado y bordes regulares, que forman agrupaciones en cadenas que se pueden observar macroscópicamente (Realpe et al., 2002).



Figura 20. Colonias de *B. thuringiensis* en agar sangre de cordero al 5%, incubadas a 35°C durante 24horas. **Fuente:** Realpe et al., 2002.

3.3 *Tetranychus urticae*

3.3.1 Generalidades

Ácaro conocido vulgarmente como el ácaro de dos manchas o la araña roja, es una plaga cosmopolita que ataca a numerosos cultivos de importancia económica tanto en campo como en invernadero, por ejemplo ataca cultivos de hortalizas, cítricos, frutales, ornamentales, entre otros; los cultivos son infestados rápidamente por esta plaga y puede producir daños considerables (Draganova y Simova, 2010; Argolo, 2012).

T. urticae generalmente forma colonias en el envés de las hojas en donde producen una especie de telaraña muy tupida la cual les sirve para protegerse de los depredadores, condiciones climáticas adversas y además la utilizan como mecanismo de dispersión, ya que cuando el alimento escasea los ácaros se colocan en el extremo de la hoja esperando una corriente de aire o por gravedad son llevados a otra planta, ácaros de la familia Tetranychidae han sido encontrados a 3000 msnm (Argolo, 2012). Esta especie de ácaro es la que presenta mayor resistencia a los acaricidas en todo el mundo y es de la que se encuentra mayor cantidad de reportes debido a los daños y pérdidas cuantiosas causadas en la agricultura (FMC Agroquímica, 2009).

3.3.2 Clasificación taxonómica

Según Argolo, 2012 la clasificación taxonómica de *T. urticae* es la siguiente:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Arachnida
Subclase: Acari
Orden: Prostigmata
Familia: Tetranychidae
Género: *Tetranychus*
Especie: *T. urticae* Koch (1836)

3.3.3 Ciclo de vida

T. urticae es un fitófago, presenta un alto potencial reproductivo, su ciclo de vida es corto (puede completarlo en 10 días), su tasa de desarrollo es rápido alcanzando niveles perjudiciales, presentan una rápida capacidad de dispersión causando graves daños a la planta hospedera. Se desarrolla principalmente en temperaturas elevadas y humedad baja. Su reproducción es mediante partenogénesis de tipo arrenotoca, es decir, los machos se desarrollan a partir de huevos no fecundados (haploides) y a partir de huevos fecundados (diploides) se desarrollan las hembras. Esta especie tiene una relación entre sexos de 2:1 y 9:1 a favor de las hembras (Macke et al., 2011).

Esta plaga es ovípara y pasa por cinco fases de desarrollo (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto), y entre cada una de estas hay un período quiescente (fase inactiva) los cuales son conocidos como protocrisalis, deutocrisalis y teliocrisalis (Figura 21). En cada una de las fases quiescentes se da el desprendimiento del exoesqueleto quitinoso para así aumentar de tamaño hasta alcanzar el estadio adulto; producen hilos de ceda en donde vive la colonia (Bayer CropScience, 2008; Argolo, 2012; Espinosa, 2013).

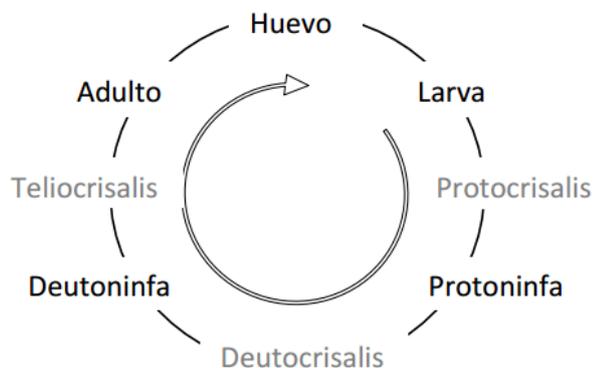


Figura 21. Ciclo de vida de *T. urticae*. **Fuente:** Argolo, 2012.

a. Huevo: la temperatura ideal para que el huevo eclosiona es de 18 °C en la noche y de 22 a 27°C en el día. El huevo es redondo liso de aproximadamente 0,14mm, al inicio es incoloro y una vez maduro se torna amarillento transparente en el cual se puede ver con facilidad los ojos rojos de la larva. Los huevos eclosionan en menos de 3 días (FMC Agroquímica, 2009; Espinosa, 2013).

b. Larva: presenta tres pares de patas y dos ojos oscuros, es amarillenta y redondeada (Bayer CropScience, 2008).

c. Protoninfa y Deutoninfa: son amarillentas con dos manchas oscuras laterales, presentan cuatro pares de patas (Bayer CropScience, 2008).

d. Adulto

Hembra: su cuerpo es globoso poco ovalado, aproximadamente mide más de 0,5mm, según la edad y el huésped pueden ser de color amarillento, rojo o anaranjado. En los laterales presentan dos manchas oscuras. Cada hembra puede ovipositar un total de 100 a 120 huevos, ovipositando de 3 a 5 huevos por día. Pero la cantidad de huevos

puede variar según el alimento o las condiciones ambientales (Zhang, 2003; Bayer CropScience, 2008).

Macho: es más pequeño que la hembra, su idiosoma tiene forma de pera, más ancho en la parte anterior. Presenta dos manchas oscuras en los laterales del idiosoma, el color de todo su cuerpo es amarillento, sus patas son más largas que las de las hembras. (Bayer CropScience, 2008).

3.3.4 Alimentación

T. urticae se alimentan de la savia de todo tipo de planta o cultivo. Insertan su estilete en el tejido de la hoja y succionan el contenido de las células epidérmicas y parenquimatosas, esto produce el colapso y muerte de las células. También pueden raspar la superficie de la hoja para alimentarse (Bayer CropScience, 2008; FMC Agroquímica, 2009; Argolo, 2012).

3.3.5 Características morfológicas

3.3.5.1 Morfología externa

Este ácaro puede presentar diferentes características morfológicas, sobre todo su color puede variar en respuesta a su régimen alimenticio, factores ambientales, planta huésped y estado de desarrollo (Argolo, 2012). Presentan simetría bilateral y apéndices articulados. También exhiben estigmas los cuales permiten que su respiración sea traqueal. Los quelíceros les ayudan a alimentarse. Su cuerpo está dividido en dos partes, gnathosoma (parte anterior) e idiosoma (parte posterior) (Bayer CropScience, 2008) (Figura 22).

Gnathosoma: se encuentran los quelíceros o el estilete bucal y los palpos.

Idiosoma: se encuentran los cuatro pares de patas, tiene aspecto globoso con la presencia de quetas (pelos) y aquí se encuentra la mayoría del sistema alimenticio, respiratorio y todo el sistema reproductor. En la parte anterior se encuentran los ojos de color rojo.

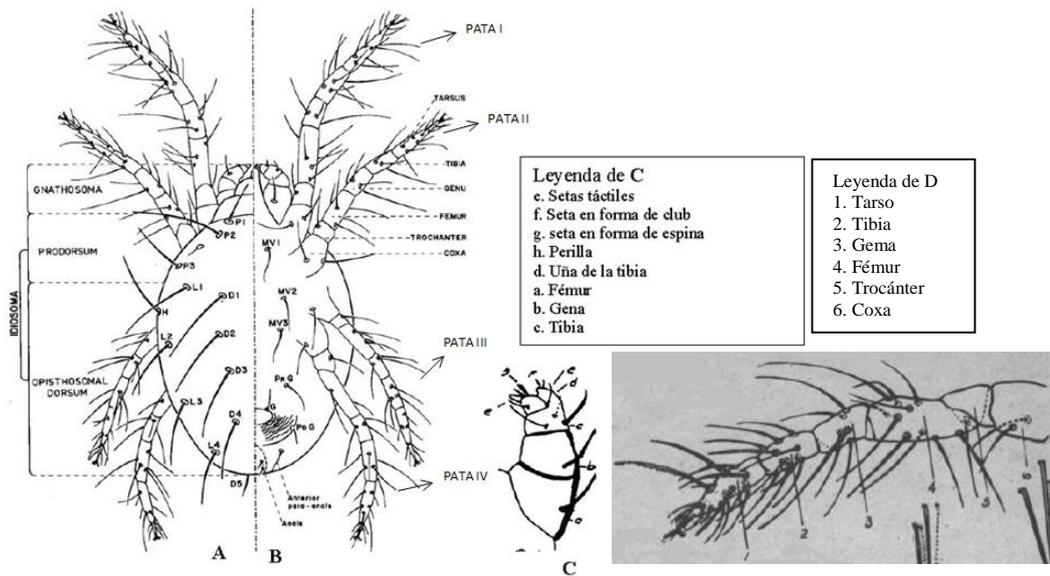


Figura 22. Vista dorsal (A), ventral (B), palpo (C) de *Tetranychus urticae*, (D) vista lateral de la pata y de sus segmentos. **Adaptado de:** Almaguel, 2002.

3.3.5.2 Morfología interna

Su aparato digestivo está formado por un tubo simple, en el que se encuentra el intestino anterior (estomodeo) formado por la boca, faringe y el esófago, los cuales tienen como función succionar el alimento. Posteriormente el intestino medio (Ventrículo), lugar en donde se da la asimilación de las sustancias nutritivas, aquí se encuentran los ciegos gástricos que son los encargados de aumentar la superficie para la absorción de los nutrientes. Finalmente el intestino posterior (proctodeo) está compuesto por el recto y el ano, por aquí se da la eliminación de sustancias no digeribles, internamente se encuentran los tubos de Malpighi los cuales recogen las sustancias de desecho del organismo y son eliminadas por el ano (Almaguel, 2002).

Internamente el gnathosoma está cubierto por glándulas salivales las cuales tienen funciones específicas como producir sustancias lubricantes para la lisis de los cloroplastos, esto es específico de *Tetranychus urticae*. Los ácaros en general tienen músculos estriados los cuales son los responsables de la movilidad del aparato bucal, gnathosoma, apéndices locomotores y abertura genital y anal (Almaguel, 2002).

En los ácaros el sistema circulatorio es lagunar. Está formado por la hemolinfa (líquido claro que contiene hemocitos: amebocitos y leucocitos) tienen varias funciones como el transporte de nutrientes, mensajeros químicos como hormonas, soporte de los tejidos y transmisión de energía en forma de presión hidrostática (Almaguel, 2002).

El sistema nervioso central de los ácaros está fusionado en una masa ganglionar circunsofágica que presenta nervios periféricos extendidos hacia varios lugares del cuerpo. Las estructuras sensoriales se encuentran en el idiosoma el cual tiene una gran variedad de receptores sensoriales de la cutícula y de setas o cerdas (pelos), con funciones táctiles y quimiorreceptoras (Almaguel, 2002).

Entre los receptores sensoriales se encuentran: Mecano-receptor (pelo ordinario que coordina el movimiento al caminar, percibe la gravedad, el sustrato y la vibración del aire); Químio-receptor (presentan dos o más neuronas que penetran en el lumen); Termo-receptor; Hígro-receptor y Foto-receptor (En *T. urticae*, el ojo anterior actúa como un scanner pero este no forma imágenes, únicamente tiene receptores para el verde y el UV, el segundo ojo es receptor no direccional y únicamente capta el UV). Los receptores de olfato se encuentran generalmente en el dorso del tarso. El sistema respiratorio es mediante tráqueas que se abren en un par de estigmas (Figura 23) (Almaguel, 2002).

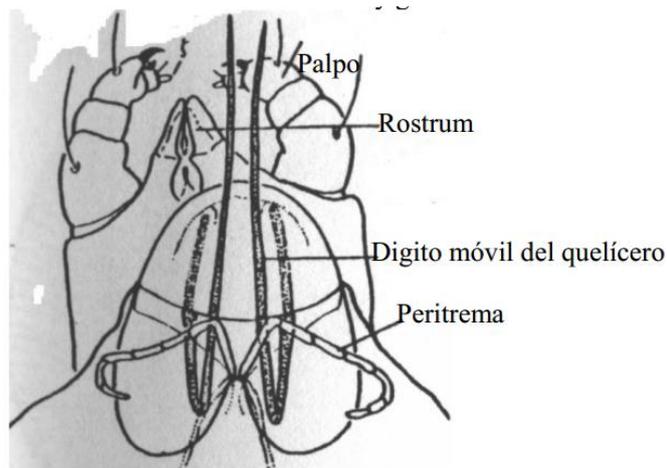


Figura 23. Vista dorsal y ventral del gnathosoma de Tetranychidae. **Fuente:** Almaguel, 2002.

3.3.6 Daños

T. urticae succiona la savia en el envés de las hojas (mesófilo) disminuyendo la resistencia estomática y la tasa respiratoria (disminución de la tasa de transpiración); además provoca efectos negativos en la tasa de absorción energética de la planta (disminución de la actividad fotosintética) y como consecuencia daños en la planta por alimentación ocasionando decoloraciones, deformaciones y defoliaciones en los cultivos; por ende también son capaces de afectar dramáticamente el crecimiento, rendimiento y calidad de la fibra de la planta (Bayer CropScience, 2008; Flores et al., 2012). En rosas rosas es el más abundante causando oscurecimiento y debilitamiento en la producción de los botones, en sí pérdida en la calidad de la flor (Yáñez et al., 2014).

3.4 Postulados de Koch

Según Fuentes (2007), Robert Koch nació el 11 de Diciembre de 1843 en Clausthal – Zellerfeld, Alemania. En la universidad de Gottingen estudió medicina, después ejerció en Lagenhogen y Hamburgo como médico rural (1872 - 1880) en donde empezó su carrera como bacteriólogo. Su primera contribución a la microbiología fue el aislamiento de *Bacillus anthracis* en 1877, a partir del carbunco bacteridiano o ántrax, enfermedad transmitida frecuentemente desde el ganado lanar y vacuno hacia el hombre. Después de esto Koch anunció diferentes leyes (los postulados de Koch) que hasta hoy son una gran contribución para la ciencia de la microbiología. Koch murió el 27 de Mayo de 1910 en Baden - Baden, Alemania. Los postulados son los siguientes:

1. La bacteria patógena debe aislarse siempre de animales enfermos y nunca de animales sanos.
2. Cuando un animal está enfermo la bacteria debe aislarse en cultivo puro.
3. Si la bacteria se inocula a otro individuo debe reproducirse la enfermedad.
4. La bacteria debe aislarse nuevamente en cultivo puro.

Sus postulados fueron publicados por primera vez en 1882 pero recién en 1890 fueron publicados como se los conoce actualmente. La publicación de estos postulados supuso una revolución para la comunidad científica y especialmente para la microbiología que recién empezaba a surgir.

Actualmente existen excepciones sobre los postulados de Koch, el mismo Koch fue quien dejó constancia de algunas de estas, mientras que otras excepciones han sido descubiertas gracias a nuevas técnicas científicas. Algunas de estas excepciones son:

- Las enfermedades polimicrobianas, ya que la causa de esta son varios patógenos, como la rinitis atrófica (causada por *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* las cuales provocan lesiones en los cornetes nasales).
- Las bacterias oportunistas son otro caso, por ejemplo la *Pseudomonas aeruginosa* causa enfermedades en individuos que tienen estados de inmunosupresión como el cáncer, fibrosis quística, entre otros.

- La mixomatosis es producida por virus de la familia *Poxviridae*, enfermedad que solamente afecta a los conejos.
- Las enterobacterias como estrategia de vida reducen su actividad metabólica y se transforman en bacterias durmientes o también conocidas como “somicells”, en dicho estado las enterobacter no pueden ser cultivadas en medios artificiales, pero una vez que despiertan si pueden ser cultivadas.

A pesar de las excepciones, dichos postulados han sido de gran importancia ya que por primera vez en la microbiología se introdujo un método experimental.

3.5 Efectores biocatalíticos

Los Efectores Biocatalíticos (EBc[©]) son microorganismos, biomoléculas, virus, porciones de ADN, ARN, enzimas, proteínas, péptidos, que actúan por medio de diversos procesos y mecanismos, en la regulación de sistemas individuales o colectivos que evidencian alteración, desequilibrio. En consecuencia corrigen e influyen desarreglos de tipo funcional, fisiológico, morfológico, poblacional, dentro de un sistema del cual forma parte. Su radio de acción son los perfiles de variación (PV) originadas por la influencia de agentes externos o internos (*Falconí-Borja, com. pers. 1 de septiembre del 2014*).

El espectro de influencia de regularización de los EBc[©] se evidencia en:

1. Sistemas (poblaciones heterogéneas de insectos plaga, animalia, etc).
2. Individuos componentes de poblaciones (infecciones localizadas, definidas, puntuales).
3. Poblaciones en su más amplio espectro.

3.6 Tinción de Gram

Una de las técnicas más utilizadas en microbiología es la tinción la cual sirve para clasificar microorganismos, principalmente se utiliza tintes que son compuestos orgánicos los cuales se adhieren según el tipo de carga que poseen (Manacorda, Cuadros y Álvarez, 2007). La tinción de Gram fue elaborada por Hans Christian Gram en 1884, esta técnica es de tipo diferencial ya que permite separar y clasificar los microorganismos según sus características. Para la tinción de Gram se debe realizar lo siguiente (Caldas, 2010):

- Preparar un frotis de la bacteria (Muestra fijada) (Figura 24).
- Colocar cristal violeta por 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Poner lugol por 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Verter alcohol cetona durante 5 segundos y lavar con agua destilada.
- Colocar fucsina o safranina por 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Finalmente dejar secar la muestra y después llevar al microscopio y observar con el objetivo de 100X para determinar si son Gram+.

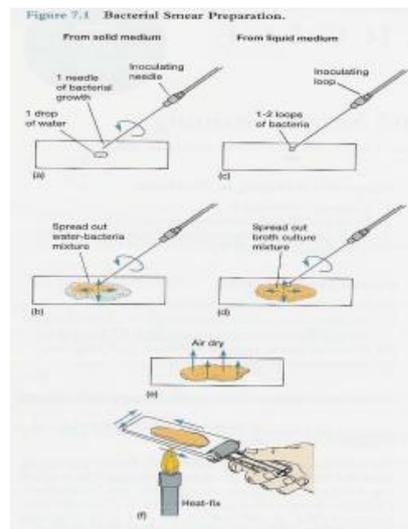


Figura 24. Preparacion de frotis para la tinción. **Fuente:** Gómez, s/a.

Cristal violeta (colorante básico): tiñe la bacteria de color violeta.

Yodo (mordiente): agente mordiente el cual forma un complejo insoluble con el cristal violeta ayudando así a que el colorante se adhiera a la célula y ayuda a resistir la decoloración.

Alcohol cetona (decolorante): actúa como solvente de lípidos y deshidratante de proteínas. Remueve el cristal violeta.

Safranina (colorante de contraste): este actúa como contratinte, tiñe de rojo – rosado las bacterias.

Debido a que las bacterias Gram+ tienen una pared celular gruesa de peptidoglucano; dicha pared no es susceptible a la acción de solventes orgánicos, los poros se hidratan y se cierran reteniendo así el cristal violeta y yodo por lo cual se tiñe de azul – violeta (Manacorda et al., 2007; Caldas, 2010).

Mientras que las bacterias Gram- están formadas por una pared celular de peptidoglucano muy delgada por lo que no puede retener el complejo cristal violeta/yodo, además su pared celular es soluble en solventes orgánicos como el alcohol por lo que se tiñen de rosado-rojo. Esto se debe a que el alcohol disuelve el contenido lipídico de la pared celular aumentando así la permeabilidad celular (Manacorda et al., 2007; Caldas, 2010).

Algunas de las desventajas de la tinción de Gram es que muchas de las células mueren al fijar la muestra con calor y la combinación del calor con el colorante pueden alterar la forma original de la célula (Caldas, 2010).

3.7 Pruebas bioquímicas

El metabolismo es el conjunto de reacciones que se dan en los seres vivos, incluye procesos de obtención de energía, como descomposición de moléculas orgánicas en los

quimiótrofos (catabolismo) o la captación de luz para el caso de los fotótrofos. También se encuentran las de síntesis de material celular a partir de nutrientes esenciales lo cual es conocido como anabolismo. Las reacciones metabólicas son catalizadas por enzimas, la mayoría son intracelulares (Aquihuatl et al., 2012).

El objetivo de realizar pruebas bioquímicas es para identificar microorganismos, principalmente por sus reacciones que producen mediante sus características metabólicas, en sí se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, degradación de compuestos, producción de compuestos coloreados, etc. (García y Silva, 2004). Algunas pruebas son técnicas rápidas porque en pocos segundos o minutos se puede evaluar la presencia de una enzima; la mayoría de pruebas bioquímicas tardan algunos días, ya que es necesario incubar previamente al microorganismo por varios días para poder detectar algunos componentes metabólicos o los que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada mediante la utilización de un medio que contiene el sustrato a metabolizar. En general se trata de reacciones enzimáticas cromógenas o pruebas convencionales modificadas (Toro, 2005; Cercenado y Cantón, 2010).

3.7.1 Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos (proteínas que participan en el transporte de energía química). Cuando las bacterias sintetizan la catalasa, hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y el oxígeno gaseoso que es liberado en forma de burbujas, determinando que la prueba es positiva (García y Silva, 2004; CEI BIOTIC, 2014). El peróxido de hidrógeno (Agua oxigenada, H_2O_2) es el producto final oxidativo que se da por la degradación aerobia de los azúcares (Faddin, 2003).

3.7.2 Fermentación en Agar Hierro Triple Azúcar

Se emplea para detectar la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa con formación de ácido y gas además de detectar la producción de ácido sulfhídrico. Debido a la fermentación de azúcares por el metabolismo de las bacterias se producen ácidos los cuales hacen que las reacciones sean positivas o negativas (Britania, 2010a).

3.7.3 Voges Proskaur

Esta prueba es utilizada para determinar la capacidad fermentativa de la glucosa de los microorganismos, después de añadir α -naftol en una solución alcohólica al 6% y de una solución de KOH al 40%, la reacción transforma el medio de cultivo en el que se ha inoculado la bacteria a un color fucsia-rojizo; esta coloración se da por la oxidación del acetil metil carbinol ($C_4H_8O_2$) a diacetilo ($C_4H_6O_2$) el cual reacciona con la peptona (Faddin, 2003).

3.7.4 Hidrólisis del almidón

Las hidrolasas son enzimas de las bacterias que producen la ruptura de enlaces mediante la segregación de las mismas al medio por lo que las bacterias hidrolizan el almidón mediante la amilasa (Faddin, 2003).

3.8 Medios de cultivo

Una de las técnicas para la identificación de microorganismos es mediante la observación de su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en laboratorio, conocidos comúnmente como medios de cultivo de los cuales aproximadamente existen más de 10.000 medios diferentes. Es importante tomar en cuenta condiciones de temperatura, grado de humedad, acidez, alcalinidad, y que el medio

tenga las sustancias y factores necesarios para que las bacterias puedan crecer adecuadamente en un medio de cultivo artificial (Casado, Torrico y Medina, 2012).

Los diferentes medios de cultivo están formados por sustancias de enriquecimiento como hidratos de carbono, sangre, suero, bilis, etc. Un medio básico debe tener mínimo carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas, muchas veces es necesario vitaminas y otras sustancias inductoras de crecimiento (Casado et al., 2012). Las principales funciones de los componentes de los medios de cultivo son incrementar el valor nutritivo del medio, promover el crecimiento de microorganismos menos resistentes y detectar reacciones de fermentación de los mismos. Además se utilizan reactivos que actúan como indicadores detectores (Aquiahuatl et al., 2012).

3.8.1 Agar Nutritivo

Este medio de cultivo es generalmente usado para todo tipo de bacteria. Permanece sólido a altas temperaturas, las colonias que crecen en este medio son fáciles de distinguir. No contiene inhibidores de desarrollo bacteriano (Tabla 1) (Britania, 2010b).

Tabla 1. Propiedades del medio de cultivo agar nutritivo (Britania, 2010b).

Fórmula (g/L)		Instrucciones
Pluripeptona	5.0	Suspender 31 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
Extracto de carne	3.0	
Cloruro de sodio	8.0	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 ± 0.2		
Características del medio preparado		Ámbar claro a medio ligeramente opalescente.
Almacenamiento del medio		Deshidratado: 10 – 35°C Preparado: 2 - 8°C

3.8.2 Agar Hierro Triple Azúcar

Se emplea para detectar la fermentación de los hidratos de carbono, glucosa, lactosa y sacarosa, producción de gas y de ácido sulfhídrico. Debido a la fermentación de azúcares se producen ácidos, que son detectados por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno reaccionando con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (Tabla 2) (Britania, 2010a).

Tabla 2. Propiedades del medio de cultivo agar hierro triple azúcar (Britania, 2010a).

Fórmula (g/L)		Instrucciones
Extracto de carne	3.0	Suspender 62,5 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Distribuir en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profundo.
Pluripeptona	20.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Lactosa	10.0	
Sacarosa	10.0	
Glucosa	1.0	
Sulfato de Hierro y Amonio	0.2	
Tiosulfato de sodio	0.2	

Rojo de fenol	0.025	
Agar	13.0	
pH final: 7.3 ± 0.2		
Características del medio preparado	Color rojo	
Almacenamiento del medio	Deshidratado: 10 – 35°C Preparado: 2 - 8°C	

3.8.3 MR-VP Broth

Es un medio líquido clásico recomendado para realizar la prueba de Rojo – Metil y Voges-Proskauer (MR/VP) (Tabla 3) (BD, 2006).

Tabla 3. Propiedades del medio de cultivo MR/VP Broth (BD, 2006).

Fórmula (g/L)		Instrucciones
Peptona	7.0	Disolver 17g en 1L de agua destilada. Mezclar bien, distribuir en tubos de ensayo en cantidades de 10ml y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Incubar hasta 72 horas de 30 a 35°C
Dextrosa	5.0	
Fosfato dipotásico	8.0	
Agar	5.0	
pH final: 6.9 ± 0.2		
Características del medio preparado	Color amarillo	
Almacenamiento del medio	Deshidratado: 2 – 25°C Preparado: 2 - 8°C	

3.8.4 Agar de Almidón

Es utilizado para comprobar qué bacterias producen amilasa y son capaces de utilizar el almidón como nutriente (Tabla 4) (Azcapotzalco, 2014).

Tabla 4. Propiedades del medio de cultivo agar de almidón (Azcapotzalco, 2014).

Fórmula (g/L)		Instrucciones
Peptona	10.0	Disolver en 1L de agua destilada todos los componentes y ajustar a pH 7.2. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y posteriormente dispensar en platos Petri.
NaCl	5.0	
Extracto de carne	5.0	
Almidón soluble	2.0	
Agar-Agar	20g	
pH final: 7.2 ± 0.2		
Características del medio preparado		Color amarillo transparente
Almacenamiento del medio		Preparado: 2 - 8°C

3.9 Citohistoquímica

Del latín *cito* célula, *histo* tejido. Es una reacción que mediante la aplicación de uno o más reactivos químicos a la célula o tejido que se encuentra en condiciones determinadas permite la formación de productos coloreados, que mediante la ayuda del microscopio posibilita el reconocimiento de sustancias o grupos químicos en su ubicación real (Escobar, 2011; Diagcel, 2013).

Muchas de las células y tejidos no son visibles, por lo que es importante la ayuda de un microscopio óptico y muchas veces tinciones. El objetivo de la cito histoquímica es identificar la naturaleza química de los componentes celulares y tejidos, se utiliza principalmente sustancias que reaccionan con los componentes celulares dando como

resultado productos coloreados. Uno de los ejemplos más comunes es la coloración de Grocott utilizada para la tinción de hongos ya que se colorea los elementos más viejos o no viables, existen otros tipos de tinciones como la de Ziehl-Nielsen, Fontana Masson, picosirius, Verhoeff, entre otras (Peman, 2003; Rodak, 2005).

Antes de la reacción es importante preparar y fijar bien el tejido o célula evitando dañarlos ya que se puede obtener resultados falsos negativos, es decir que el producto deseado no se tiña. No necesariamente se debe seguir un protocolo determinado, uno mismo puede realizar su propio protocolo utilizando diferentes colorantes para la tinción (Rodak, 2005; Escobar, 2011).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En la Tabla 5 se pueden ver los resultados obtenidos por el ANOVA ($P=00$) y se comprueba que existe diferencias en el número de individuos entre cada uno de los tercios.

En la Tabla 6 se muestra que el número de individuos de *Tetranychus urticae* disminuye a medida que se alejan del sistema basal, ya que de los 21211 individuos contabilizados en los seis focos de infección, el 59,4% (12606) se encontró en el tercio inferior, mientras que en el tercio medio estuvo el 31,5% (6.677) y en el tercio superior el 9,1% (1.928). Para información adicional véase el Apéndice 1.

Tabla 5. ANOVA (Analysis of variance) y comparaciones múltiples entre tercios (Tercio superior (Ts), Tercio medio (Tm), Tercio bajo (Tb)) según el número de individuos.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9540318,111	2	4770159,056	46,265	,000
Dentro de grupos	1546578,167	15	103105,211		
Total	11086896,278	17			

COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: individuo

DMS

(I) tercio	(J) tercio	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ts	Tm	-791,5000*	185,3872	,001	-1186,643	-396,357
	Tb	-1779,6667*	185,3872	,000	-2174,810	-1384,523
Tm	Ts	791,5000*	185,3872	,001	396,357	1186,643
	Tb	-988,1667*	185,3872	,000	-1383,310	-593,023
Tb	Ts	1779,6667*	185,3872	,000	1384,523	2174,810
	Tm	988,1667*	185,3872	,000	593,023	1383,310

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla 6. Individuos de *T. urticae* distribuidos por tercio en cada uno de los focos de infección.

TERCIO	FOCO DE INFECCION						TOTAL
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Ts	4,3%	6,1%	12,1%	8,9%	9,0%	15,3%	9,1%
Tm	34,2%	25,9%	36,6%	28,8%	35,1%	30,7%	31,5%
Tb	61,5%	68,0%	51,3%	62,3%	55,8%	54,0%	59,4%

Ts = Tercio superior, Tm = Tercio medio, Tb = Tercio bajo.

En todos los tercios se encontró una mayor cantidad de huevos (62,6%) de *T. urticae*, observándose que a medida que se desarrolla el individuo hasta hacerse adulto va disminuyendo su presencia como lo muestra la Tabla 7. La relación hembras adultas a machos adultos es de 6 a 1, lo cual caracteriza a este tipo de población estudiada (Apéndice 1), mientras que el menor número de individuos en los tercios fueron los adultos (hembra y macho).

Tabla 7. Porcentaje total de los diferentes estadios de *T. urticae* presentes en cada uno de los tercios.

ESTADIO	TERCIOS			TOTAL
	Ts	Tm	Tb	
Huevos	4,6%	23,6%	34,3%	62,6%
Larvas	2,3%	5,0%	13,7%	21,0%
Protoninfas	1,0%	1,2%	8,4%	10,6%
Deutoninfas	0,8%	0,7%	2,6%	4,1%
Adulto H	0,3%	0,5%	0,7%	1,5%
Adulto M	0,1%	0,1%	0,1%	0,2%
TOTAL	9,0%	31,1%	59,9%	100%

H = hembra, M = macho, T = tercio, s = superior, m = medio, b = bajo

El mayor número de colonias con características de *Bacillus* spp. se encontraron en el estadio de huevo (9), seguido de la presencia en hembras adultas (3), deutoninfas (2) y en un solo individuo en los estadios de larva y de protoninfa, en total se localizaron 16 cepas con características de *Bacillus* spp. notándose la ausencia de éstas en los machos adultos (Tabla 8). Para mayor información, véase el Apéndice 2.

En la Tabla 9 se puede observar que de estas 16 cepas, la PSL 103 que se localizó en el tercio bajo del foco de infección en el estadio de huevo, fue la única Gram- (Apéndice 3) por lo que fue descartada para realizar las pruebas bioquímicas, mientras que todas las demás resultaron *Bacillus* spp. Gram+; en las pruebas bioquímicas de la catalasa (Apéndice 4), hidrólisis de almidón (Apéndice 5) y VogesProskauer (Apéndice 6) todas las cepas dieron positivo. En la fermentación de la glucosa, a excepción de la cepa PSL 109, todas tuvieron una reacción positiva. Las cepas PSL 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107 y 108 fermentan la lactosa y/o sacarosa, mientras que las cepas restantes no lo hacen y casi todas las cepas producen gas, menos la cepa PSL 113 (Tabla 9), para mayor información véase el Apéndice 7.

Tabla 8. Número de colonias con características de *Bacillus* spp. presentes en cada uno de los focos de infección, en los diferentes tercios y estadios.

ESTADIO	FOCO DE INFECCION																		TOTAL DE COLONIAS POR ESTADIO
	F1			F2			F3			F4			F5			F6			
	Ts	Tm	Tb	Ts	Tm	Tb	Ts	Tm	Tb	Ts	Tm	Tb	Ts	Tm	Tb	Ts	Tm	Tb	
Huevo	1	1	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	9
Larva	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Protoninfa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Deutoninfa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
Adulto H	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3
Adulto M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL DE COLONIAS EN TODOS LOS FOCOS DE INFECCIÓN Y ESTADIOS																			16

F1 a F6: Focos de infección, Ts: Tercio superior, Tm: Tercio medio; Tb: tercio bajo

Tabla 9. Reacción positiva y negativa de las cepas de *Bacillus* spp. frente a la tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

CÓDIGO CEPA	ESTADIO	TG	PC	HA	PRUEBA TSI			VP
					FG	FLS	PG	
PSL100	HUEVO	+	+	+	+	+	+	+
PSL101	HUEVO	+	+	+	+	+	+	+
PSL102	PROTONINFA	+	+	+	+	+	+	+
PSL103	HUEVO	-						
PSL104	HEMBRA	+	+	+	+	+	+	+
PSL105	HUEVO	+	+	+	+	+	+	+
PSL106	HUEVO	+	+	+	+	+	+	+
PSL107	LARVA	+	+	+	+	+	+	+
PSL108	HEMBRA	+	+	+	+	+	+	+
PSL109	HUEVO	+	+	+	-	-	+	+
PSL110	HUEVO	+	+	+	+	-	+	+
PSL111	DEUTONINFA	+	+	+	+	-	+	+
PSL112	DEUTONINFA	+	+	+	+	-	+	+
PSL113	HEMBRA	+	+	+	+	-	-	+
PSL114	HUEVO	+	+	+	+	-	+	+
PSL115	HUEVO	+	+	+	+	-	+	+
PORCENTAJE		94%	100%	100%	93%	53%	93%	100%

TG (Tinción de Gram), PC (Prueba de la catalasa), HA (Hidrólisis de almidón), FG (Fermentación de la glucosa), FLS (Fermentación de la lactosa y/o sacarosa), PG (producción de gas), VP (Voges Proskauer), + (Reacción positiva), - (Reacción negativa).

En la Tabla 10 se observa que las cepas PSL 104, PSL 108 y PSL 115 son las que presentaron mayor número de UFC/ml aplicado en cada uno de los tratamientos con individuos de *T. urticae*, De estas cepas únicamente la PSL104 es la que afectó totalmente a los individuos plaga al igual que las cepas PSL 113, 114 conjuntamente con el tratamiento positivo con Biosan®. Las partes anatómicas más afectadas de estos fueron las patas y el opistosoma, mientras que el área menos afectada fue el gnathosoma (Apéndice 8).

Tabla 10. Número de colonias por ml y determinación de UFC/ml de cada tratamiento aplicado.

CEPA PSL	N° de colonias/ml	UFC/ml
PSL100	221	2210000
PSL101	40	400000
PSL102	298	2976667
PSL104	563	5630000
PSL105	244	2440000
PSL106	121	1210000
PSL107	329	3290000
PSL108	600	5996667
PSL109	217	2173333
PSL110	294	2940000
PSL111	196	1956667
PSL112	106	1060000
PSL113	186	1863333
PSL114	205	2046667
PSL115	464	4643333

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

En la Tabla 11 se observa que los componentes 1 y 2 son los que mayor porcentaje de varianza explican (88,48%), (72,57% y 15,9% respectivamente) y los componentes 3 (9,07%) y 4 (2,45%) no se toman en cuenta para el presente análisis ya que su aporte es muy bajo. Las variables que explican la mayor varianza en el componente 1 son el Gnathosoma (0.624), el prodorsum (0.608) y en menor grado el opistosoma (-0.355); mientras que para el componente 2, las variables son el opistosoma (0.799) y las patas (0.528), lo cual se observa en la Figura 25 en la matriz de puntuación de componentes.

Tabla 11. Extracción de análisis de componentes principales.

Varianza total explicada									
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado			Sumas de rotación de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
	1	2,903	72,572	72,572	2,903	72,572	72,572	1,894	47,346
2	,636	15,909	88,481	,636	15,909	88,481	1,645	41,135	88,481
3	,363	9,071	97,551						
4	,098	2,449	100,000						

Método de extracción: análisis de componentes principales.

En la Figura 25 se observa que los tratamientos se agrupan conforme afectan patogénicamente al gnathosoma, prodorsum, opistosoma y/o patas en hembras adultas de *T. urticae*. Los tratamientos PSL 104, PSL 113, PSL 114 y Biosan® están estrechamente relacionados ya que afectan patogénicamente a las cuatro partes evaluadas, mientras que PSL 107 y PSL 110 se relacionan con el grupo anterior aunque afectan en menor proporción al gnathosoma y prodorsum. Los tratamientos PSL 105, 115, 109, 100 y 112 están relacionados porque presentan patogenicidad en el opistosoma y patas, mientras que las cepas PSL 101, 106 y 108 afectan ligeramente a las patas, PSL 111 afecta altamente

a las patas y muy poco al opistosoma y prodorsum; y los tratamientos PSL 102 y TESTIGO no presentan ningún tipo de patogenicidad en hembras adultas de *T. urticae*.

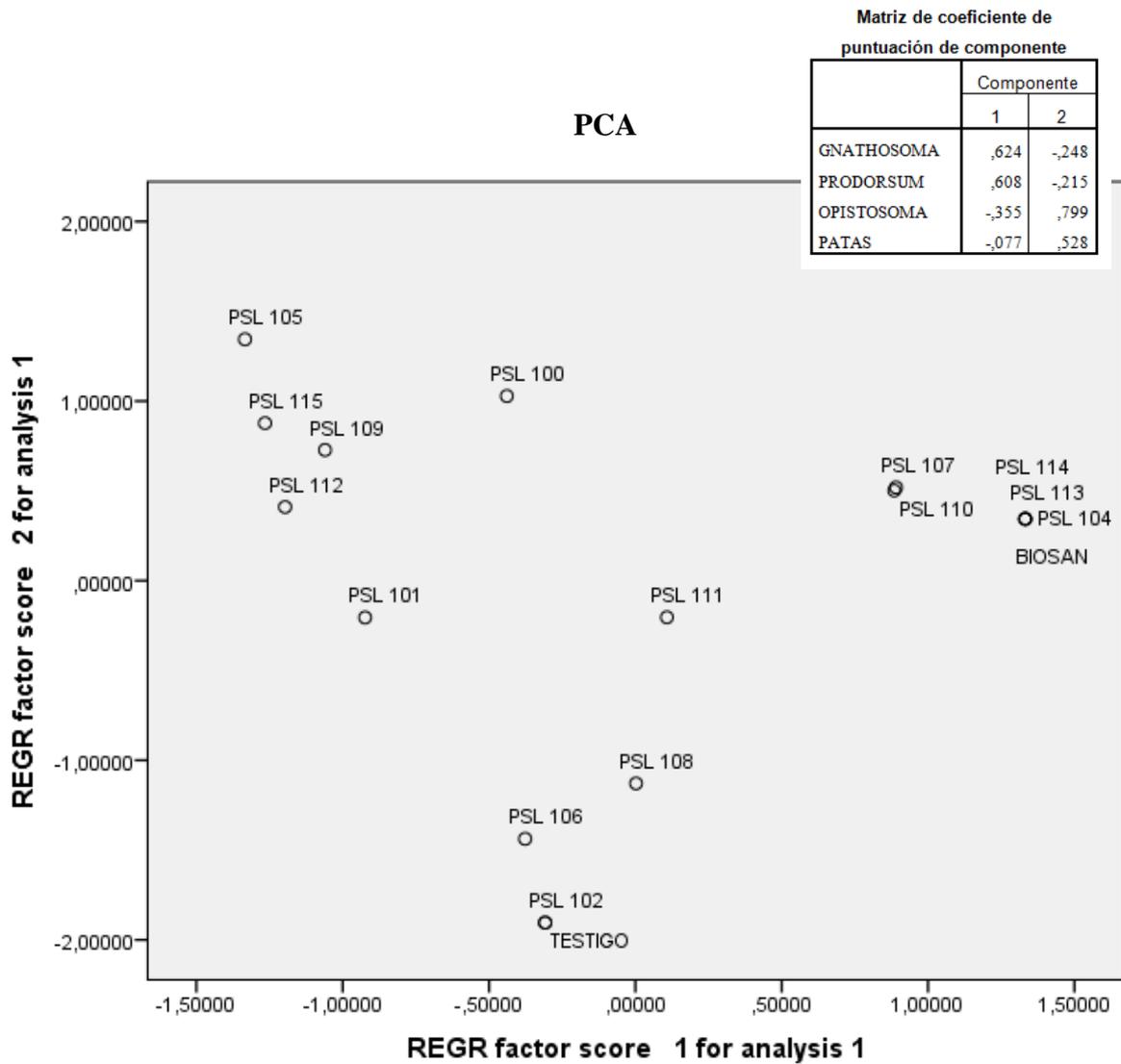


Figura 25. Análisis de componentes principales (PCA) según la patogenicidad de los diferentes tratamientos en el gnathosoma, prodorsum, opistosoma y patas de hembras de *T. urticae* en los componentes 1 y 2.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Según Rojas et al. (2011), el mayor número de individuos de *T. urticae* se localizan en el tercio bajo, los mismos resultados se determinaron en esta investigación en donde se localizó el 59,4% en el tercio inferior. Esta es una estrategia de los ácaros para multiplicarse y protegerse ya que se encuentran más aislados de los factores físicos, químicos del manejo cultural del cultivo (Falconí - Borja, 2013). La proporción sexual de *T. urticae* en rosas fue de 6 hembras por cada macho, Zhang (2003) cita que en promedio en diferentes cultivos se ha determinado que la relación sexual es de 3:1, 2003), se localizó una mayor cantidad de huevos (62,6%) debido a que el muestreo fue realizado cuando la temperatura dentro del invernadero fluctuaba entre los 20°C, el óptimo es entre 18 a 27°C para el desarrollo de *T. urticae* y las hembras durante su ciclo de vida (20 a 28 días) ovipositan de 100 a 120 huevos (Zhang, 2003).

Se determinaron 16 cepas con características de *Bacillus* spp., bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, aspecto harinoso, ceroso, seco o cremoso al igual que las cepas de *Bacillus* aisladas a partir de suelo (Carrera, 2009). Las pruebas bioquímicas realizadas en otras investigaciones (Cuervo, 2010 y Flores et al., 2011a) para la identificación de *Bacillus* Gram+ corroboran con los resultados obtenidos, a excepción de la cepa PSL 103 que se puede atribuir al aislamiento de una bacteria tipo pseudomona, las cuales morfológicamente presentan bordes ligeramente irregulares, aspecto mucoide y con características de pigmentos fluorescentes (Todar, 2012). Los estadios menos móviles de la plaga son donde se reporta la mayor cantidad de aislados bacterianos.

De las 15 cepas de *Bacillus* spp. encontradas la PSL 104, PSL 113 y PSL 114 fueron las que mejor control presentaron frente a hembras adultas, sin ser estas las de mayor número de UFC/ml a excepción de la PSL 104 que se encontró entre las tres cepas con mayor presencia de UFC. Las cepas más eficientes presentan una actividad controladora muy parecida a la del Biosan[®], que por su contenido de sustancias activas tanto bacterias como metabolitos el efecto de control se produce por bioacumulación lo

cual origina el colapso de centros nerviosos, digestivos y reproductivos provocando drásticamente una reducción de la actividad biológica de la plaga (Biocontrol Science, 2009b).

Al igual que Bactomite[®], un producto a base de *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* el cual inicia su efectividad en los estadios menos activos de la plaga y finalmente en estadios finales, donde los ingredientes activos son transportados por los sistemas de conducción de la célula epidérmica, hacia el flujo citoplasmático, disolviendo órganos, células y tejidos (Biocontrol Science, 2009a); estas dos últimas reacciones fueron notables en los individuos tratados con las cepas PSL 104, 113 y 114.

Se pudo determinar que las bacterias tipo *Bacillus* spp., están asociadas con la plaga *T. urticae*, donde este tipo de asociación puede traducirse en sistemas patológicos de relevancia para la implementación de programas de control biológico.

En la Comunidad Andina de Naciones (2001) se adoptó una política de que los países de la comunidad andina se comprometían a procesos de conservación de microorganismos *ex situ*. La investigación del presente documento aporta con el conocimiento del microcosmos en uno de los más importantes cultivos de exportación del país, quienes a pesar de la intensa carga agroquímica se puede concluir de que existe una fuente sustentable de manejo de problema fitosanitarios.

Además se indica la eficiencia de una tecnología emergente en función de la problemática actual del control de ácaros patogénicos en el cultivo de rosas de exportación. Actualmente no existen moléculas químicas convencionales que persistan por más de cuatro semanas en su eficiencia de control de esta plaga principalmente a causa del apareamiento de resistencia (*L. Moncayo, com. pers. 16 de septiembre del 2014*).

Una de las importantes observaciones de este estudio es la de haber localizado eficientes sistemas de control por medio de la aplicación de efectores biocatalíticos bacterianos (EBc[®]) en la que se anula toda posibilidad al apareamiento de algún

mecanismos de resistencia. A demás de que se determinó que se puede contar con una estrategia de manejo en la cual los eventos de toxicidad hacia el ser humano son prácticamente nulos.

CONCLUSIONES

- Se identificaron 15 cepas de *Bacillus* spp. mediante caracterización morfológica y reconfirmación por Tinción de Gram y cuatro pruebas bioquímicas (Prueba de la catalasa, Hidrólisis de almidón, Prueba TSI y Voges Proskauer) en la cuales se obtuvieron resultados positivos.
- Mediante la técnica de citohistoquímica se pudo evaluar escenarios anatómicos patogénicos de *Bacillus* spp. a partir de *Tetranychus urticae*, en los cuales se observó ruptura de las paredes externas, precipitación de contenido celular, entre otras, siendo las cepas PSL 104, 113 y 114 las mejores ya que actuaron de igual manera que el tratamientos de control positivo con Biosan[®].

RECOMENDACIONES

- Establecer estudios similares en función de la búsqueda de escenarios de la variabilidad bacteriana del género *Bacillus* para ampliar el espectro de mecanismos y modos de acción destinado al control de importantes plagas agrícolas y monitorear especímenes bacterianos tipo *Bacillus thuringiensis* en plantaciones florícolas de tipo convencional.
- Determinar tanto la dosis como el tiempo letal 50 (LD₅₀ y TL₅₀) de las cepas más eficientes.
- Evaluar las cepas de mejor comportamiento en combinación para definir su potencialidad como controladores biológicos.
- Evaluar la presencia de las cepas bacterianas detectadas en el transcurso de periodos climatológicos extremos caracterizados por condiciones de deltas con afección a plantas y organismos en general.
- Determinar el comportamiento patogénico de *Bacillus* spp. en función del ciclo de la plaga y evaluar eventos de patogenicidad en otros estadios de *T. urticae* para determinar de qué manera se ve afectado cada uno de los sistemas internos y morfología externa de la plaga.
- Hacer pruebas en campo de las cepas que se evidenciaron como las más letales en laboratorio y determinar su efectividad en programas de manejo de fincas de flores en control biológico.
- Realizar la extracción de ingredientes activos bacterianos de las cepas más eficientes.
- Determinar la especie y variedad de *Bacillus* de las cepas aisladas a nivel específico utilizando técnicas como PCR.

LITERATURA CITADA

- Aguavil, J. y Enríquez, S. 2011. Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en pollos Broiler Ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. Santo Domingo de los Tsáchilas - Ecuador. 105 Pp.
- Almaguel, L. 2002. Morfología, taxonomía y diagnóstico fitosanitario de ácaros de importancia agrícola. Curso introductorio a la acarología aplicada. Laboratorio de Acarología. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). División de Biología. Cuba. 84 Pp.
- Amjad, M; Hamid, M; Afzal, M; Altaf, M. y Javed, N. 2012. Synergistic effect of some entomopathogenic fungi and synthetic pesticides, against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pakistan J. Zool.* Vol. 44(4). Pp. 977 – 984.
- Aquiahuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F. y Salazar, M. 2012. Manual de prácticas de laboratorio microbiología general. División de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F. 78Pp.
- Argolo, P. 2012. Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Departamento de Producción Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 140 Pp.
- Azcapotzalco. 2014. Apéndice “A” composición y preparación de medios de cultivo. Microbiología aplicada. Manual de laboratorio. Universidad autónoma metropolitana. México. 23 Pp.
- Badii, M. y Abreu, J. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience.* 1(1). ISSN 1870 – 557X. Pp. 82 – 89.

- Bayer CropScience. 2008. Principales especies de ácaros en los cultivos de cítricos y su control. Manual de campo para el reconocimiento de ácaros en citricultura y su control con envidor. Bayer CropScience, S.L. 72 Pp.
- BD. 2006. BBL™ MR-VP Broth. [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007474\(06\)\(0506\).pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007474(06)(0506).pdf) Acceso: 15.8.2014
- Biocontrol Science. 2009a. Ficha técnica BACTOMITE®, acaricida de amplio espectro. Producto con la garantía del Departamento de Agricultura y Tecnología BIOSOFTWARE (Alemania). Distribuido por BioCiencia (BC) biociencia@biosoftware.de 2 Pp.
- Biocontrol Science. 2009b. Ficha técnica BIOSAN®, acaricida – insecticida. Producto con la garantía del Departamento de Agricultura y Tecnología BIOSOFTWARE (Alemania). Distribuido por BioCiencia (BC) biociencia@biosoftware.de 6 Pp.
- Britania. 2010a. Agar Hierro Triple Azúcar (T.S.I. Agar). http://www.britanialab.com/productos/332_hoja_tecnica_es.pdf Acceso: 15.8.2014
- Britania. 2010b. Nutritivo Agar. <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/nutritivoagar.htm> Acceso: 15.8.2014
- Cabrera, G. 2010. Introducción al control biológico, Definiciones, historia y principios ecológicos. Departamento de ecología, genética y evolución. Ciudad universitaria. Ciudad autónoma de buenos aires. Argentina. 52 Pp.
- Caldas, L. 2010. Tinción de Gram. Programas Medicina y Enfermería. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca. Colombia. 2 Pp.
- Calvo, P y Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Departamento Académico de

- Biología. Universidad Nacional Agraria la Molina. Ecología Aplicada. Lima – Perú. Pp. 31 – 39.
- Carrera, M. 2009. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba – Ecuador. 87 Pp.
- Casado, M., Torrico, G. y Medina, M. 2012. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. México. 42 Pp.
- Castellanos, J., Ortiz, L., Oliva, P., Dueñas, M., Fresneda, J., Fraga, S. y Meléndez, O. 2005. Estudios relacionados con el uso del *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. Instituto de Investigación Fundamentales en Agricultura Tropical. La Habana – Cuba. 10 Pp.
- CEI BIOTIC. 2014. Prácticas Online de Microbiología para Farmacéutica. Prueba de la catalasa. Universidad de Granada. España. 2 Pp.
- Cercenado, E. y Cantón, R. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica. *EIMC*. ISBN 978-84-614-7932-0. 52 Pp.
- Cerna, E., Landeros, J., Ochoa, Y., Luna, J., Vázquez, M. y Ventura, O. 2009. Tolerancia de ácaro *Tetranychus urticae* Koch a cuatro acaricidas de diferente grupo toxicológico. *Investigación y Ciencia*. 44. Pp. 4 – 10.
- Cisneros, F. 1995. 8 Control Biológico. http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/CPA_8_PG_102-147.pdf Acceso: 7/08/2014
- Comunidad Andina de Naciones (CAN). 2001. Biodiversidad. Tercer Taller “Conservación *ex situ*”. Quito, 29 al 31 de mayo de 2001. Organizado por la Secretaría General de la CAN, Banco Interamericano de Desarrollo, FUNDECO, Instituto de Ecología y Ministerio del Ambiente de Ecuador. Quito - Ecuador.

- Cory, J. y Franklin, M. 2012. Evolution and the microbial control of insects. *Evolutionary applications*. Canadá. Blackwell Publishing Ltd 5 (2012), Pp. 455 – 463.
- Cuervo, J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carreara de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá – Colombia. 28 Pp.
- Diagcel. 2013. Colorações citoquímicas e histoquímicas específicas. Paulo Campos Carneiro. Diagnósticos Médicos. Brasil. <http://diagcel.com.br/exames/citoquimicas-e-histoquimicas/> Acceso: 22/08/2014
- Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones. 2013. Análisis sectorial de flores. Pro Ecuador. 37 Pp.
- Draganova, S. y Simova, S. 2010. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae) to isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Pestic. *Phytomed.* Vol. 25(1). Pp. 51 -57.
- Escobar, M. 2011. Reacciones Citoquímicas. <http://es.scribd.com/doc/50840850/REACCIONES-CITOHISTOQUIMICAS> Acceso: 26/08/2014
- Espinosa, P. 2013. Evaluación del efecto de dos bioestimulantes en el cultivo de rosas (*Rosa sp.*) variedades Charlotte y Konffeti. Cayambe, Pichincha. Agronomía, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador. 91 Pp.
- Ezziyyani, M., Sid, A., Pérez, C, Requena, M. y Candela, M. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Tecnología de producción. 8 Pp.
- Faddin, M. 2003. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. ISBN 950-06-1572-X. Pp. 74.

- Falconí-Borja, C. 2013. Protocolo No. 24472. Patología microbiana de ácaros fitopatógenos. Plantsphere Laboratories (PSL)-BIONIKA. Quito – Ecuador. 2 Pp.
- Falconí-Borja, C. 2014a. Protocolo No. 24481. Aplicación de microorganismos en individuos plaga sanos para determinar la eficiencia de la mejor cepa. Plantsphere Laboratories (PSL)-BIONIKA. Quito – Ecuador. 3 Pp.
- Falconí-Borja, C. 2014b. Protocolo No. 24482. Protocolo de inoculación de *Bacillus thuringiensis* var. aracni en *Tetranychus urticae*. Plantsphere Laboratories (PSL)-BIONIKA. Quito – Ecuador. 4 Pp.
- Fernández, M; Peña, G; Romo, A; Hernández, V; Bravo, A. & Pérez, D. 2010. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. *Journal of Insect Science*. 10(186). Pp 1 – 6.
- Flores, A., Egúsqüiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D., Jesus, Y. y Patiño A. 2011a. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. Facultad de Farmacia y Bioquímica. *Ciencia e Investigación*. Chile. 14(1). Pp. 29 – 34.
- Flores, R; Mendoza, R; Landeros, J; Cerna, E; Robles, A. y Isiordia, N. 2011b. Caracteres morfológicos y bioquímicos de *Rosa x hybrida* contra *Tetranychus urticae* Koch en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. N°3. Pp. 473 – 482.
- FMC Agroquímica. 2009. Ácaros fitófagos. Boletín técnico informativo. México. 9 pp.
- Fuentes, C. 2007. Los postulados de Koch: Revisión histórica y perspectiva actual. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. *RCCV*. Vol. 1(2). 5 Pp.
- García, M. y Silva, M. 2004. Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos. Identificación bioquímica y tipado microbiológico. Unidad didáctica 55. Pp. 346.

- Gómez, R. s/a Laboratorio 4: Tinción de microorganismos. Recinto Universitario de Mayaguez. Universidad de Puerto Rico. <http://academic.uprm.edu/~lrios/3725/Ejercicio4.pdf> Acceso: 29.05.2014
- Google maps. (2014). Mapas de ubicación de la Florícola Naranja Roses S.A. y PSL. Acceso 04/06/2014.
- Gutiérrez, A., Robles, A., Santillan, C., Ortíz, M. y Cambero, O. 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Biociencias*. ISSN 2007 - -3380. 2(3). Pp. 102 -112.
- Holt, J., Sneath, P., Mair, N. y Sharpe, M. 1984. Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. MD, USA. Pp. 965-1599.
- Lara, I. 2008. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* y su uso como bioinsecticida. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. 14 Pp.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. y Sánchez, L. 2011. *Bacillus* spp., perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá – Colombia. Pp. 177 – 187.
- Leidy, M. 2010. Usos como organismo modelo. *Bacillus subtilis* clasificación. <http://bacillus8.blogspot.com/2010/04/bacillus-subtilis-clasificacion.html> Acceso: 7/08/2014
- Lozada, A. 2011. Evaluación de productos orgánicos para el control de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*). Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador. 101 Pp.
- Macke, E; Magalhaes, S; Do-Thi, H; Luciano, A; Frantz, A; Facon, B. y Olivieri, I. 2011. Sex allocation in haplodiploids is mediated by egg size: evidence in the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of the Royal Society*. Vol. 278. Pp. 1054 – 1063.

- Manacorda, A., Cuadros, D. y Álvarez, A. 2007. Manual práctico de microbiología. Tomo I: Microbiología Ambiental. Capítulo 4, Coloraciones.
- Márquez, F. 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias. Escuela de ciencias. Valdivia – Chile. 74 Pp.
- Niedmann, L. y Meza, L. 2006. Evaluation of native strains of *Bacillus thuringiensis* as an alternative of integrated management of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) in Chile. *Agricultura técnica*. Chile. 66(3). Pp. 235- 246.
- Ongley, E. 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55). Capítulo 4: Los plaguicidas, en cuanto contaminantes del agua. Burlington – Canadá. [http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm#capítulo 4 los plaguicidas](http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm#capítulo_4_los_plaguicidas), en cuanto contaminantes del agua **Acceso:** 05/03/2013
- Peman, J. 2003. Diagnóstico, ¿ Qué se puede esperar del diagnóstico anatomopatológico de la aspergilosis invasora?. *Revista Iberoamericana de Micología*. 5 Pp.
- Porcuna, J., Boix, C. y Jiménez, A. 2003. Control biológico de plagas mediante el manejo de insectos útiles: los insectarios de la CAPA. Servicio de Sanidad Vegetal. 9 Pp.
- Quezada, F., Roca, W., Szauer, M., Gómez, J. y López, R. 2005. Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad. Unidad de Publicaciones de la CAF. Caracas – Venezuela. 114 Pp.
- Ramón, V. y Rodas, F. 2007. El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. Quito – Ecuador. 35 Pp.
- Realpe, M., Hernández. y Agudelo, C. 2002. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá – Colombia. 4 Pp.

- Rodak, F. 2005. Hematología, Fundamentos y aplicaciones clínicas. Capítulo 28. 2da edición. Editorial Médica Panamericana.
- Rodríguez, A., Guillén, C., Uva, V., Segura, R., Laprade, S. y Sandoval, J. 2010. Aspectos a considerar sobre el control biológico. Hoja divulgativa N°2. Costa Rica. 2Pp.
- Rojas, F., Torres, P., Rodríguez, D. y Cantor, F. 2011. Efecto de tres densidades de *Tetranychus urticae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) sobre el crecimiento de plantas de rosa. Ingeniería Agroecológica. UNIMINUTO.
- Sá, P. 2012. Gestión de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. España. 140 Pp.
- Sauka, D. y Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*. Argentina. Vol. 40. Pp. 124 – 140.
- Soberón, M. y Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*. 14(303). Pp. 1 – 12.
- Tamez, P., Iracheta, M., Pereyra, B., Galán, L., Gómez, R., Tamez, R. y Rodríguez, C. 2005. Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros. Universidad Autónoma de Nuevo León. *Ciencia*. Nuevo León – México. 8 (4). Pp. 477 – 482.
- Todar, K. 2012. *Pseudomonas aeruginosa*. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Wisconsin – Estados Unidos. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> Acceso: 26/07/2014
- Toro, D. 2005. Manual para la introducción al laboratorio de microbiología. Universidad de Caldas. ISBN 958-8231-57-4. Colombia. Pp. 81-82.
- Torres, D. y Capote, T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista*

Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. Asociación Española de Ecología Terrestre. Pp. 1-5.

- Trevisoli, L., Teixeira, R., Linhares, V., Trevisoli, A., Aparecido, G., Pagliusi, Y. y Polanczyk, R. 2014. Compatibility among insecticides, acaricides and *Bacillus thuringiensis* used to control *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton fields. *Academic Journals of Agricultural Research*. 9 (11). Pp. 941 – 949.
- Vásquez, C. 2014. Cultivos de rosas en el Ecuador. <http://www.puce.edu.ec/economia/efi/index.php/economia-internacional/14-competitividad/177-cultivos-de-rosas-en-el-ecuador> Acceso: 05/11/2014
- Veitía, M., Feitó, E., Benítez, M., García, V. e Izquierdo, D. 2003. Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* en el control del ácaro del vaneado del bulbo *Eriophyes tulipae* Keifer en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.). *Fitosanidad*. 7(2). Pp. 37 – 41.
- Villacide, J. y Corley, J. 2012. Manejo integrado de plagas forestales. Laboratorio de ecología de insectos. EEA INTA Bariloche - Argentina. ISSN 1851 – 4103. 21 Pp.
- Vitelli, J., Gajardo, R., Lage, L., Fajardo, Y., Dorta, B. y Rodríguez, Vidal. 2010. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. ISSN 1315 – 2556. Venezuela. Pp. 90 – 96.
- White, S., Clarkson, J., Skirvin, D. y Napier, R. 2012. Guidelines for the use on biological control agents vs. chemical control for specific pests and diseases in novel greenhouse structures. Universidad de Warwick. 37 Pp.
- Yáñez, P., Escoba, A., Molina, C. y Zapata, G. 2014. Comparación de la actividad acaricida de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum* y

Thymus vulgaris contra *Tetranychus urticae*. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. 19(1). 21-33.

Zapata, S. 2012. Manual de laboratorio, microbiología de alimentos. Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. 87 Pp.

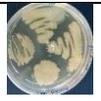
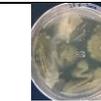
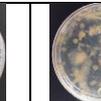
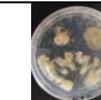
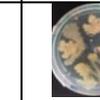
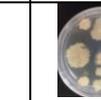
Zhang, Z. 2003. Mites of Green houses. Identification, biology and control. School of Life Sciences, Fudan University. CABI Publishing. China, UK, USA. 256 Pp.

APÉNDICES

Apéndice 1. Detalle del número de individuos de cada uno de los focos de infección (F1, F2, F3, F4, F5, F6) por estadios encontrados en cada uno de los tercios: superior (Ts), medio (Tm) y bajo (Tb) de la variedad de rosa Freedom.

F1					F2					F3				
ESTADIOS	Ts	Tm	Tb	TOTAL INDIVIDUOS POR ESTADIO	ESTADIOS	Ts	Tm	Tb	TOTAL INDIVIDUOS POR ESTADIO	ESTADIOS	Ts	Tm	Tb	TOTAL INDIVIDUOS POR ESTADIO
Huevos	89	932	1361	2382	Huevos	143	882	1281	2306	Huevos	154	882	1102	2138
Larvas	31	214	562	807	Larvas	65	145	384	594	Larvas	114	171	290	575
Protoninfas	15	60	177	252	Protoninfas	36	84	1223	1343	Protoninfas	44	28	79	151
Deutoninfas	16	24	122	162	Deutoninfas	20	37	141	198	Deutoninfas	39	13	70	122
Adulto H	5	23	33	61	Adulto H	10	17	25	52	Adulto H	15	20	20	55
Adulto M	2	2	5	9	Adulto M	1	2	4	7	Adulto M	3	1	5	9
TOTAL INDIVIDUOS POR TERCIO	158	1255	2260	3673	TOTAL INDIVIDUOS POR TERCIO	275	1167	3058	4500	TOTAL INDIVIDUOS POR TERCIO	369	1115	1566	3050
F4					F5					F6				
ESTADIOS	Ts	Tm	Tb	TOTAL INDIVIDUOS POR ESTADIO	ESTADIOS	Ts	Tm	Tb	TOTAL INDIVIDUOS POR ESTADIO	ESTADIOS	Ts	Tm	Tb	TOTAL INDIVIDUOS POR ESTADIO
Huevos	97	712	1246	2055	Huevos	129	826	1062	2017	Huevos	375	836	1309	2520
Larvas	107	185	581	873	Larvas	71	167	437	675	Larvas	107	185	448	740
Protoninfas	48	14	119	181	Protoninfas	35	39	96	170	Protoninfas	27	41	118	186
Deutoninfas	30	14	68	112	Deutoninfas	29	22	89	140	Deutoninfas	30	39	71	140
Adulto H	7	18	23	48	Adulto H	10	17	18	45	Adulto H	17	18	24	59
Adulto M	2	2	6	10	Adulto M	2	3	4	9	Adulto M	3	2	3	8
TOTAL INDIVIDUOS POR TERCIO	291	945	2043	3279	TOTAL INDIVIDUOS POR TERCIO	276	1074	1706	3056	TOTAL INDIVIDUOS POR TERCIO	559	1121	1973	3653

Apéndice 2. Cepas con características de *Bacillus* spp. aisladas a partir de *Tetranychus urticae* en PDA después de 48 horas.

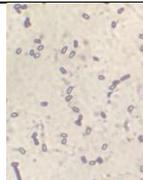
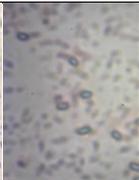
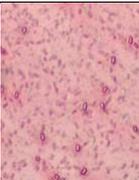
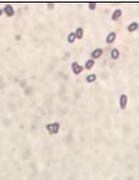
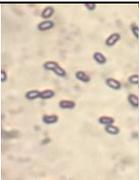
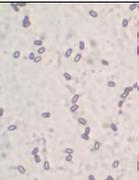
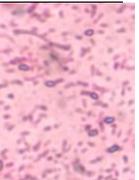
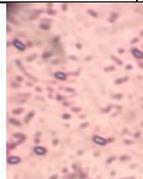
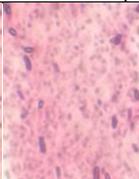
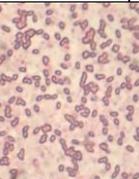
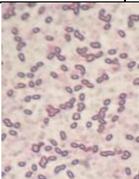
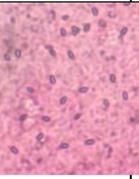
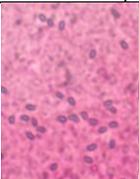
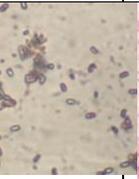
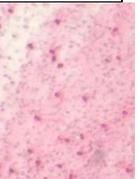
							
PSL100	PSL101	PSL102	PSL103	PSL104	PSL105	PSL106	PSL107
							
PSL108	PSL109	PSL110	PSL111	PSL112	PSL113	PSL114	PSL115

Descripción morfológica de cepas con características de *Bacillus* spp. aisladas a partir de *T. urticae*.

CEPA	FORMA	COLO R marfil claro/crema	TEXTURA seca/cremosa	BORDE ondulado/lobulado	SUPERFICIE plano/planoconvexa /convexa
PSL100	Irregular	Crema claro	Seca	Lobulado	Plana
PSL101	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Planoconvexa
PSL102	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Planoconvexa
PSL103	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Planoconvexa
PSL104	Irregular	Marfil	Seca	Lobulado	Plana
PSL105	Irregular	Crema claro	Seca	Lobulado	Plana
PSL106	Irregular	Crema claro	Seca	Lobulado	Planoconvexa
PSL107	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Convexa
PSL108	Irregular	Crema claro	Seca	Lobulado	Plana
PSL109	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Convexa
PSL110	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Convexa

PSL11 1	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Convexa
PSL11 2	Irregular	Marfil	Cremosa	Lobulado	Planoconvexa
PSL11 3	Irregular	Crema claro	Seca	Lobulado	Plana
PSL11 4	Irregular	Marfil	Seca	Lobulado	Plana
PSL11 5	Irregular	Crema claro	Seca	Lobulado	Plana

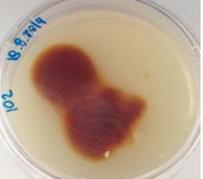
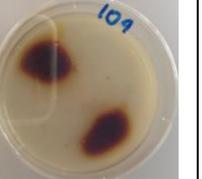
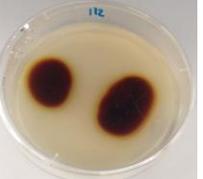
Apéndice 3. Fotos de Tinción Gram de cada una de las cepas. Los Bacilos de color morado determinan que las bacterias son Gram +, mientras que los Bacilos que presentan sus paredes de color rosado son bacterias Gram -.

							
1000X	1000X	1000X	1000X	1000X	1000X	1000X	1000X
PSL100 Gram +	PSL101 Gram +	PSL 102 Gram +	PSL103 Gram -	PSL104 Gram +	PSL105 Gram +	PSL106 Gram +	PSL107 Gram +
							
1000X	1000X	1000X	1000X	1000X	1000X	1000X	1000X
PSL108 Gram +	PSL109 Gram +	PSL110 Gram +	PSL111 Gram +	PSL112 Gram +	PSL113 Gram +	PSL114 Gram +	PSL115 Gram +

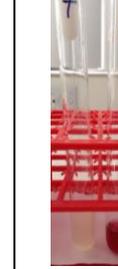
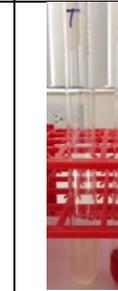
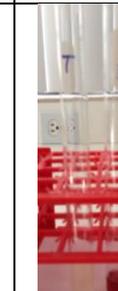
Apéndice 4. Prueba de la catalasa de cada una de las cepas. La presencia de burbujas determina que la prueba es positiva.

							
PSL100 Prueba +	PSL101 Prueba +	PSL102 Prueba +	PSL104 Prueba +	PSL105 Prueba +	PSL106 Prueba +	PSL107 Prueba +	
							
PSL108 Prueba +	PSL109 Prueba +	PSL110 Prueba +	PSL111 Prueba +	PSL112 Prueba +	PSL113 Prueba +	PSL114 Prueba +	PSL115 Prueba +

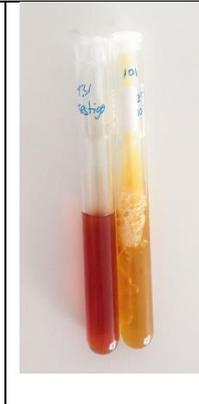
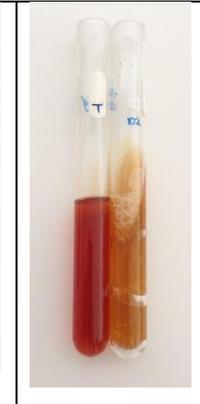
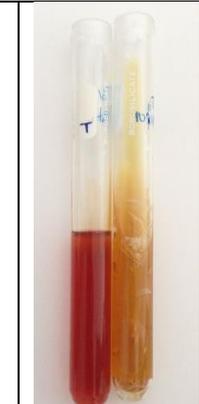
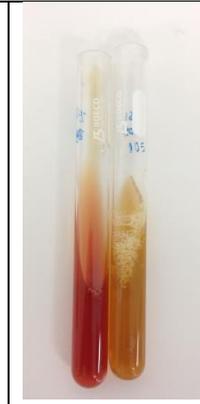
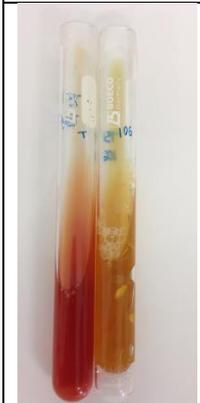
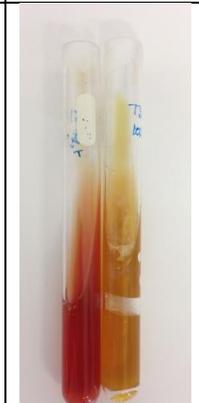
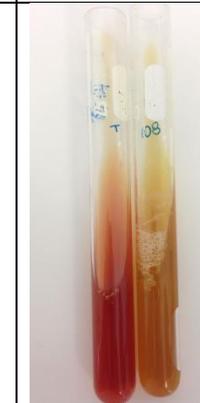
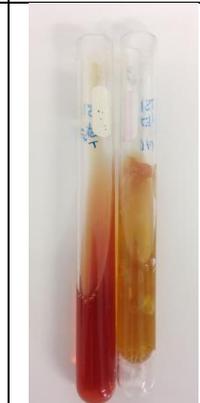
Apéndice 5. Prueba de la hidrólisis de almidón de cada una de las cepas. La formación de un halo transparente alrededor de las gotas determina que la prueba es positiva.

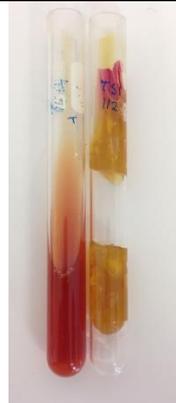
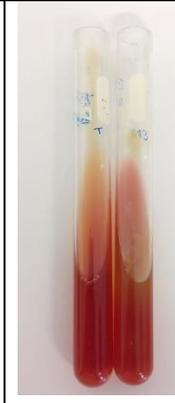
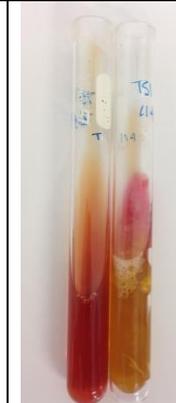
				
PSL100 Prueba +	PSL101 Prueba +	PSL102 Prueba +	PSL104 Prueba +	PSL105 Prueba +
				
PSL106 Prueba +	PSL107 Prueba +	PSL108 Prueba +	PSL109 Prueba +	PSL110 Prueba +
				
PSL111 Prueba +	PSL112 Prueba +	PSL113 Prueba +	PSL114 Prueba +	PSL115 Prueba +

Apéndice 6. Prueba de Voges Proskauer. El cambio del medio de color amarillo (tubo izquierdo) a rojo-fucsia determina que la prueba es positiva.

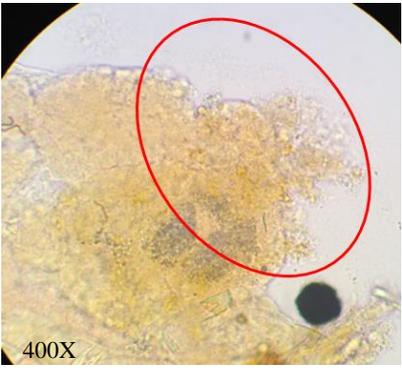
				
PSL100 Prueba +	PSL101 Prueba +	PSL102 Prueba +	PSL104 Prueba +	PSL105 Prueba +
				
PSL106 Prueba +	PSL107 Prueba +	PSL108 Prueba +	PSL109 Prueba +	PSL110 Prueba +
				
PSL111 Prueba +	PSL112 Prueba +	PSL113 Prueba +	PSL114 Prueba +	PSL115 Prueba +

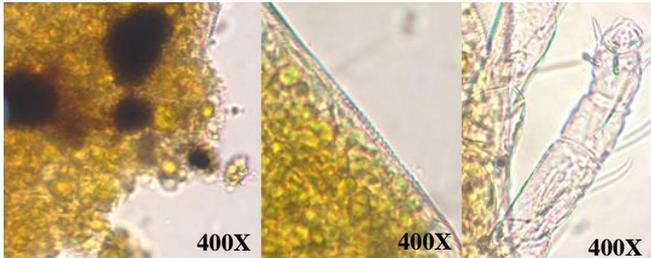
Apéndice 7. Prueba de la fermentación de la glucosa (pico de flauta rojo y fondo amarillo); glucosa, lactosa y/o sacarosa (pico de flauta amarillo y fondo amarillo); producción de gas de cada una de las cepas (ruptura del medio y/o producción de burbujas). Tubo de color rojo es el color del medio original.

				
PSL100 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL101 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL102 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL104 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL105 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +
				
PSL106 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL107 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL108 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa + Gas +	PSL109 Glucosa - Lactosa y/o sacarosa - Gas +	PSL110 Glucosa + Lactosa y/o sacarosa - Gas +

				
PSL111	PSL112	PSL113	PSL114	PSL115
Glucosa + Lactosa y/o sacarosa - Gas +	Glucosa + Lactosa y/o sacarosa - Gas +	Glucosa + Lactosa y/o sacarosa - Gas -	Glucosa + Lactosa y/o sacarosa - Gas +	Glucosa + Lactosa y/o sacarosa - Gas +

Apéndice 8. Patogenicidad en hembras adultas de *T. urticae*.

	
<p>Ruptura de la pared externa del Prodorsum. Cepa PSL100</p>	<p>Ruptura de la pared externa del opistosoma por medio de la digestión enzimática. Cepa PSL105</p>
	
<p>Reacción patológica interna. La preparación citohistoquímica muestra el ácaro teñido lo cual indica que está afectado totalmente, a más de la ruptura de todo el gnathosoma y parte del prodorsum. Cepa PSL107</p>	<p>Alteración en la pared externa del prodorsum. Cepa PSL109</p>

	
<p>Pata I rota e irregularidades en su tejido externo, además de una alta conglomeración bacteriana. Cepa PSL110</p>	<p>Alta precipitación de contenido celular, cuerpo de la plaga totalmente afectado. Cepa PSL113</p>
	
<p>Ácaro totalmente afectado, en el que se observa alta presencia de bacteria en el interior de las partes afectadas debido a la coloración. Cepa PSL114</p>	<p>Efectos del testigo positivo BIOSAN[®], afección en el gnathosoma, prodorsum y pata I</p>