



Pontificia Universidad Católica Del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES “ECAA”

INFORME FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

Evaluación de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* aisladas de la rizósfera de papa
(*Solanum tuberosum*) para el control de *Phytophthora infestans*.

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGROPECUARIA

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

3. Conservación de la Biodiversidad

3.1 Estudio, manejo y conservación de la biodiversidad

AUTORA: PAMELA ALEXANDRA VILAÑEZ MONTENEGRO

ASESOR: M.Cs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, NOVIEMBRE 2019



CERTIFICACIÓN DEL ASESOR DE TESIS

Ibarra, 15 de noviembre de 2019

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade
ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f):

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade
C.C.: 100265839-9



PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f):

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 100265839-9

(f):

M.Sc. Diego Manuel León Tapia

C.C.: 171166889-5

(f):

Mgs. Maritza de los Ángeles Mier Quiroz

C.C.: 100287828-6



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Pamela Alexandra Vilañez Montenegro, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 15 de noviembre de 2019

(f): 

Pamela Alexandra Vilañez Montenegro

C.C.: 100434617-5



AUTORÍA

Yo, Pamela Alexandra Vilañez Montenegro, portadora de la cédula de ciudadanía N° 100434617-5, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad de la autora, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

(f): 

Pamela Alexandra Vilañez Montenegro

C.C.: 100434617-5



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Pamela Alexandra Vilañez Montenegro, con C.C: 100434617-5, autora del trabajo de grado intitulado: “Evaluación de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*) para el control de *Phytophthora infestans*.”, previo a la obtención del título profesional de “Ingeniera Agropecuaria”, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA)

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 15 de noviembre de 2019

(f): 

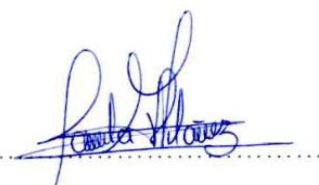
Pamela Alexandra Vilañez Montenegro

C.C. 100434617-5



DECLARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ÉTICO DE LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “Evaluación de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*) para el control de *Phytophthora infestans*.”, lo propuesto en el Código de ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha de 15 de enero de 2018.

(f): 

Pamela Alexandra Vilañez Montenegro

C.C. 100434617-5

Carrera: Ingeniería Agropecuaria



DEDICATORIA

Este presente trabajo investigativo se lo dedico a mis padres, por brindarme su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, por ser los inspiradores y darme fuerzas para continuar en este proceso de obtener uno de mis anhelos más deseados; gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, es un orgullo y privilegio ser su hija, son los mejores.

A mis hermanos, María Fernanda (QEPD), Paola y Sebastián Vilañez Montenegro, por siempre estar presentes acompañándome, por extenderme su mano en los momentos más difíciles; además de entregarme su amor, cariño y apoyo incondicional a lo largo de toda esta etapa de mi vida, de verdad mil gracias, siempre los llevo en mi corazón.

A todas esas personas que forman parte de mi familia y amigos, que con sus oraciones, consejos y palabras de aliento han hecho de mí una mejor persona, y de una u otra manera me han acompañado en mis metas, logrando así que este trabajo se realice con éxito.

Pamela Vilañez Montenegro.



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición a fortalecido mi corazón e iluminado mi mente, por nunca abandonarme, por colocar en mi camino a personas que han sido un soporte y compañía durante toda mi etapa universitaria, por brindarme esa luz incondicional que ha guiado mi camino y por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Agradezco a mis padres por su comprensión y por las incontables veces que me brindaron su apoyo en todas las decisiones que he tomado en mi vida, a mis hermanos por llenarme de alegría día tras día y compartir conmigo este largo proceso; y como no, a mis amigos, y hoy colegas: Karen Andrade, Edwin Puente, Erick Chiza y Brayan Terán, gracias infinitas por cada experiencia vivida junto a ustedes; ¡hoy podemos decir que lo logramos!

Gracias, de manera especial al Magister Santiago Mafla, por compartir su amplia experiencia y conocimientos que me orientaron al correcto desarrollo y culminación de este trabajo de titulación, que si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin su cooperación.

Y por supuesto a mi querida Universidad, la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, por permitirme lograr mi formación académica, ética, moral y profesional dentro de sus instalaciones.

*Estas palabras son para todos ustedes, mil veces gracias;
Pamela Vilañez Montenegro.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN DEL ASESOR DE TESIS	ii
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
AUTORÍA	v
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	vi
DECLARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ÉTICO DE LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO	x
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo General:.....	6
2.2 Objetivos Específicos:	6
2.3 Hipótesis	6
CAPÍTULO III	
ESTADO DEL ARTE	7
3.1 Hongos fitopatógenos	7
3.1.1 Tizón tardío.....	7
3.1.2 Generalidades.....	8

3.1.3	Sintomatología	8
3.1.4	Clasificación taxonómica.....	9
3.1.5	Ciclo de la enfermedad <i>Phytophthora infestans</i>	9
3.2	Antagonismo	10
3.3	Control biológico	11
3.4	<i>Bacillus subtilis</i>	12
3.4.1	Generalidades.....	12
3.4.2	Taxonomía de <i>Bacillus subtilis</i>	13
3.4.3	Modo de acción.....	13
3.4.4	Mecanismos de acción de <i>Bacillus subtilis</i> como control biológico	14
3.5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	15
3.5.1	Antecedentes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
3.5.2	Taxonomía de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
3.5.3	Mecanismos de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> como control biológico	17
3.6	Rizósfera	18
3.7	Caracterización Bioquímica de cepas	19

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS		20
4.1	Materiales, equipos e insumos	20
4.1.1	Materiales.....	20
4.1.2	Equipos de laboratorio	21
4.1.3	Reactivos.....	21
4.2	Métodos	22
4.2.1	Diseño Experimental.....	22
4.2.2	Variables en estudio.....	22
4.2.2.1	Variables independientes	22

4.2.3	Variable dependiente	22
4.3	Manejo de la investigación	23
4.3.1	Fase de Campo.....	24
4.3.3.1	Ubicación de la investigación	24
4.3.3.2	Establecimiento de puntos de muestreo.....	24
4.3.3.3	Zonificación.....	24
4.3.3.4	Muestreo de suelo	25
4.3.3.5	Recolección de material vegetal infectado con <i>Phytophthora infestans</i> . ..	26
4.4	Fase de Laboratorio	26
4.4.1	Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
4.4.2	Aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i>	28
4.4.3	Aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i>	29
4.4.4	Purificación.....	31
4.4.5	Identificación de cepas.....	31
4.4.6	Identificación del hongo <i>Phytophthora infestans</i>	32
4.4.7	Tinción Gram de bacterias.....	33
4.4.8	Tinción de cepas de <i>Phytophthora infestans</i>	34
4.4.9	Identificación molecular de microorganismos.....	35
4.4.9.1	Extracción de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas	36
4.4.9.2	Precipitación de proteínas.....	36
4.4.9.3	Precipitación y rehidratación de ADN.....	37
4.4.9.4	Extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal	37
4.4.10	Secuenciación	39
4.4.11	Pruebas de antagonismo.....	39
4.4.12	Determinación de dosis mediante el conteo en cámara de Neubauer.....	39

4.4.13	Antibiogramas mediante el proceso de cultivos duales	40
4.4.14	Espectrofotometría (450nm)	42
4.4.15	Crecimiento bacteriano por espectrofotometría.....	43
4.4.16	Conteo en cámara de Neubauer por horas	42
4.5	Análisis estadístico	44
CAPÍTULO V		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		45
CAPÍTULO VI		
CONCLUSIONES		71
CAPÍTULO VII		
RECOMENDACIONES.....		73
CAPÍTULO VIII		
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		74
CAPÍTULO IX		
ANEXOS		79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Phytophthora infestans</i>	23
Tabla 2. Análisis de varianza (ADEVA).	23
Tabla 3. Tratamientos en estudio para determinar el crecimiento bacteriano y fúngico. ...	42
Tabla 4. Información de las cepas de Bacterias: <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	47
Tabla 5. Secuencias relativamente más cercanas secuenciadas por BLAST.	49
Tabla 6. Diámetro de halos inhibitorios (mm) de las Bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	50
Tabla 7. Análisis de varianza del diámetro de halos inhibitorios (mm)	51
Tabla 8. Tratamientos en estudio para determinar el crecimiento bacteriano y fúngico	53
Tabla 9. Análisis de varianza de los niveles de absorbancia por espectofotometría (450 nm)	54
Tabla 10. Recuento de esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Phytophthora infestans</i> dosis (3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹), en cámara de Neubauer	59
Tabla 11. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Bacillus thuringiensis</i> (dosis 5x10 ⁹ UFC.ml ⁻¹) vs. <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer	60
Tabla 12. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Bacillus subtilis</i> (dosis 1x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹) vs. <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer	62
Tabla 13. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) de <i>Bacillus thuringiensis</i> (dosis 5x10 ⁹ UFC.ml ⁻¹), en cámara de Neubauer	63
Tabla 14. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) de <i>Bacillus subtilis</i> (dosis 1x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹), en cámara de Neubauer	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de <i>Phytophthora infestans</i>	10
Figura 2. Rol biológico de <i>Bacillus subtilis</i>	14
Figura 3. Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a insectos.	16
Figura 4. Sitio del muestreo provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre, Sector Solferino, realizado mediante el programa ArcGIS.....	25
Figura 5. Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> realizada en los laboratorios de la PUCE-SI	27
Figura 6. Aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i> , realizada en los laboratorios de la PUCE-SI	29
Figura 7. Aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i> , realizada en los laboratorios de la PUCE-SI	30
Figura 8. A) Purificación de Bacterias, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , B) Tubos de ensayo con cepas purificadas de <i>Phytophthora infestans</i>	31
Figura 9. Fotografía de colonias en caja de Petri, A) <i>Bacillus thuringiensis</i> , B) <i>Bacillus subtilis</i>	32
Figura 10. Fotografía de colonias de <i>Phytophthora infestans</i> , A) aislamiento de muestras de hojas, B) Crecimiento de colonias de <i>Phytophthora infestans</i>	33
Figura 11. Tinción de Bacilos Gram positivos A) <i>Bacillus subtilis</i> , B) <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
Figura 12. Esporangios de <i>Phytophthora infestans</i> observados al microscopio con objetivo 100x	35
Figura 13. A) Pruebas de antagonismo de <i>Bacillus thuringiensis</i> vs. <i>Phytophthora infestans</i> , B) Pruebas de antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Phytophthora infestans</i>	41
Figura 14. A) Microplaca con las muestras de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Phytophthora infestans</i> , B) Lectura de las muestras en el espectrofotómetro. .	43
Figura 15. Crecimiento bacteriano de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> , en cámara de Neubauer a la hora 1.....	44
Figura 16. Zonificación del área de estudio, realizado en el programa ArcGIS.....	45

Figura 17. Pigmentación de esporas y esporangios de <i>Phytophthora infestans</i> observados al microscopio con objetivo 100x.	46
Figura 18. Colonia1: <i>Bacillus thuringiensis</i> , Colonia 2: <i>Bacillus subtilis</i>	48
Figura 19. Diámetro de halos inhibitorios de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Tratamiento 1) y <i>Bacillus subtilis</i> (Tratamiento 2) vs <i>Phytophthora infestans</i>	52
Figura 20. Crecimiento del Hongo <i>Phytophthora infestans</i> (T1), determinado por conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.	56
Figura 21. Resultados del Crecimiento de la Bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> vs. Crecimiento del Hongo <i>Phytophthora infestans</i> (T2), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.....	60
Figura 22. Resultados del Crecimiento de la Bacteria <i>Bacillus subtilis</i> vs. Crecimiento del Hongo <i>Phytophthora infestans</i> (T3), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.....	61
Figura 23. Resultados del Crecimiento de la Bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> (T4), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.	643
Figura 24. Resultados del Crecimiento de la Bacteria <i>Bacillus subtilis</i> (T5), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.	654
Figura 25. Niveles de absorbancia determinados en el espectrofotómetro, de los tratamientos en estudio	65
Figura 26. Tabulación a la pregunta 1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?	66
Figura 27. Tabulación a la pregunta 2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?	67
Figura 28. Tabulación a la pregunta 3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?	67
Figura 29. Tabulación a la pregunta 4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?	68
Figura 30. Tabulación a la pregunta 5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?	68

Figura 31. Tabulación a la pregunta 6. ¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?	69
Figura 32. Tabulación a la pregunta 7. ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores?.....	69
Figura 33. Tabulación a la pregunta 8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución?	70
Figura 34. Tabulación a la pregunta 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?.....	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras y datos con el GPS del área de investigación ubicado en el Sector Solferino de la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre.....	79
Anexo 2. Preparación de la solución madre en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCE-SI.	80
Anexo 3. Pesaje de muestras y preparación del medio de cultivo y materiales.....	80
Anexo 4. Medios de cultivo NUTRINT BROTH (TM MEDIA) y POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA)	81
Anexo 5. Aislamiento de Bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	81
Anexo 6. Identificación macroscópica de las Bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> además de <i>Phytophthora infestans</i>	82
Anexo 7. Purificación de las Bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> además de <i>Phytophthora infestans</i>	83
Anexo 8. Identificación Microscópica de las Bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> , además de <i>Phytophthora infestans</i> , observadas con el objetivo 100x.	84
Anexo 9. Conteo de UFC en el Contador de Colonias	84
Anexo 10. Protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit utilizado para la identificación molecular.....	85
Anexo 11. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de Bacterias	86
Anexo 12. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de <i>Phytophthora infestans</i>	87
Anexo 13. ADN secuenciado de la cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	88
Anexo 14. ADN secuenciado de la cepa de <i>Bacillus subtilis</i>	88
Anexo 15. ADN secuenciado de la cepa de <i>Phytophthora infestans</i>	89
Anexo 16. Secuencias relativamente más cercanas de <i>Bacillus thuringiensis</i> secuenciadas por BLAST.....	89
Anexo 17. Secuencias relativamente más cercanas de <i>Bacillus subtilis</i> secuenciadas por BLAST.....	90

Anexo 18. Secuencias relativamente más cercanas de <i>Phytophthora infestans</i> secuenciadas por BLAST.....	90
Anexo 19. Elaboración de cultivos duales, Laboratorios de la PUCE-SI.....	91
Anexo 20. Medición de Halos inhibitorios (mm) con pie de rey, Laboratorios de la PUCE-SI.	91
Anexo 21. Resultados de los tratamientos en estudio de las Bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Phytophthora infestans</i>	92
Anexo 22. Preparación de tratamientos para lectura mediante Espectrofotometría (450 nm).....	92
Anexo 23. Promedios de los niveles de absorbancia de los cinco tratamientos, en el espectrofotómetro (450 nm).....	93
Anexo 24. Invitación a la socialización	94
Anexo 25. Socialización de Resultados, instalaciones de la PUCE-SI	94
Anexo 26. Encuesta aplicada en la socialización	95
Anexo 27. Lista de participantes.....	96

RESUMEN

Bacillus es un género altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos debido a su gran capacidad de formación de esporas, lo cual le da una ventaja de supervivencia en la rizósfera vegetal. En la presente investigación se realizó una descripción morfológica de las colonias, con la finalidad de estudiar el efecto inhibidor de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* presentes en la rizósfera del cultivo de papa, sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío o lancha, Se recolectaron un total de 60 muestras de suelo del sector de Solferino ubicado en la parroquia Mariscal Sucre de la Provincia del Carchi. De estas muestras se obtuvieron 16 aislamientos de *Bacillus*, 8 de *Bacillus thuringiensis* y 8 de *Bacillus subtilis*, cada uno de los cuales se purificaron para su posterior enfrentamiento con *Phytophthora infestans*, en cajas de petri con medio de cultivo (MRS), utilizando la técnica de discos para la lectura de antibiogramas y estableciendo las concentraciones iniciales de esporas mediante conteos microscópicos en cámara de Neubauer. Las bacterias que evidenciaron mayor inhibición frente al hongo *Phytophthora infestans* fueron las cepas de *Bacillus subtilis*, con conteos de 2×10^6 UFC.ml⁻¹ en comparación con *Bacillus thuringiensis* las cuales mostraron un crecimiento de 7×10^9 UFC.ml⁻¹, todos estos valores fueron determinados en la cámara de Neubauer. Se evidenció que los 16 aislamientos de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* obtuvieron diámetros promedios de inhibición de 10,98 mm y 14,87 mm respectivamente; aclarando que, todos los aislamientos provenientes de las muestras fueron obtenidas de la rizósfera de papa.

Palabras Clave.- *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, aislamiento, antibiograma, cámara de Neubauer.

ABSTRACT

Bacillus is a genus highly present in the rhizosphere of various crops due to its great capacity for spore formation, which gives it a survival advantage in the plant rhizosphere. In the present investigation a morphological description of the colonies was made, in order to study the inhibitory effect of the *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* bacteria present in the rhizosphere of the potato crop, on the growth of *Phytophthora infestans*, cause of late blight or boat. A total of 60 soil samples were collected from the Solferino sector located in the Mariscal Sucre parish of the Province of Carchi. Of these samples, 16 isolates of *Bacillus*, 8 of *Bacillus thuringiensis* and 8 of *Bacillus subtilis* were obtained, each of which was purified for later confrontation with *Phytophthora infestans*, in petri dishes with culture medium (MRS), using the technique of discs for the reading of antibiograms and establishing the initial spore concentrations by means of microscopic counts in Neubauer chamber. The bacteria that showed greater inhibition against the fungus *Phytophthora infestans* were *Bacillus subtilis* strains, with counts of 2×10^6 UFC.ml⁻¹ compared to *Bacillus thuringiensis* which showed a growth of 7×10^9 UFC.ml⁻¹, all these values were determined in Neubauer's chamber. It was shown that the 16 isolates of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* obtained average inhibition diameters of 10.98 mm and 14.87 mm respectively; clarifying that, all isolates from the samples were obtained from the potato rhizosphere.

Keywords.- *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, isolation, antibiogram, Neubauer chamber.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador la producción nacional de papa se ubica en el norte, centro y sur del país, siendo Carchi la provincia con mayor rendimiento por hectárea, representando ser un buen negocio para los habitantes de esta zona (Basantes et al., 2016). No obstante, su cultivo también simboliza altos costos para su producción en términos económicos, debido al incremento de enfermedades y la carencia de un control que resulte sumamente eficiente.

Pérez y Forbes, (2011) mencionan al tizón tardío o más conocido como lancha, causada por *Phytophthora infestans* como la principal enfermedad limitante en la producción de papa en toda la zona andina. Esto, ha provocado el uso excesivo de agroquímicos con la finalidad de eliminar o controlar dicha enfermedad; sin embargo, el uso de los mismos, conllevan a tener efectos negativos a largo plazo sobre las características físicas y químicas del suelo del cultivo de papa, como ejemplo de ello, son las cantidades de macro y micro nutrientes, disponibles en la rizósfera para la absorción de las plantas (García, 1997). Por otro lado, además, presenta impactos en la salud de los agricultores y al mismo tiempo daños al ecosistema de la provincia; lo que resulta sumamente preocupante, siendo esta la situación actual de los agricultores en la provincia.

Autores como Yanggen et al., (2003) expresan que, luego de las aplicaciones de los agroquímicos hay reducciones en la fertilidad de los suelos, además de un aumento de problemas con plagas como el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) y enfermedades como la antes mencionada, lancha (*Phytophthora infestans*). Es por esto que, los agricultores se han visto en la necesidad de adoptar sistemas de producción que aumenten el rendimiento y que a la vez incrementen la fertilidad de los suelos; ya que el futuro no solo puede depender del uso excesivo de agroquímicos, sino más bien de un manejo total del agro ecosistema (Rosero, 2016). Este manejo requiere que se combine la sabiduría tradicional con el conocimiento científico.

Estudios como los que presenta De la Cruz, (2014) sugieren la introducción de productos biológicos en sistemas agrícolas, los cuales surgen de la necesidad de encontrar nuevas estrategias amigables con el medio ambiente y de bajos costos de producción. Por tal motivo,

el control biológico es una de las herramientas utilizadas en agricultura orgánica, ya que, bacterias antagonistas disminuyen los daños en cultivos ocasionados por fitopatógenos.

Layton et al., (2011) además, muestran la existencia de un método de control diferente al uso de agroquímicos, abriendo nuevas posibilidades de utilizar microorganismos que habitan en diferentes tipos de suelos, como controladores biológicos, cuya finalidad es utilizar un organismo vivo para controlar otro.

Uno de estos principales microorganismos existentes en los suelos son las bacterias formadoras de endosporas, el género *Bacillus*, dicen (Méndez et al., 2018), este es un bacilo gram positivo que proporciona resistencia a condiciones no favorables en el ambiente ya que posee una morfología característica; estas bacterias actúan como antagonistas frente a microorganismos patógenos que producen daño en los cultivos y por ello se le atribuyen propiedades de controlador biológico además de poseer actividad anti fúngica que inhibe el crecimiento de fitopatógenos (Márquez, 2007).

La importancia de utilizar bio controladores radica en que son una opción amigable para el medio ambiente, además que “Los bio controladores hacen cosas que no pueden hacer los químicos. Compiten por espacio o por nutrientes con el patógeno” manifiestan (Fernández y Ortega, 2013). Debido a los efectos nocivos con el que los químicos afectan al medio ambiente se ha comenzado a establecer mecanismos para el control de estos daños como el uso de especies del género *Bacillus*, el cual es un género altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos debido a la gran capacidad de formación de esporas, las cuales le brindan ventajas de supervivencia en la rizósfera vegetal (Calvo y Zúñiga, 2010).

Méndez-Úbeda et al., (2018), mencionan que la Bacteria *Bacillus subtilis* es una especie que produce múltiples metabolitos biológicamente activos, los cuales son capaces de inhibir el desarrollo y crecimiento de otros microorganismos, lo que sugiere su utilización para bio control de enfermedades por poseer actividad anti fúngica y antibacteriana.

Por otro lado las cepas de *Bacillus thuringiensis* a pesar de la virulencia, seguridad y potencia contra organismos patógenos, su potencial anti fúngico es desconocido menciona (Carreras, 2011). A pesar que esta bacteria produzca una gran variedad de metabolitos las industrias no lo han tomado como una alternativa de control aun conociendo que resultan inhibitorios de hongos fitopatógenos (Márquez, 2007).

Por lo tanto con esta investigación se espera contribuir a mitigar el problema de contaminación ambiental provocado por el uso excesivo de agroquímicos en el cultivo de papa de la zona Carchi, logrando obtener un bio controlador natural, que no afecte la calidad del producto y que no causen daño al consumidor. Por ende, esta investigación se realizó con la finalidad de determinar la capacidad antagónica de cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* aisladas y purificadas de la principal zona productora de papa en el Ecuador frente a *Phytophthora infestans*, mediante pruebas *in vitro*.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

- Evaluar las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* mediante la utilización de antibiogramas para el control de *Phytophthora infestans*.

2.2 Objetivos Específicos:

- Establecer los puntos de muestreo mediante zonificación para aislamiento de cepas.
- Aislar cepas puras de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* mediante medios de cultivo especializados (Agar MRS) para su posterior caracterización bioquímica.
- Evaluar las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* sobre *Phytophthora infestans*.

2.3 Hipótesis

Hipótesis alternativa (Ha)

- ✓ *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* tiene acción inhibitoria contra el hongo *Phytophthora infestans*.

Hipótesis nula (Ho)

- ✓ *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* no tienen acción inhibitoria contra el hongo *Phytophthora infestans*.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son la causa de infección y daños en plantas de interés comercial produciendo una desvalorización del producto, que en muchos casos se tiene que desechar y no se puede comercializar. Uno de los hongos que han producido mayores pérdidas en cultivos de tuberosas es la *Phytophthora infestans*. Para el control biológico de este hongo se ha utilizado *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescences* y *Burkholderia* con resultados bastantes alentadores (Flores et al., 2014).

Los hongos considerados fitopatógenos son un problema que inicia con la agricultura misma, este problema es debido a las grandes extensiones de terreno que se dedican al mismo cultivo conllevando a que se modifique el equilibrio ecológico que existe naturalmente. “Estos hongos son organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes” (Serrano y Galindo, 2007).

Se considera que más de 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. (Infante et al., 2009)

3.1.1 Tizón tardío

El tizón tardío es causado por un oomiceto (organismo similar a los hongos) llamado *Phytophthora infestans*. Sus esporas se denominan esporangios y cuando las condiciones son adecuadas (alta humedad y baja temperatura) liberan esporas móviles llamadas zoosporas. Las esporas sexuales se denominan oosporas. Los esporangios y zoosporas son los que infectan hojas, tallos y tubérculos de papa. (Torres et al., 2011)

El Centro Internacional de la papa (CIP) 2008, define al tizón tardío como una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial. Además hacen referencia a Irlanda indicando que en 1845 esta enfermedad causó la destrucción total de los campos de

papa, que eran “la principal fuente alimenticia de ese país, produciendo la muerte de miles de personas y la migración de muchos sobrevivientes a otros lugares de Europa y Norte América”. Cabe recalcar que el CIP ha realizado numerosos estudios sobre la etiología, epidemiología y control de la enfermedad, sin embargo han llegado a la conclusión que la enfermedad se han incrementado aún más desde el hallazgo del tipo A2 en Europa en 1984, y el desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares que permitieron mejorar los estudios de la genética de poblaciones del patógeno.

Luego de realizar los estudios el CIP 2008, conoce los peligros para la producción de papa que ocurrían después de los procesos de variación genética del patógeno, principalmente debido a la aparición de variantes con mayor resistencia a los fungicidas sistémicos, mayor virulencia y mayor aptitud parasítica, así como a la presencia de oosporas como fruto de la reproducción sexual del patógeno en nuevas zonas agrícolas.

3.1.2 Generalidades

De acuerdo a (Pérez y Forbes, 2011), es una de las enfermedades más devastadoras de la papa no solo a nivel nacional sino también a nivel mundial; reportada en la historia de la humanidad. Se ha reportado que el “tizón tardío” está presente en todas las áreas paperas del mundo, considerándose la enfermedad más importante debido a los daños que causa en los cultivos provocando pérdidas en magnitud, por otra parte las condiciones climáticas que presenta la sierra favorece su desarrollo ya que se presentan temperaturas moderadas entre 12° y 18° C, alta humedad en las mañanas y además largos periodos de sol.

3.1.3 Sintomatología

Para Huilcapi, E., (2012) la enfermedad afecta a las hojas, tallos y tubérculos de la planta de papa.

Los primeros síntomas pueden presentarse en las hojas, como manchas irregulares acuosas de color verde pálido a verde oscuro, que se llegan a expandir por todo el follaje, generalmente en los bordes y ápices de los folíolos dando lugar a lesiones necróticas de color marrón a negro, rodeadas de un halo amarillento. Con respecto a los tallos, se tornan frágiles y quebradizos, además de formarse lesiones de color café oscuro generalmente en el tercio

medio o superior de la planta. En cuanto a los tubérculos también presentan lesiones del mismo color con forma irregular y textura granular.

3.1.4 Clasificación taxonómica

Yépez (2016), menciona que Bary en el año de 1876 describió taxonómicamente a *Phytophthora infestans* de la siguiente forma:

Reino: Chromista

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycete

Subclase: Peronosporomycetidae

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *infestans*

Nombre científico: *Phytophthora Infestans*

3.1.5 Ciclo de la enfermedad *Phytophthora infestans*

El ciclo de la enfermedad incluye dos fases, una sexual y otra asexual. Pudiendo completar su ciclo reproductivo entre los 3 y 15 días. El ciclo inicia con esporangios, que se liberan con los cambios bruscos de humedad, estos, son transportados por el viento o por salpicaduras de lluvia desde solanáceas silvestres o cultivos de papa enfermos. Las esporas infectan a las hojas cuando estas están mojadas, las manchas crecen, donde luego alrededor aparece una pelusilla que contiene esporangios, los cuales son transportados por el viento o por salpicaduras de lluvia a otras plantas reiniciando el ciclo. Al mismo tiempo estos esporangios son transportados por gotas de lluvia a los tubérculos causándoles infección. Al sembrar estos tubérculos por ende, se originan nuevas plantas enfermas. (Yépez, 2016)

Aspectos a considerar para la selección de microorganismos antagonistas:

- a) Capacidad de colonizar rápidamente y persistir de manera efectiva.
- b) Mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes.
- c) Capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales. (Hernández et al., 2007)

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agro ecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto bio regulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico. (Rojas et al., 2017)

3.3 Control biológico

Rodríguez et al., (2010) indican que el control biológico es “la regulación de un organismo vivo como consecuencia de la actividad de otro, lográndose con ello un equilibrio poblacional”. Esto significa el uso de organismos vivos presentes en los cultivos como agentes de control biológico, organismos capaces de antagonizar con enemigos naturales ya sean plagas o patógenos, con la finalidad de disminuir o eliminar los efectos nocivos en plantas.

A pesar de la gran efectividad que han mostrado estos agentes de control biológico, resulta muy paradójico que su uso comercial aún es muy limitado. Una de las limitantes para alcanzar el uso a nivel comercial es que, a diferencia de un pesticida químico, que generalmente hacen disminuir la densidad de la plaga o la severidad de la enfermedad, la eficacia de los productos biológicos en el campo depende sensiblemente de factores ambientales difíciles de controlar como la (temperatura, humedad, acidez, exposición a luz ultravioleta, etc.). Además, su espectro de acción contra diferentes plagas o patógenos es menor que el de los plaguicidas o antimicrobianos químicos. (Serrano y Galindo, 2007)

El término “control biológico” para Caicedo y Chacón, (2017) se ha venido empleando en varios campos de la biología, siendo muy notable en entomología. Un microorganismo antagonista (bacteria, levadura u hongo), tienen la capacidad de ejercer un efecto de bio

control sobre diferentes patógenos de interés con la finalidad de eliminar poblaciones de diferentes plagas y enfermedades.

El uso de las bacterias tales como *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* como bio controladores han recibido especial atención principalmente por el hecho de presentar una elevada efectividad en campo. (Carreras, 2011)

El caso de los plaguicidas biológicos es el más estudiado destacando los ejemplos de *Bacillus thuringiensis* y de hongos que atacan insectos (entomopatógenos). En el caso de agentes biológicos para el control de enfermedades (principalmente producidos por hongos), los éxitos comerciales son todavía limitados y están basados principalmente en hongos de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium* y *Candida*, y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Agrobacterium* (Márquez, 2007).

3.4 *Bacillus subtilis*

3.4.1 Generalidades

Para Caicedo y Chacón (2017), “*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, mesófila, productora de esporas de pared delgada, de forma oval o cilíndrica”.

En medio del cultivo se puede observar coloración blanca o crema, con un aproximado en su tamaño de 2 a 4 mm de diámetro, tienen aspecto liso o rugoso con bordes ondulados o extendidos. La producción de endosporas de esta bacteria, hacen que sea resistente a temperaturas desde 80° a 100°C, sequedad, congelación y químicos tóxicos (Márquez, 2007).

B. subtilis es un microorganismo autóctono del suelo, prospera en la naturaleza donde se encuentra ampliamente distribuido en muy diversos hábitats, se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, con forma bacilar, aerobia estricto o anaerobia facultativa que en condiciones estresantes forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula. Produce una gran variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales (Rojas et al., 2017)

Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas,

producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas. (Rojas et al., 2017)

3.4.2 Taxonomía de *Bacillus subtilis*

Reino: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *subtilis*

Nombre científico: *Bacillus subtilis*

Fuente: Márquez Torres, (2007)

3.4.3 Modo de acción

Las raíces de las plantas exudan un enorme rango de compuestos de bajo peso molecular potencialmente valiosos dentro de la rizósfera. Algunas de las experiencias de interacciones químicas, físicas y biológicas en plantas terrestres son aquellas que ocurren entre las raíces y su ambiente circundante en el suelo.

Layton et al., (2006) demuestran la eficiencia de la bacteria *Bacillus subtilis* in vitro controlando más de 23 tipos de patógenos en plantas, y todo ellos gracias a la secreción de sustancias de la bacteria cuando ésta recibe los nutrientes que se encuentran en las raíces de las plantas, induciendo la producción de metabolitos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas. En cuanto a la actividad bio controladora inicia con la producción de lipopéptidos, sustancias que han demostrado acción sobre patógenos de plantas en los que se encuentran especies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* y *Verticillium*.

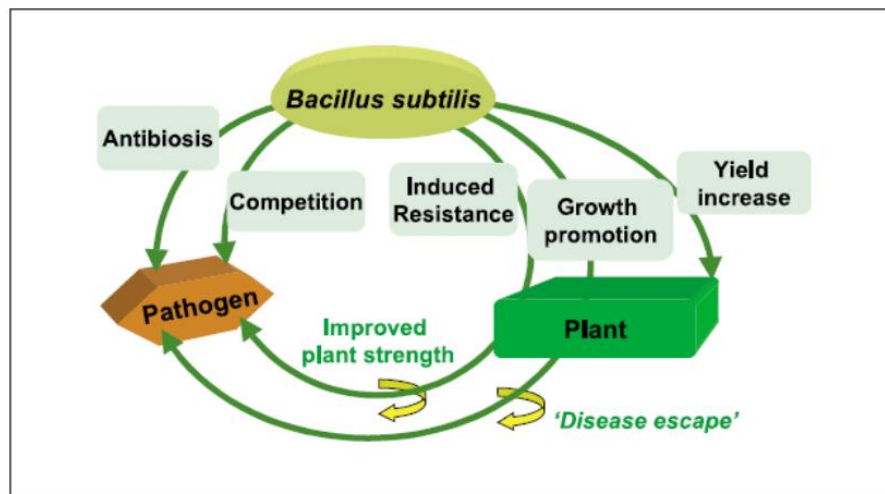


Figura 2. Rol biológico de *Bacillus subtilis*.

Fuente: López S., (2015)

3.4.4 Mecanismos de acción de *Bacillus subtilis* como control biológico

Bacillus subtilis se perfila como uno de los principales agentes biocontroladores para lograr un correcto manejo fitosanitario de los cultivos de mayor importancia en nuestro medio debido a las moléculas que se mencionan a continuación, ya que demuestran tener efecto antifúngico que son producidas por la bacteria *Bacillus subtilis* como son: la bacilicina, que es un dipéptido que inhibe el crecimiento de levaduras, la fengimicina, que es un lipopéptido que muestra actividad contra hongos filamentosos y la proteína baxisubina que indica inhibición al crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria oleracea*, *A. brassicae* y *Botrytis cinérea* (Caicedo y Chacón, 2017).

Por otro lado Juges y Toebe citado por Caicedo y Chacón (2017), mencionan que la bacteria *Bacillus subtilis* además de tener características biocontroladoras ayudan a mejorar la adaptación fisiológica en los suelos, produciendo un recubrimiento en forma de película a las semillas logrando con ello mejorar la salud, germinación y vigor de las plantas.

Según Gonzáles y Fragozo (2002), la bacteria *Bacillus subtilis* es potencialmente patógena, ya que produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilinas y otros antibióticos de la familia iturinas. La subtilina secretada por *Bacillus subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos y se ha demostrado

que induce resistencia sistemática natural de la planta contra el patógeno bacteriano y fungoso propiedad llamada Resistencia Sistemática Adquirida, por sus siglas en inglés (SAR).

La industria utiliza esta bacteria como elemento biocontrolador y para ello es importante que sea aislada del suelo, ya que produce un efecto antifúngico en las plantas, además de ser resistente a la desecación, por lo que se puede formular en productos para venta comercial. (Cuervo, 2010)

Calvo y Zúñiga, (2010) concluyen su investigación diciendo que, es importante conocer la diversidad de bacterias presentes en la rizósfera del cultivo de papa, ya que de esta manera se conoce la relación microorganismo-planta, donde microorganismos como *Bacillus* ejercen una acción específica mediante la producción de metabolitos secundarios, resistentes a estreses biótico y abióticos facilitando la toma de nutrientes del suelo y todo ello podría favorecer el desarrollo del cultivo de papa.

3.5 *Bacillus thuringiensis*

Para Carrera, (2009) *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva productora de esporas, con la particularidad de formar un cristal proteico denominado δ -endotoxina; en el momento de la esporulación. Es una bacteria entomopatógena que presenta acción tóxica a lepidópteros y coleópteros mientras que en dípteros el espectro de actividad del cristal es menor. Además estas proteínas son biodegradables por lo que no contaminan los suelos, por tal motivo es una alternativa ecológicamente sostenible.

La δ -endotoxina puede variar de tamaño y forma además que puede producir en el medio de cultivo más de una forma de cristales. (Cabezas, 2009) además indica que se han encontrado cristales de forma romboidal de tipo amorfo, y también de clase bipiramidal siendo la más común.

Además de las δ -endotoxinas, *Bacillus thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a insectos plaga susceptibles con mayor eficiencia. Sin embargo, a nivel comercial no se les ha establecido su potencial insecticida. Entre estos factores de virulencia se encuentran: las exotoxinas, quitinasas, y las proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento (Hernández-Fernandez et al., 2012)

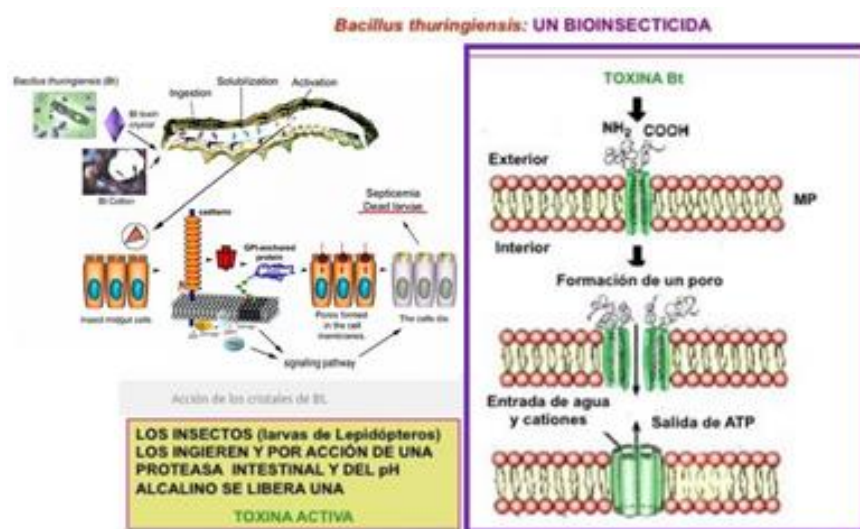


Figura 3. Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis* frente a insectos.

Fuente: Hernández-Fernandez et al., (2012)

Esta bacteria presenta metabolitos, entre los que destacan: bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares (como proteasas y quitinasas) supresores de patógenos. (Robaina et al., 2009)

Los productos de este microorganismo presentan algunas características importantes como la ausencia de toxicidad en los seres humanos en muchos de los enemigos naturales de diversas plagas, en otros vertebrados y en las plantas, así como un espectro de acción reducido, lo que indica que puede ser altamente específico para una plaga determinada. Por tanto, estos bioinsecticidas pueden ser particularmente dirigidos para combatir a una plaga de interés sin perjudicar ni dañar el medio circundante. (Cabezas, 2009)

3.5.1 Antecedentes de *Bacillus thuringiensis*

La existencia de *Bacillus thuringiensis* fue descubierta por un bacteriólogo japonés Ishawata en 1901, el cual aisló un bacilo de la hemolinfa del gusano de seda *Bombix mori*, dándole el nombre de *Bacillus soto*. En 1911 en Alemania Berliner aisló un microorganismo similar de larvas de *Anagasta kuehniella* destacando la presencia de un cuerpo paraesporal dentro de éste, al cual le dio el nombre de *Bacillus thuringiensis* que es como se le conoce actualmente y ya para finales de 1920 y principios de 1930 se implementó el uso de *Bacillus thuringiensis* para el control biológico (Soberon y Bravo, 2007).

Portela-Dussán et al., (2013) aluden que el género *Bacillus*, independientemente de su ubicación taxonómica, se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza.

3.5.2 Taxonomía de *Bacillus thuringiensis*

Reino: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *thuringiensis*

Nombre científico: *Bacillus thuringiensis*

Fuente: Sánchez, (2001)

3.5.3 Mecanismos de acción de *Bacillus thuringiensis* como control biológico

Esta bacteria presenta en su ciclo de vida la formación de endosporas cuando las condiciones del medio son adversas. El efecto inhibitor en hongos fitopatógenos se asocia a la producción de enzimas que actúan contra la pared celular y, por lo tanto, inhiben el crecimiento del hongo. Esto se debe a la producción de quitinasas, enzimas encargadas en la degradación de quitina, por lo que es importante en la hidrólisis de la pared celular de hongos (Carreras, 2011).

Mojica et al, (2009) realizaron una evaluación determinando la capacidad antagónica de 64 cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* mediante cultivos en cajas Petri encontrando que las cepas de *Bacillus thuringiensis* redujeron significativamente el crecimiento radial micelial.

Autores como Soberon y Bravo (2007), consideran a *Bacillus thuringiensis* como una bacteria cosmopolita, pues sus esporas se han aislado del suelo, de larvas de insectos enfermos, de productos almacenados y hojas de árboles, aunque es más frecuente aislarla de productos almacenados, pues las condiciones ambientales del almacén permiten la persistencia de sus esporas incluyendo la rizósfera de plantas.

Carreras (2011), además, indica que la bacterias *B. thuringiensis* se ha utilizado como bioinsecticida para el control de insectos plaga en la agricultura y enfermedades en humanos, constituyendo más del 90% de los biopesticidas comercialmente disponibles. Los genes cry son expresados en muchas plantas permitiendo su protección contra insectos patógenos y Plantas Genéticamente Modificadas (PGM) de acuerdo con genes de la toxina de *Bacillus thuringiensis* los cuales representan cerca del 19% del área cultivada transgénica total del mundo.

3.6 Rizósfera

Para Martín et al., (2011) la rizósfera es un nicho ecológico apropiado para multitud de microorganismos que utilizan los exudados de la planta como fuente de nutrientes y energía, es la parte del suelo inmediata a las raíces de las plantas. En esta región se llevan a cabo una serie de reacciones físicas y químicas que afectan a la estructura del suelo y a los organismos que viven en él. Así, el número de bacterias que hay en la rizósfera es de entre 10 y 1000 veces superior al de las bacterias que se encuentran en el suelo no rizosférico.

La abundancia de bacterias en la rizósfera en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Probanza, 2012).

La cantidad de bacterias que se van a encontrar depende de muchos factores como son: la temporada, el tipo de suelo, la vegetación, el contenido de humedad, el tipo de labranza y fertilización (Vélez et al., 2008). Si hablamos del hábitat específico de las bacterias, algunas se pueden encontrar adheridas a la superficie de las partículas de suelo como agregados o interactuando específicamente con las raíces de las plantas; sin embargo, la concentración de bacterias por gramo de suelo que se halla alrededor de las raíces de las plantas en la llamada rizósfera es mucho mayor que en el resto del suelo (Huilcapi, 2012). Esto se puede

deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a las raíces y que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas.

La rizósfera ha sido definida por Huilcapi, (2012)., como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores .

Se sabe que en la rizósfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, en este caso se puede considerar la rizósfera como una zona de amortiguación microbiológica en donde la microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos (Vélez et al., 2008).

3.7 Caracterización Bioquímica De Cepas

La caracterización bioquímica se basa en una metodología apta para la identificación de cepas con la finalidad de diferenciar específicamente una bacteria de otra, todo ello para conocer la actividad insecticida o fúngica de las bacterias. Esto es debido a la gran variedad de toxinas que tienen diversos atributos como su especificidad o su nula residualidad. (Sánchez, 2001)

A cada cepa se le realiza una caracterización de pruebas fisiológicas y bioquímicas primero microscópicamente a partir de la coloración de Gram identificando morfología fenotípica.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales, equipos e insumos

4.1.1 Materiales

- ✓ Barrenador
- ✓ Fundas plásticas (ziploc)
- ✓ Cooler
- ✓ Guantes de nitrilo
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Pipetas Graduadas
- ✓ Pera de succión
- ✓ Frascos Boeco de varios volúmenes
- ✓ Asas microbiológicas
- ✓ Tubos de Ensayo
- ✓ Gradillas
- ✓ Micropipeta de 10-100 μ l
- ✓ Micropipeta de 100 – 1000 μ l
- ✓ Puntas para micropipeta
- ✓ Pinzas
- ✓ Tubos eppendorf de 0,6 μ l
- ✓ Microplacas
- ✓ Vasos de Precipitación de varios volúmenes
- ✓ Hisopos microbiológicos
- ✓ Probetas de varios volúmenes
- ✓ Matraz Erlenmeyer
- ✓ Pie de rey digital
- ✓ Cámaras de Neubauer
- ✓ Algodón
- ✓ Cinta parafilm
- ✓ Mecheros

- ✓ Encendedor
- ✓ Porta objetos
- ✓ Cubre objetos
- ✓ Papel aluminio

4.1.2 Equipos de laboratorio

- ✓ Autoclave ICANCLAVE®
- ✓ Balanza analítica ADAM®
- ✓ Cámara de flujo laminar N-BIOTEK®
- ✓ Espectrofotómetro EPOCH®
- ✓ Incubadora shaking N-BIOTEK®
- ✓ Estufa MEMMERT®
- ✓ Plato agitador SMHS®
- ✓ GPS ETREX 20x®
- ✓ Contador de colonias STUART®
- ✓ Microscopio binocular INTRULABQ®

4.1.3 Reactivos

- ✓ Cristal Violeta
- ✓ Lugol
- ✓ Safranina al 25%
- ✓ Alcohol
- ✓ Agua estéril
- ✓ Nutrient Broth TM MEDIA
- ✓ Potato Dextrose Agar TM MEDIA
- ✓ Mueller Hinton Agar TM MEDIA
- ✓ Lactobacillus MRS Agar MERCK
- ✓ Acetato de Sodio $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$

4.2 Métodos

4.2.1 Diseño Experimental

En esta investigación se realizó un diseño completamente al azar (DCA), con 2 tratamientos que son, las dosis de *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, con 3 repeticiones de cada una, dando como resultado 6 unidades experimentales:

4.2.2 Variables en estudio

4.2.2.1 Variables independientes

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de mostrar el efecto antagónico de dos bacterias del género *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*, se evaluó el efecto antagónico utilizando la metodología de cultivos duales (disco-placa) utilizando para las bacterias dosis de (1×10^6 UFC.ml⁻¹) y (5×10^9 UFC.ml⁻¹) respectivamente y de (3×10^3 esporangios.ml⁻¹) para *Phytophthora infestans*.

✓ Dosis de Bacteria

- D1: *Bacillus thuringiensis* (5×10^9 ufc.ml⁻¹)
- D2: *Bacillus subtilis* (1×10^6 ufc.ml⁻¹)

✓ Dosis de *Phytophthora infestans*

- A1: (3×10^3 esporangios.ml⁻¹)

4.2.3 Variable dependiente

En cuanto a la evaluación del efecto antagónico de las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*, se lo determinó mediante:

- Diámetro del halo de crecimiento bacteriano (mm)

Tabla 1.

*Dosis de Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis y Phytophthora infestans*⁷

Variables independientes	Dosis
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹
<i>Bacillus subtilis</i>	1x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹
<i>Phytophthora infestans</i>	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

Tabla 2.

Análisis de Varianza (ADEVA)

Fuentes de Variación	Grados de libertad
Total	5
Tratamientos	2
Repeticiones	3
Error experimental	3

4.3 Manejo de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en dos fases:

- **Fase de Campo:**

La que consistió en zonificar la zona de estudio con la finalidad de tomar muestras de suelo del sector Solferino, ubicado en la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre, donde se recolectaron 60 muestras de la rizósfera de papa, en cantidades de 1 kg por muestra aproximadamente.

⁷**Nota:** Dosis de *Bacillus thuringiensis* =5x10⁹ ufc.ml⁻¹, Dosis de *Bacillus subtilis* =1x10⁶ ufc.ml⁻¹, Dosis de Hongo = 3x10³ esporangios.ml⁻¹

- **Fase de laboratorio:**

Con la finalidad de aislar y purificar cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* para posteriormente realizar pruebas de antagonismo *in vitro* frente a *Phytophthora infestans*, en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra.

4.3.1 Fase de Campo

4.3.3.1 Ubicación de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el sector Solferino, ubicado en la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre, donde se recolectaron muestras de la rizósfera de papa, en cantidades de 1 kg por muestra aproximadamente. Se aislaron y purificaron cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* para posteriormente realizar pruebas de antagonismo frente a *Phytophthora infestans*, en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra (PUCE-SI).

4.3.3.2 Establecimiento de puntos de muestreo

Para establecer los puntos de muestreo dentro del área de estudio, se procedió a realizar una zonificación del predio, tal como se detalla en el siguiente punto; ello con la finalidad de identificar las zonas más homogéneas de todo el lote, se establecieron 60 puntos, dividiendo toda el área en dos lotes, de los cuales se tomaron 30 muestras de cada lote, de 1kg, exclusivamente de la rizósfera de papa.

4.3.3.3 Zonificación

Para la zonificación agrícola se realizó el estudio, análisis y delimitación de las zonas homogéneas del terreo, en lo que se refiere al recurso suelo, con el propósito de lograr su mejor aprovechamiento del área de estudio. (Lucero, 2013)

Para llevar a cabo esta actividad se tomaron las coordenadas de 70 puntos, con la ayuda de un GPS marca ETREX 20x®, para posteriormente descargar la base de datos y proceder a realizar la zonificación en el programa ArcGIS creando un mapa base, en el cual se indica la ubicación exacta del área, el cual se estipuló es de 48000m², con sus respectivas coordenadas, determinando así, que el área total se encuentra en el Sector Solferino, ubicado en la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre (Figura 4.)

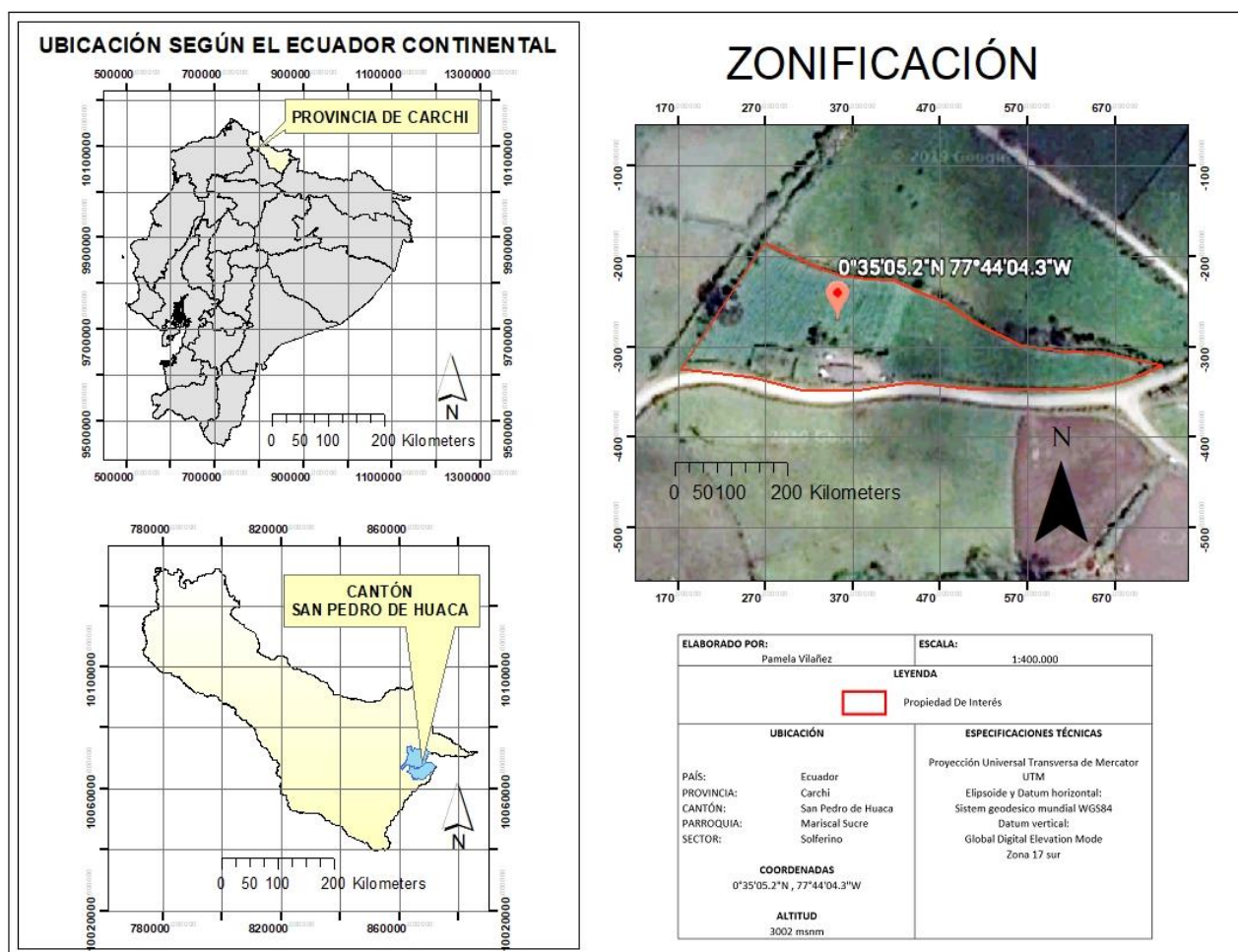


Figura 4. Sitio del muestreo provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre, Sector Solferino, realizado mediante el programa ArcGIS.

4.3.3.4 Muestreo de suelo

La toma de muestras se lo hizo en forma de zig-zag, aplicando la metodología de Tejera, et al., (2011) logrando así la recolección de 60 muestras de suelo obtenidas específicamente de

la rizósfera de papa, se recolectaron la muestras de los dos lotes con una extensión total de 48000m²

En su investigación además, explican que la rizósfera es el lugar donde se desarrolla la mayor cantidad de bacterias del género *Bacillus*, las muestras ya colectadas fueron colocadas en fundas de papel debidamente etiquetadas, las cuales inmediatamente luego de ser recolectadas fueron trasladadas en un cooler hacia los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCE-SI, lugar en las que fueron incubadas a 40° durante 20 horas según (Orbera, et al., 2005), para favorecer el aislamiento de las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis*.

4.3.3.5 Recolección de material vegetal infectado con *Phytophthora infestans*.

Previa a la toma de muestras de suelo se recolectaron muestras de hojas con presencia de *Phytophthora infestans*, las cuales se obtuvieron de un total de 13 plantas, procurando ser las mismas plantas de las cuales se tomaron las muestras de la rizósfera, se procedió a la recolección de muestras exclusivamente de hojas que presentaban los síntomas característicos de lancha.

Las muestras obtenidas en campo, se trasladaron a los laboratorios de Microbiología de la PUCE-SI en un cooler para mantener su temperatura ambiente, siendo colocadas las muestras sobre algodón humedecido alrededor de 70 a 80% de humedad relativa, para favorecer el desarrollo de micelio según (Ñacato y Valencia, 2016)

4.4 Fase de Laboratorio

4.4.1 Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

Para el aislamiento de la bacteria *Bacillus thuringiensis* se siguió el protocolo según (García, et al., 2018) en el cual, se procesaron las 60 muestras de suelo recolectadas, a partir de las muestras ya homogenizadas, se realizó un pesaje de 5g con la ayuda de la balanza analítica y luego se colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer, este, fue aforado con agua destilada

estéril hasta los 50ml para posteriormente ser suspendida la mezcla mediante agitación vigorosa en un plato agitador durante 1min.

Transcurrido el minuto, se tomó 5ml de la suspensión y se adicionó a un nuevo matraz que contenía 45ml de agua estéril y 0,25 molar de acetato de sodio (para elevar la germinación de las esporas de *B. thuringiensis*), precedentemente la mezcla se incubó durante 4 horas a 200 rpm y a 60 °C en la incubadora shaking.

Más tarde, se tomó 1ml del cultivo y se diluyó en 1ml de agua destilada estéril. Esta mezcla se sometió a un proceso de pasteurización enfriando la mezcla de 60 °C con gel refrigerante, para inactivar el crecimiento de otros microorganismos.

Al finalizar el proceso de pasteurización se tomó 1ml de la mezcla y se distribuyó uniformemente en la caja Petri con Agar MRS (*Lactobacillus* MRS Agar MERCK), para luego ser incubadas a 37,5°C durante 72h para el desarrollo de las colonias de *B. thuringiensis* (García, *et al.*, 2018).

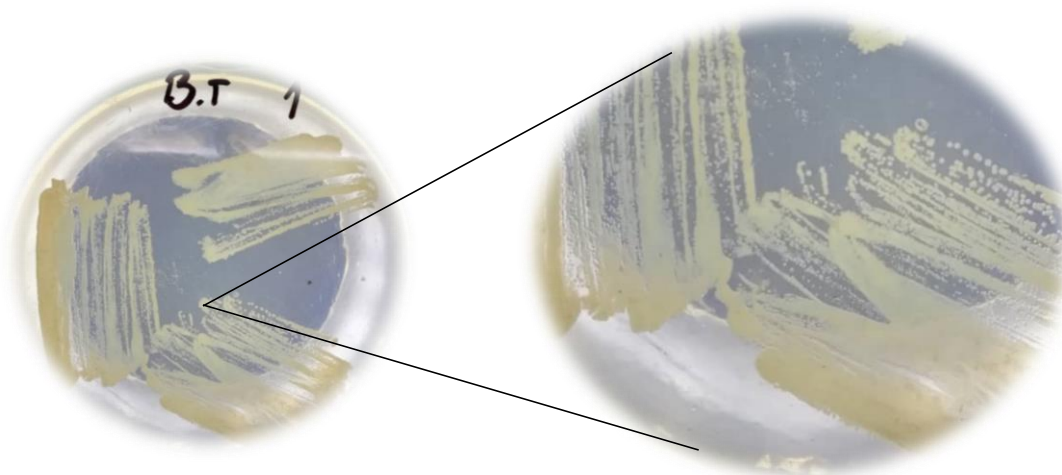


Figura 5. Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* realizada en los laboratorios de la PUCE-SI¹

Fuente: Autoría.

¹**Nota:** Bacteria *Bacillus thuringiensis* en caja de Petri con medio Agar MRS (*Lactobacillus* MRS Agar MERCK), a las 72 horas de incubación.

4.4.2 Aislamiento de *Bacillus subtilis*

El aislamiento de esta bacteria se llevó a cabo de igual manera en el laboratorio de Microbiología, siguiendo el protocolo según Méndez, et al., (2018) el que analiza que el aislamiento de esta bacteria resulta altamente efectivo cuando se esteriliza los materiales de la manera correcta. Para ello todos materiales utilizados fueron previamente esterilizados en la autoclave a 120 ° C durante 30 minutos, garantizando que se inhibe el crecimiento de ciertos patógenos.

Para obtener el inóculo primario (solución madre), se retiraron restos de raíces, piedras, y otras partículas presentes, se pesó 1g de la muestra de suelo, posteriormente se prepararon 5 tubos de ensayo previamente esterilizados con 9 ml de agua destilada estéril, obteniéndose la dilución 10^{-1} , de ésta, se tomó 1ml y se colocó en el siguiente tubo de ensayo, obteniéndose la dilución 10^{-2} y así, se repitió el proceso hasta llegar a una dilución de 10^{-4} , siendo ésta la solución madre.

La caracterización macroscópica se realizó mediante los resultados obtenidos en el primer inóculo mediante conteos de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), las colonias identificadas como candidatas fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían 9ml de Caldo (Nutrient Broth) para ser incubadas en la estufa a 37,5 °C durante 72 horas.

El segundo inóculo se obtuvo a partir de las muestras de los tubos de ensayo, para ello se preparó el medio de cultivo Agar MRS (*Lactobacillus* MRS Agar MERCK), para ser vertido en cajas de Petri a razón de 20 ml por caja, con la ayuda de una micropipeta se tomó 1ml de muestra que fue inoculada en las cajas de Petri, las cuales fueron incubadas a 37,5°C durante 72h hasta visualizar colonias de *B. subtilis* las cuales fueron identificadas por sus características morfológicas observadas al microscopio, para posteriormente continuar con su purificación y obtención de colonias individuales de *Bacillus subtilis*.

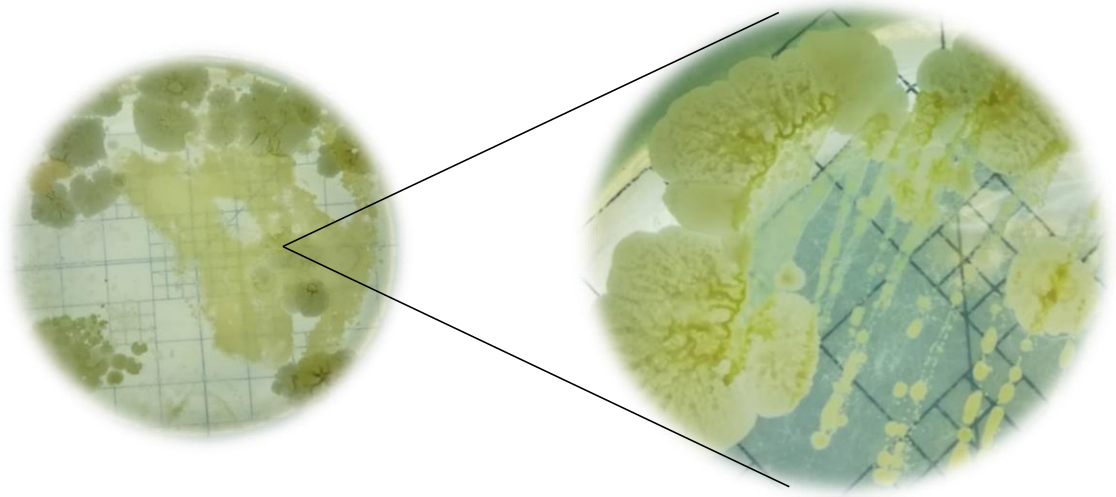


Figura 6. Aislamiento de *Bacillus subtilis*, realizada en los laboratorios de la PUCE-SI²

Fuente: Autoría.

4.4.3 Aislamiento de *Phytophthora infestans*

Una vez esterilizados todos los materiales a utilizarse en una autoclave a 120 °C durante el lapso de 30 minutos, se procede a realizar el protocolo para obtener cepas puras de *Phytophthora infestans*.

Este proceso se llevó a cabo a partir de muestras de hojas de papa las cuales presentaban síntomas de lancha, dichas muestras fueron rociadas con agua destilada esterilizada y colocadas seguidamente en papel secante. Posteriormente con la ayuda de una pinza de laboratorio previamente esterilizada se inoculo las hojas en cajas de Petri con medio Agar PDA (Potato Dextrose Agar TM MEDIA), las cuales se dejó en incubación durante 72 horas a una temperatura de 25°C, en la estufa, tal como lo menciona Silva, et al., (2009) ya que en este período de tiempo se desarrollan las hifas.

²**Nota:** Bacteria *Bacillus subtilis* en caja de Petri con medio Agar MRS (*Lactobacillus* MRS Agar MERCK) a las 72 horas de incubación.

Una vez transcurrido el tiempo se realiza la identificación macroscópica de *Phytophthora infestans*, que consiste en obtener colonias con las características del oomiceto, posteriormente las colonias identificadas como candidatas fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían 9ml de Caldo (Nutrient Broth) para ser incubadas en la estufa a 25°C durante 72 horas.

De las colonias ya identificadas como *Phytophthora infestans*, se tomó una muestra y se volvió a sembrar en medio con Agar PDA (Potato Dextrose Agar TM MEDIA) con la ayuda de un mechero y un aza microbiológica realizando siembras por estría logrando de tal manera que el inóculo ocupe toda el área de la caja de Petri, selladas finalmente con cinta parafilm, repitiendo este proceso hasta la verificación de la pureza del microorganismo fúngico.

Una vez se obtienen todas las placas ya sembradas, fueron incubadas en la estufa a 25 °C durante 72h.

Posteriormente la verificación se realizó una tinción de estructuras al hongo con azul de metileno y se observó al microscopio binocular.

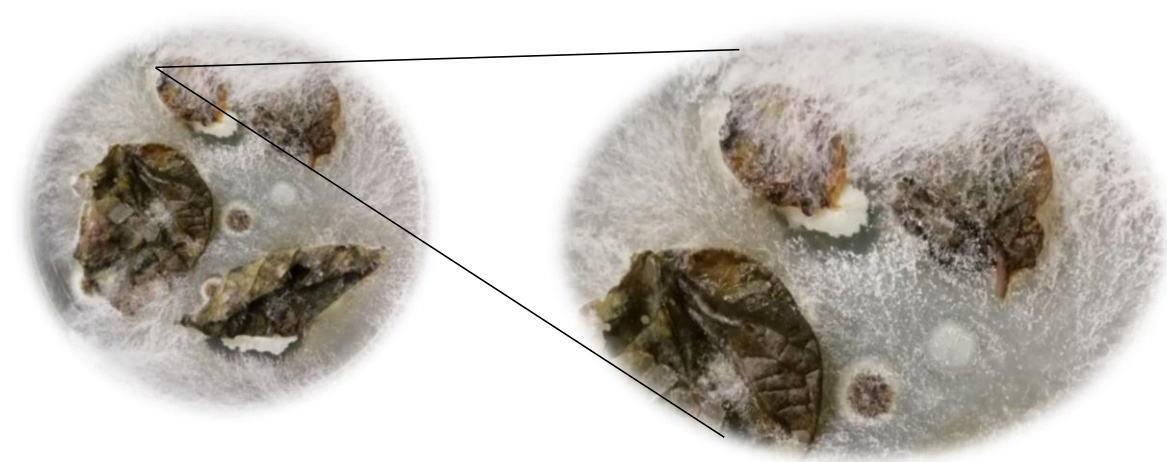


Figura 7. Aislamiento de *Phytophthora infestans*, realizada en los laboratorios de la PUCE-SI³

Fuente: Autoría.

³**Nota:** Hongo *Phytophthora infestans* en caja de Petri con medio Agar PDA (Potato Dextrose Agar TM MEDIA) a las 72 horas de incubación.

4.4.4 Purificación

Para este proceso se siguió el mismo procedimiento tanto para las dos Bacterias como para el Hongo, donde primero se utilizó tubos de ensayo previamente esterilizados, los cuales contenían 9ml de caldo nutritivo (Nutrient Broth TM MEDIA), posteriormente con un asa estéril se realizó un raspado de las Bacterias ya aisladas de las cajas de Petri al igual que el Hongo, para luego ser inoculadas en los tubos de ensayo en número de 6 tubos por cada bacteria y 6 tubos para el Hongo, dando un total de 18 tubos de ensayo.

Los tubos ya inoculados siguieron el proceso de incubación el cual se realizó a una temperatura de 37,5°C durante 24 horas para su reproducción, transcurridas las 24 horas las muestras fueron llevadas a refrigeración para su mantenimiento.

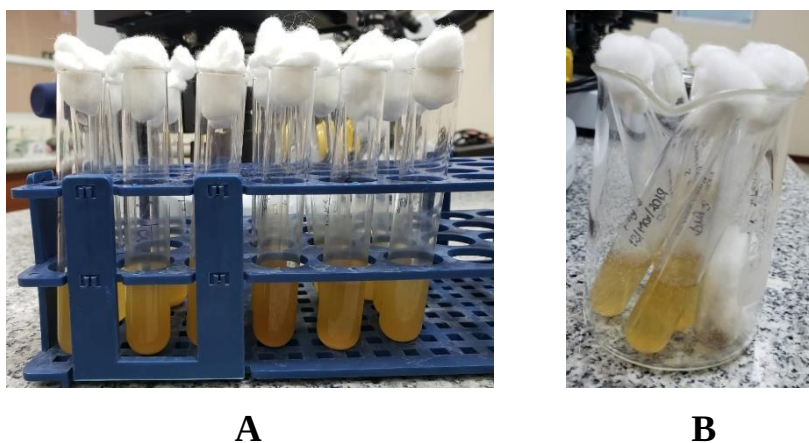


Figura 8. A) Purificación de Bacterias, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, B) Tubos de ensayo con cepas purificadas de *Phytophthora infestans*.

Fuente: Autoría.

4.4.5 Identificación de cepas

Las dos cepas que fueron aisladas fueron identificadas microscópicamente, a través de la técnica de Tinción Gram, y para ello las placas ya teñidas fueron observadas al microscopio binocular a 100x, para su clasificación Gram positivas que en este caso fueron de (color azul-violeta).

Por otro lado la identificación macroscópica se la realizó como lo descrito por Pérez y Mota (2010), determinando la morfología de las cepas bacterianas. En cuanto a *Bacillus thuringiensis* se pudo observar colonias de color crema, delicadamente grumosas, bordes redondeados y una textura parecida a la cera como se observa en la figura 9 (A). Por último, la bacteria *Bacillus subtilis* presenta colonias de aspecto liso a rugoso, con bordes redondeados y extendidos dando la apariencia de un cultivo mixto figura 9 (B).

La descripción macroscópica de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* concuerdan por lo descrito por Realpe, et al., (2002).

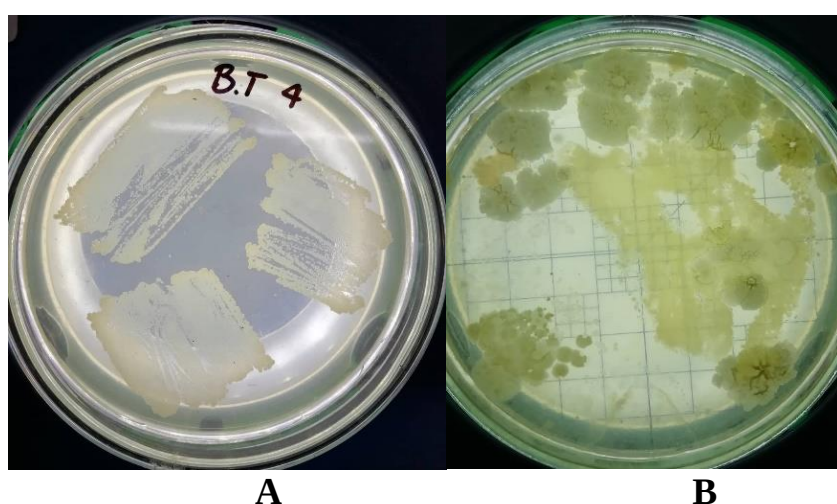


Figura 9. Fotografía de colonias en caja de Petri, A) *Bacillus thuringiensis*, B) *Bacillus subtilis*.

Fuente: Autoría.

4.4.6 Identificación del hongo *Phytophthora infestans*

La identificación macroscópica del hongo *Phytophthora infestans* se realizó por lo descrito por García-Núñez et al., (2017) en el cual una vez identificadas las colonias como *Phytophthora infestans*, se tomó una muestra y se volvió a sembrar en medio PDA (Potato Dextrose Agar TM MEDIA), repitiendo este proceso hasta verificar la pureza del microorganismo fúngico, obteniendo así colonias puras del hongo como se puede observar en la figura 10. Posteriormente se procedió a la identificación microscópica mediante tinción de estructuras con azul de metileno.



Figura 10. Fotografía de colonias de *Phytophthora infestans* - Aislamiento de muestras de hojas.

Fuente: Autoría.

4.4.7 Tinción Gram de bacterias

Para la identificación de bacilos Gram positivos de las dos bacterias, se utilizó la técnica de Schaeffer – Fulton, donde se colocó una pequeña gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos, seguidamente se tomó una pequeña cantidad del cultivo bacteriano y se transfirió a la gota de agua removiendo la mezcla hasta formar una suspensión homogénea.

Posterior se acercó el portaobjetos al mechero logrando así que el líquido se evapore, siguiendo con la técnica se colocó cristal violeta dejando que actúe durante 1 min, y se lavó suavemente con agua destilada, se agregó lugol y se dejó actuar nuevamente durante el lapso de 1 min. Trascurrido el tiempo mencionado, se decoloró con alcohol etílico al 95% gota a gota y se agregó rojo fenol para la tinción de contraste, a continuación, se lavó suavemente con agua y se secó la preparación para finalizar examinando la placa al microscopio a 100x de inmersión de aceite.

Por este lado las características microscópicas que presentaron las dos bacterias como se observa en la figura 11, tanto de *Bacillus thuringiensis* como de *Bacillus subtilis* coinciden con las definidas por Realpe, et al., (2002).

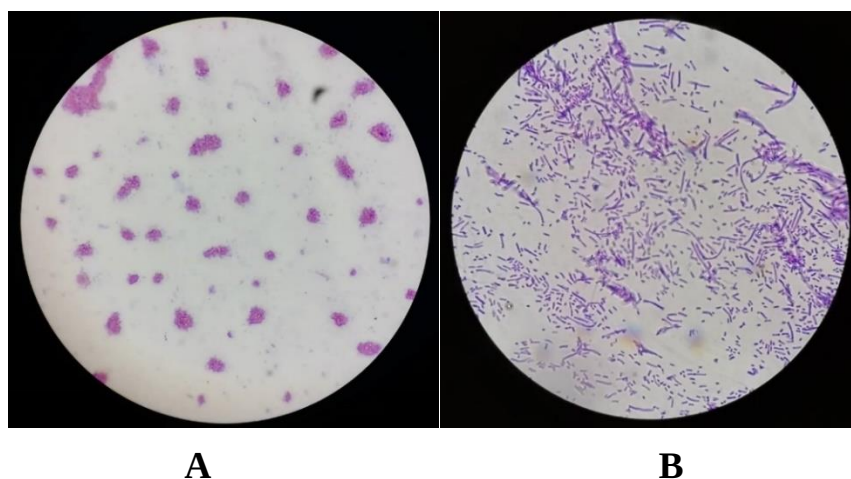


Figura 11. Tinción de Bacilos Gram positivos A) *Bacillus subtilis*, B) *Bacillus thuringiensis* ⁴

Fuente: Autoría.

4.4.8 Tinción de cepas de *Phytophthora infestans*

Para identificar las hifas de *P. infestans* se siguió la misma técnica de Schaeffer – Fulton, el cual consistió en colocar una pequeña gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos, y tomar una pequeña cantidad del microorganismo fúngico para ser trasferido a la gota de agua removiendo la mezcla hasta formar una suspensión homogénea.

La muestra fue acercada al mechero hasta que el líquido se evapore, para luego proceder a colocar una gota de azul de metileno dejándolo actuar por el lapso de 1 minuto, pasado el tiempo antes mencionado se lavó suavemente con agua destilada y se secó la preparación para finalizar examinando la placa al microscopio a 100x de inmersión de aceite.

Las características morfológicas que se tomaron en cuenta fueron: tipo de hifa; forma y tamaño de esporangios; tipo de papila y presencia o ausencia de clamidosporas, según lo recomendado para Oomycetes según (García-Núñez et al., 2017)

⁴**Nota:** En la figura 11, del lado izquierdo se puede observar a la Bacteria *Bacillus subtilis* con bordes redondeados y esporas esféricas que no deforman el bacilo (A), mientras que, en el lado derecho se observa la Bacteria *Bacillus thuringiensis* de bordes redondeados y esporas elipsoidales formando cadenas cortas (B), observadas al microscopio binocular con objetivo 100x, tinción realizada en los laboratorios de la PUCE-SI.

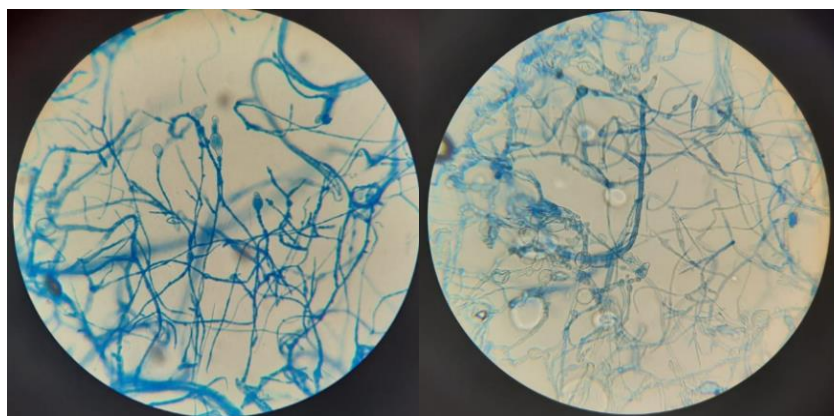


Figura 12. Esporangios de *Phytophthora infestans* observados al microscopio con objetivo 100x

Fuente: Autoría.

4.4.9 Identificación molecular de microorganismos

El proceso de identificación molecular de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y *Phytophthora infestans* fue realizado en el laboratorio de fitopatología y control biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador - Quito en la que se siguió el protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit que se describe a continuación. Posteriormente el aislamiento de ADN fue enviado a la empresa Sur Corena Macrogen, con la finalidad de obtener la secuenciación molecular de los microorganismos evaluados en la presente investigación.

Para la extracción del ADN genómico y análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las dos bacterias, tanto de *Bacillus thuringiensis* como de *Bacillus subtilis*, se sigue el protocolo de Extracción de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas Según el protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Mientras que para la extracción del ADN genómico y análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Phytophthora infestans* se sigue el protocolo de Extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal. (Macrogen Inc, 2019).

4.4.9.1 Extracción de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas

- a) Agregar 1 ml del cultivo en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
- b) Centrifugar a 13 000-16 000 × revoluciones, durante 2 minutos para sedimentar las células.
- c) Suspender las células completamente en 480 µl de EDTA 50 mM.
- d) Agregar la enzima lítica al sedimento celular resuspendido en un volumen total de 120 µl, y pipetear suavemente la mezcla. El propósito de este tratamiento previo es debilitar la pared celular para que se pueda realizar una lisis celular eficiente.
- e) Incubar la muestra a 37°C durante 30-60 minutos. Centrifugar durante 2 minutos a 13 000-16 000 × revoluciones.
- f) Agregar 600 µl de solución de lisis de núcleos. Pipetear suavemente hasta que las células se vuelvan a suspender.
- g) Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; luego enfriar a temperatura ambiente.
- h) Agregar 3 µl de solución de ARNasa al lisado celular. Invertir el tubo de 2 a 5 veces para mezclar.
- i) Incubar a 37°C durante 15-60 minutos y enfriar la muestra a temperatura ambiente (Macrogen Inc, 2019).

4.4.9.2 Precipitación de proteínas

- a) Agregar 200 µl de Solución de Precipitación de Proteínas colocar en vortex vigorosamente a alta velocidad por 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular.
- b) Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos. (Macrogen Inc, 2019).

4.4.9.3 Precipitación y rehidratación de ADN

- a) Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml que contenga 600 µl de isopropanol.
- b) Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible.
- c) Centrifugar a 13 000-16 000 × revoluciones, durante 2 minutos.
- d) Verter cuidadosamente el sobrenadante y drenar el tubo en papel absorbente limpio. Añadir 600 µl de temperatura ambiente 70% de etanol e invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
- e) Centrifugar a 13 000-16 000 × revoluciones, durante 2 minutos. Aspirar cuidadosamente el etanol.
- f) Vaciar el tubo en un papel absorbente limpio y dejar que la pastilla se seque al aire durante 10-15 minutos.
- g) Agregar 100µl de solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidratar el ADN incubando a 65 ° C durante 1 hora. Mezclar periódicamente la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 ° C.
- h) Almacenar el ADN a 2-8°C. (MacroGen Inc, 2019)

4.4.9.4 Extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal

- a) Procesa el tejido de la hoja congelándolo con nitrógeno líquido y moliéndolo en un polvo fino usando un mortero y pistilo. Agregue 40 mg de esta hoja en polvo a un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml.
- b) Añadir 600 µl de núcleos de Solución de Lisis, y agitar 1-3 segundos para humedecer el tejido.
- c) Incubar a 65 °C durante 15 minutos.
- d) Añadir 3 µl de la solución de ARNasa al lisado celular, y mezclar la muestra invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37 °C durante 15 minutos. Permitir que la muestra se enfríe a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de proceder.

- e) Añadir 200 µl de la solución de precipitación de proteínas, y agitar vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos.
- f) Centrifugar durante 3 minutos a 13 000-16 000 × revoluciones. Las proteínas precipitadas formarán un sedimento compacto.
- g) Retirar con cuidado el sobrenadante que contiene el ADN (dejando el sedimento de proteína detrás) y transferirlo a un tubo limpio de 1,5 ml que contenga 600 µl de isopropanol.

Nota: Algunos sobrenadantes puede permanecer en el tubo original que contiene el sedimento de proteína. Deja este líquido residual en el tubo para evitar la contaminación de la solución de ADN con la proteína precipitada.

- h) Mezclar suavemente la solución por inversión hasta hebras de hilo de ADN forman una masa visible.
- i) Centrifugar a 13 000-16 000 × revoluciones durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- j) Decantar cuidadosamente el sobrenadante. Añadir 600 µl de etanol al 70 % a temperatura ambiente y se invierte suavemente el tubo varias veces para lavar el ADN. Centrifugar a 13 000-16 000 × revoluciones durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- k) Aspire cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta. El sedimento de ADN está muy suelto en este punto y se debe tener cuidado para evitar aspirar el pellet en la pipeta.
- l) Invertir el tubo sobre papel absorbente limpio y permitir que el sedimento seque al aire durante 15 minutos.
- m) Añadir 100 µl de solución de rehidratación del ADN y rehidratar el ADN mediante incubación a 65 °C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.
- n) Mantenga el ADN a 2-8 ° C. (Macrogen Inc, 2019)

4.4.10 Secuenciación

Las secuencias tanto de las bacterias como el hongo, se obtuvieron a través de la empresa Sur-Koreana Macrogen, posteriormente fueron editadas y alineadas mediante la utilización de la herramienta informática MEGA y sometidas al BLAST (NCBI) para confirmar la identidad bacteriana a nivel de especie de cada cepa⁵.

4.4.11 Pruebas de antagonismo

Las pruebas de antagonismo se lo realizó mediante cultivos duales (disco – placa), el mismo que permite determinar el efecto antagónico que existe frente al patógeno. Otro de los métodos utilizados para corroborar los datos obtenidos fue determinar el crecimiento celular de las Bacterias *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* además del oomiceto *Phytophthora infestans* mediante la espectrofotometría midiendo el nivel de absorbancia a 450 nm y recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC.ml⁻¹) en cámara de Neubauer durante 24 horas.

4.4.12 Determinación de dosis mediante el conteo en cámara de Neubauer

Este proceso se lo realizó en cámaras de Neubauer, observando bajo el microscopio con el objetivo 10x para localizar la zona de recuento. Para el conteo de las cepas existentes, se cambió al objetivo de 40x, donde se pudo observar y contar todas las cepas que están dentro de cada recuadro mediano incluyendo aquellas que están tocando los lados superiores y derechos de dichos cuadrados.

⁵Jeniffer Yáñez, A. Mtr. Docente Investigadora, Fitopatología y Control Biológico PUCE; Ana Almeida, Becaria de Microbiología y Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico.

Con la cámara de Neubauer se llegó a determinar las dosis deseadas tanto de las dos Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis*, como la del oomiceto *Phytophthora infestans* siendo las siguientes;

- *Bacillus thuringiensis* (5×10^9 UFC.ml⁻¹)
- *Bacillus subtilis* (1×10^6 UFC.ml⁻¹)
- *Phytophthora infestans* (3×10^3 esporangios.ml⁻¹)

4.4.13 Antibiogramas mediante el proceso de cultivos duales

Para las pruebas de antagonismo se utilizaran cultivos duales donde, se procedió a sembrar discos de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* de 5mm de diámetro en cantidades de cuatro discos por caja Petri con Agar Mueller (Mueller Hinton Agar TM MEDIA) previamente inoculadas con *Phytophthora infestans*, siguiendo la metodología de cultivos duales (disco-placa).

Para ello se utilizaron vasos de precipitación que contenían 3ml de caldo nutritivo, cada uno de los vasos además contenía los tratamientos a ser evaluados con las dosis respectivas: Vaso 1 (*Bacillus thuringiensis* dosis: 5×10^9 UFC.ml⁻¹), Vaso 2 (*Bacillus subtilis* dosis: 1×10^6 UFC.ml⁻¹), Vaso 3 (*Phytophthora infestans* dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹), dentro de cada vaso se depositaron círculos de papel filtro con el objetivo de saturar de líquido cada papel.

Posteriormente se preparó el medio de cultivo Agar Mueller (Mueller Hinton Agar TM MEDIA), el cual fue vertido en 6 cajas petri a razón de 20 ml por cada una hasta lograr que gelifique. El siguiente paso es inocular las cajas de petri con *Phytophthora infestans* con la ayuda de hisopos microbiológicos (Quick Swab), este proceso se resume a introducir el hisopo durante 2 a 3 segundos en los tubos de ensayo que contienen el patógeno y proceder a inocular toda la superficie de la caja Petri garantizando el cubrimiento total del área, este proceso se lo realiza cerca al mechero para evitar la contaminación de las placas.

Una vez realizado el paso anterior se procede a colocar 4 discos de papel trazando un cuadrante imaginario y dividiendo la placa en cuadrantes homogéneos, repitiendo el proceso en todas las placas y sus respectivas repeticiones.

Finalmente se llevan las placas a la estufa para ser incubadas a 37,5 °C durante 24 y 72 horas. Para lograr estas dosis fue necesario 72 horas de incubación en el caso de *B. thuringiensis* y *B. subtilis*, mientras que para el hongo se necesitó 24 horas de incubación.

Cabe recalcar que para ejecutar las pruebas de cultivos duales fue necesario utilizar las dosis correspondientes de cada bacteria así como la del hongo, siendo las siguientes:

- *B. thuringiensis* (5×10^9 UFC.ml⁻¹) vs. *Phytophthora infestans* (3×10^3 esporangios.ml⁻¹)
- *B. subtilis* (1×10^6 UFC.ml⁻¹) vs. *Phytophthora infestans* (3×10^3 esporangios.ml⁻¹)

El siguiente paso fue medir el crecimiento radial del antagonista (crecimiento que se expresó en milímetros mm).

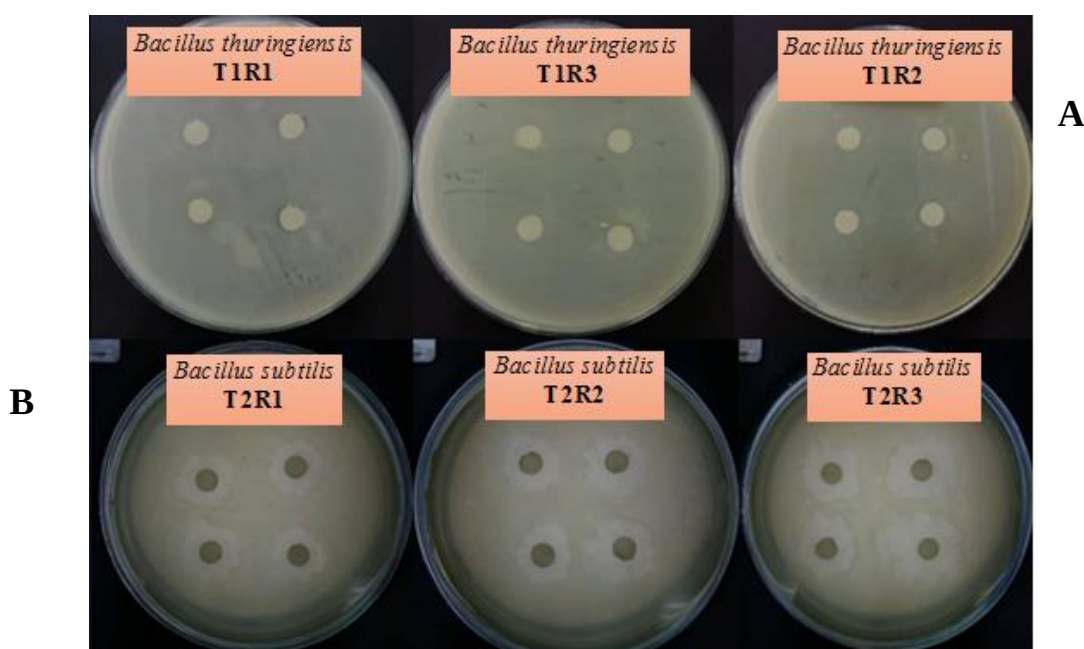


Figura 13. A) Pruebas de antagonismo de *Bacillus thuringiensis* vs. *Phytophthora infestans*, B) Pruebas de antagonismo de *Bacillus subtilis* vs. *Phytophthora infestans*⁶

Fuente: Autoría.

⁶**Nota:** En la figura 13, se puede observar los halos inhibitorios formados por la Bacteria *Bacillus thuringiensis* vs. *Phytophthora infestans* con un promedio de 10,98mm (A), mientras que, en la parte inferior de la imagen se observa una mayor inhibición por parte de la Bacteria *Bacillus subtilis* vs. *Phytophthora infestans* con un promedio de 14,87mm (B).

4.4.1 Espectrofotometría (450nm)

Para el proceso de espectrofotometría se evaluaron 5 tratamientos con tres repeticiones cada una, de los cuales se leía la turbimetría de las muestras durante un lapso de 24 horas.

Tabla 3.

Tratamientos en estudio para determinar el crecimiento bacteriano y fúngico.⁷

	Caldo nutritivo ml	<i>Phytophthora infestans</i> ml	Bacterias	
			<i>Bacillus subtilis</i> ml	<i>Bacillus thuringiensis</i> ml
T1	9,00	1,00	---	---
T2	8,00	1,00	---	1,00
T3	8,25	1,00	0,75	---
T4	9,00	---	---	1,00
T5	9,00	---	1,00	---

Para obtener los datos de turbimetría, se procede a colocar 100 µl de cada tratamiento en los pocillos de la placa para espectrofotómetro. Cabe indicar que la placa consta de 86 pocillos los cuales están debidamente numerados por letras y números.

Una vez tomadas las muestras de cada tubo de ensayo para ser colocadas en las gradillas y llevadas al espectrofotómetro, las muestras eran regresadas a la estufa para continuar con el crecimiento normal de los microorganismos.

Continuando el proceso la placa fue llevada al espectrofotómetro para su debida lectura, en el cual en un lapso de 40 segundos se obtienen los resultados.

Este proceso fue realizado en los cinco tratamientos tomando datos cada hora durante 24 horas seguidas.

⁷**Nota:** *T1= Tratamiento1: Crecimiento de esporangios; *T2= Tratamiento2: Crecimiento celular del hongo Vs. *Bacillus thuringiensis*; *T3= Tratamiento3: Crecimiento celular del hongo Vs. *Bacillus subtilis*; *T4= Tratamiento4: Crecimiento celular de *Bacillus thuringiensis*; *T5= Tratamiento5: Crecimiento celular de *Bacillus subtilis*.

4.4.2 Crecimiento bacteriano por espectrofotometría

Para el crecimiento bacteriano se procedió a cultivar de los tubos de ensayo que contenían las cepas purificadas, como primer paso se tomó tubos de ensayo que contenían 9 ml de caldo nutritivo (Nutrient Broth TM MEDIA) y se procedió a inocular los tubos con *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *Phytophthora infestans*, respectivamente ya purificados, repitiendo el proceso tres veces por cada uno, dando un total de 9 tubos de ensayo.

Seguidamente se procedió a colocar las muestras en Tubos eppendorf de 0,6 µl, para los posteriores ensayos de, cámara de Neubauer, conteo de UFC y espectrofotometría.

La lectura en el espectrofotómetro lee la turbimetría de cada muestra, donde se colocó 0,1 µl en cada pocillo de la Microplaca y se procedió a leer la absorbancia del mismo a 450nm, repitiendo el proceso cada hora hasta alcanzar las 24 horas.



A

B

Figura 14: A) Microplaca con las muestras de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y *Phytophthora infestans*, B) Lectura de las muestras en el espectrofotómetro.

Fuente: Autoría.

4.4.1 Conteo en cámara de Neubauer por horas

Para el conteo del número de células/ml que contenía cada tubo de eppendorf de 0,6µl, se utilizó la cámara de Neubauer, con la finalidad de conocer el crecimiento de las Bacterias y el Hongo en el lapso de 24 horas, para ello se tomó con una micropipeta una muestra tanto de *Bacillus thuringiensis* como de *Bacillus subtilis* y se colocó en cámaras de Neubauer bajo el microscopio, las muestras que se observaron fueron obtenidas cada hora prolongando su crecimiento en la incubadora hasta llegar a las 24 horas, el primer conteo se lo realizó a la hora 0, y se procedió a realizar el recuento cada 5 horas.

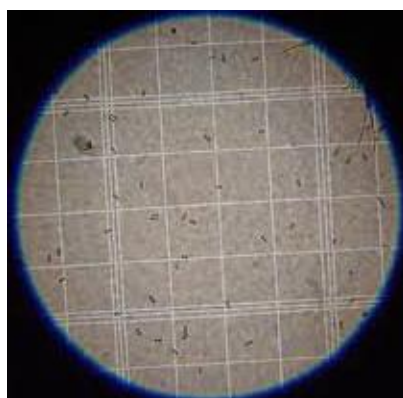


Figura 15. Crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*, en cámara de Neubauer a la hora 1.

Fuente: Autoría.

4.5 Análisis estadístico

El crecimiento de las cepas bacterianas se determinó a través de los procesos tales como: Conteo celular con cámara de Neubauer, contador de colonias UFC, medición de halos de inhibición y la absorbancia por espectrofotometría, siendo éstas, las técnicas utilizadas para obtener los resultados de la investigación.

Se comprobó la diferencia significativa entre las dosis de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* vs. *Phytophthora infestans*, y se interpretaron estadísticamente los valores tabulados y procesados mediante el programa informático Microsoft Excel, en cuanto a análisis de los datos se utilizó el programa estadístico InfoStat y para los datos obtenidos de las variables en estudio de la presente investigación se los evaluó mediante el análisis de varianza ADEVA, analizando el crecimiento bacteriano, mediante prueba TUKEY al 5%.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento de puntos de muestreo (Zonificación)

Al establecer puntos de muestreo se llegó a determinar las zonas más homogéneas de suelo de todo el área de estudio, como se observa en la figura 16, se determinó un área total de 480000m², donde se tomó un total de 60 muestras de suelo, dividiendo el terreno en dos lotes y tomando 30 muestras de cada lote, obtenidas específicamente de la rizósfera de papa.

Tejera, et al., (2011), muestran la existencia de microorganismos presentes en la rizósfera de papa y explican que mencionado lugar, es donde se produce el mayor desarrollo de bacterias del género *Bacillus*, por tal motivo se tomaron muestras exclusivamente de la rizósfera. Se llegaron a identificar las cepas: *Bacillus thuringiensis* AM747224.1 y *Bacillus subtilis* KJ870198.1, además de identificar las cepas de *Phytophthora infestans* MH401206.1 (Tabla 4.)

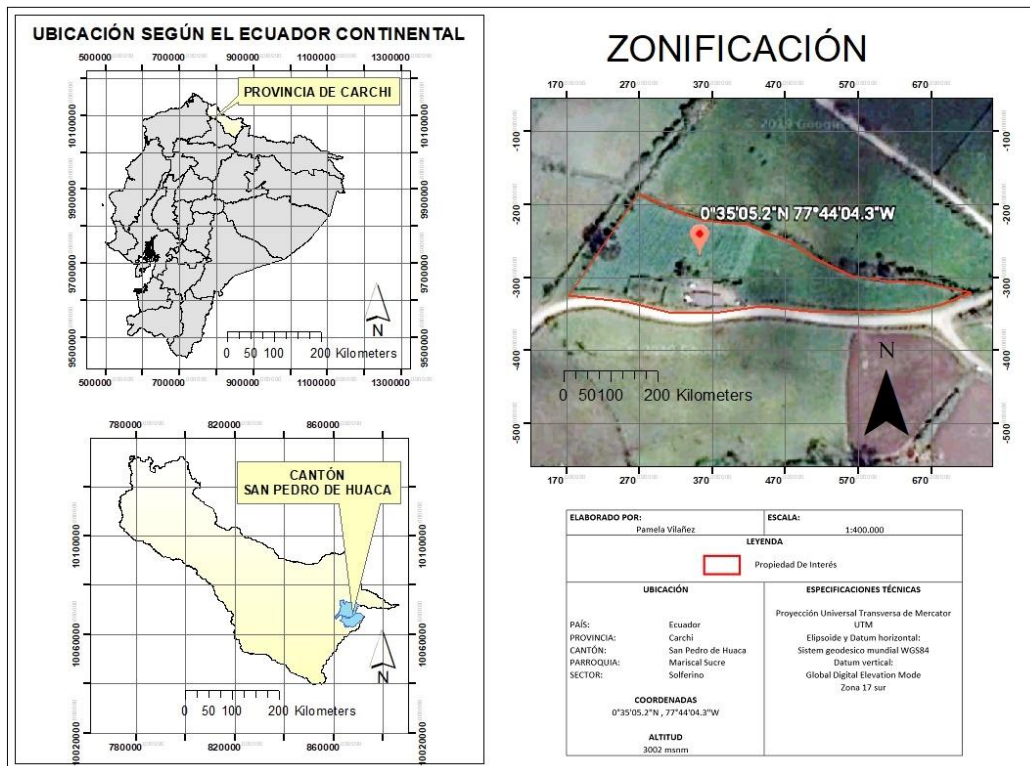


Figura 16. Zonificación del área de estudio, realizado en el programa ArcGIS.

Fuente: Autoría

5.2 Aislamiento de cepas puras

5.2.1 Aislamiento de cepas puras de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis*

Luego de procesar las 60 muestras de suelo recolectadas, y realizado el aislamiento respectivo de cada una de las bacterias, se observó la presencia de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* en las cajas de Petri respectivas; en la Tabla 4 se describen las características morfológicas observadas.

Para lograr obtener las cepas, se replicó la siembra, hasta obtener cepas puras de las bacterias y luego se identificó morfológicamente cada placa de Petri, para corroborar la existencia de cada bacteria se procedió a realizar el proceso de secuenciación.

5.2.2 Aislamiento de cepas puras de *Phytophthora infestans*

Luego de visualizar colonias individuales de *Phytophthora infestans* se purificó las muestras y se procedió con siembras eventuales hasta obtener cepas con las características citadas por García-Núñez et al., (2017), Luego de comparar características, y revisados los resultados enviados por Macrogen, se determinó la existencia de una cepa de *Phytophthora infestans* MH401206.1 (Tabla 4), tomando en cuenta la guía de García-Núñez et al., (2017) se consideró la textura, el tipo de micelio y la pigmentación de las esporas, observándose hifas ramificadas con diámetros de 5-8 μm y esporangios elipsoidales. Estos resultados se apegan a las características que reportan los autores antes mencionados, y coinciden con la descripción reportada.

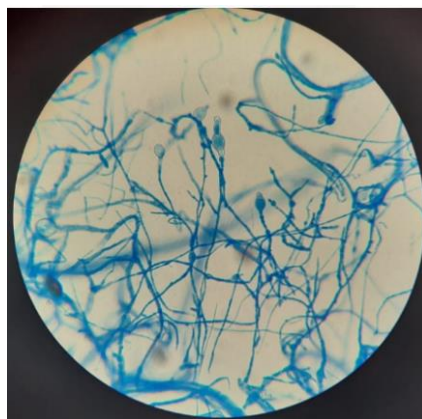


Figura 17. Pigmentación de esporas y esporangios de *Phytophthora infestans* observados al microscopio con objetivo 100x.

Fuente: Autoría.

Tabla 4.

Información de las cepas de Bacterias: Bacillus thuringiensis y Bacillus subtilis

Tipo de muestra: Cultivo en agar MRS		Temperatura de recepción: Ambiente
Aislamiento: cepas del género <i>Bacillus</i>		
Descripción Macroscópica	Colonia 1: colonias de 5 a 6mm de diámetro, blanca plana de bordes irregulares y de aspecto rugoso.	
	Colonia 2: colonias de 2 a 4mm de diámetro, planos, crema de bordes irregulares y de aspecto liso.	
Descripción Microscópica	Gram 72 horas, colonia 1: bacilos Gram positivos, largos con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo.	
	Gram 72 horas, colonia 2: bacilos Gram positivos, largos con bordes redondeados. Presentan esporas elipsoidales formando cadenas cortas.	
Pruebas Bioquímicas	Catalasa, colonia1: Positivo. Catalasa, colonia2: Positivo.	
Identificación.	Tanto la colonia 1, como la colonia dos son bacterias pertenecientes al Género <i>Bacillus</i> .	

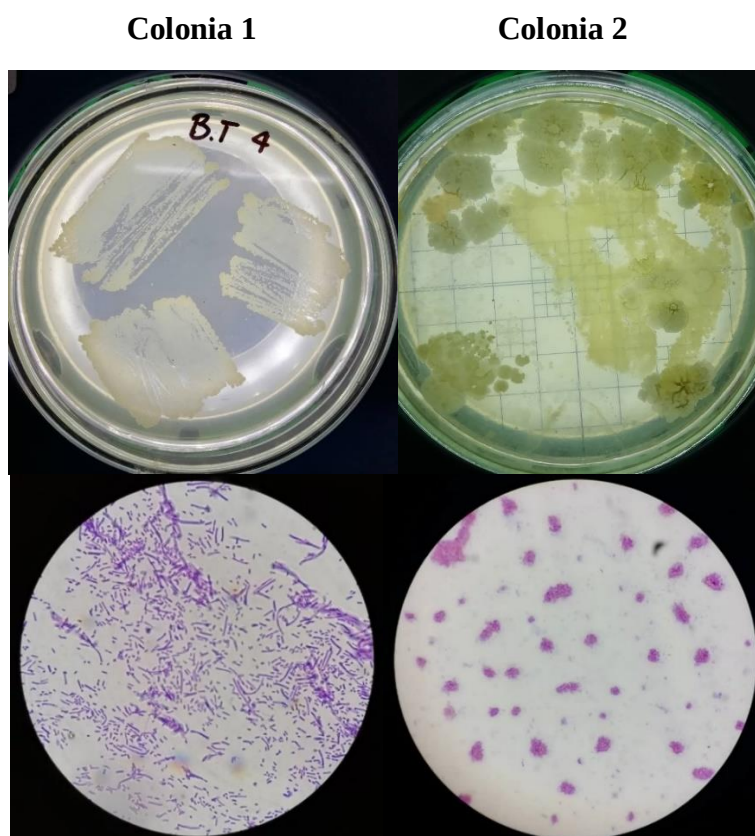


Figura 18. Colonia1: *Bacillus thuringiensis*, Colonia 2: *Bacillus subtilis*

Fuente: Autoría.

5.2.3 Identificación molecular de microorganismos

Todo el proceso de identificación fue realizado en el laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Quito, el proceso consistió en obtener material genético puro de los microorganismos en estudio para luego ser enviados a la Empresa Sur Korena Macrogen para continuar con el proceso de secuenciación⁸

⁸Jeniffer Yáñez, A. Mtr. Docente Investigadora, Fitopatología y Control Biológico PUCE; Ana Almeida, Becaria de Microbiología y Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico.

5.3 Secuenciación de cepas estudiadas

En base a los resultados enviados por Macrogen empresa sub coreana, se procedió a la codificación en el programa MEGA, la cadena de nucleótidos resultante se introdujo en el lector BLAST Online en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos, para confirmar la identidad bacteriana a nivel de especie de cada cepa, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5.

Secuencias relativamente más cercanas secuenciadas por BLAST

Cepa	Secuencia relativa más cercana	Porcentaje de identificación	Identificación de la secuencia	Grupo bacteriano
1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100 %	AM747224.1	Bacilos
2	<i>Bacillus subtilis</i>	99.93 %	KJ870198.1	Bacilos
3	<i>Phytophthora infestans</i>	100 %	MH401206.1	Oomicetos

Fuente: Lector BLAST (2019).

5.4 Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* frente al patógeno *Phytophthora infestans*

El proceso de evaluación de las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* frente al patógeno *Phytophthora infestans* se realizaron mediante pruebas de antagonismo las mismas que consistieron en analizar el diámetro del halo de inhibición en (mm), los promedios obtenidos luego de medir los halos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.

*Diámetro de halos inhibitorios (mm) de las Bacterias Bacillus thuringiensis y Bacillus subtilis vs Phytophthora infestans*⁹

		R1	R2	R3	$\bar{x}$
BT	D1: A1	11,2	10,81	10,94	10,98
BS	D2: A1	15,08	14,41	15,13	14,87

5.4.1 ADEVA del Halo de inhibición

El análisis de varianza (ADEVA) de la tabla 7, expresa que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos, además revela un coeficiente de variación de 2,45% lo que determina que existe una mínima dispersión de los datos con respecto a su promedio de diámetro de halos inhibitorios de 12,92 mm, es importante mencionar que el coeficiente de variación se encuentra dentro de los parámetros establecidos para pruebas in vitro ($CV \leq 8\%$), indicando que se dan condiciones similares en el momento de incubación de las muestras a las cero horas.

Con respecto a la normalidad, se obtuvieron valores estadísticos menores al *p-value* ($p < 0,0005$) siendo de 0,0001, por lo cual se acepta la hipótesis alternativa determinando que los microorganismos de *B. thuringiensis* y *B. subtilis*, presentan actividad biocontroladora frente al hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans*.

⁹**Nota:** *BT=*Bacillus thuringiensis*, BS=*Bacillus subtilis*, *D1=Dosis de *Bacillus thuringiensis* = 5×10^9 ufc.ml⁻¹, D2= Dosis de *Bacillus subtilis* = 1×10^6 ufc.ml⁻¹, *A1=Dosis de Hongo = 3×10^3 esporangios.ml⁻¹, *R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3, * $\bar{x}$ = promedio

Tabla 7.

Análisis de varianza del diámetro de halos inhibitorios (mm)¹⁰

F.V.	SC	GL	CM	F	p-value	significancia
Modelo	22,70	1	22,70	225,78	0,0001	*
Tratamientos	22,70	1	22,70	225,78	0,0001	*
Error	0,40	4	0,10			
Total	23,10	5				
CV	2,45%		$\bar{X}$= 12,92			

* *Significante*

** *Altamente significativa*

ns *Sin significancia*

Luego de analizar la prueba tukey al 5%, (figura 19), se demuestra la existencia de dos rangos de significancia, es decir, que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos vs *Phytophthora infestans*. Los datos muestran en el primer rango (A), al tratamiento 1 con un diámetro promedio de los halos de inhibición de 10,98mm de diámetro y en el segundo rango (B), al tratamiento 2 con 14,87mm de diámetro, siendo éste el tratamiento con el mayor diámetro de halo inhibitorio.

Según Caicedo y Chacón, (2017), el mayor halo inhibitorio por parte de la bacteria *Bacillus subtilis* se debe a la producción de metabolitos, como la fengimicina, los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como los resultados que se muestran en esta investigación.

¹⁰**Nota:** *F.V.= Fuentes de variación; *SC= Suma de cuadrados; *GL= Grados de libertad; *CM= Cuadrados medios; *F= Distribución; *CV = Coeficiente de variación.

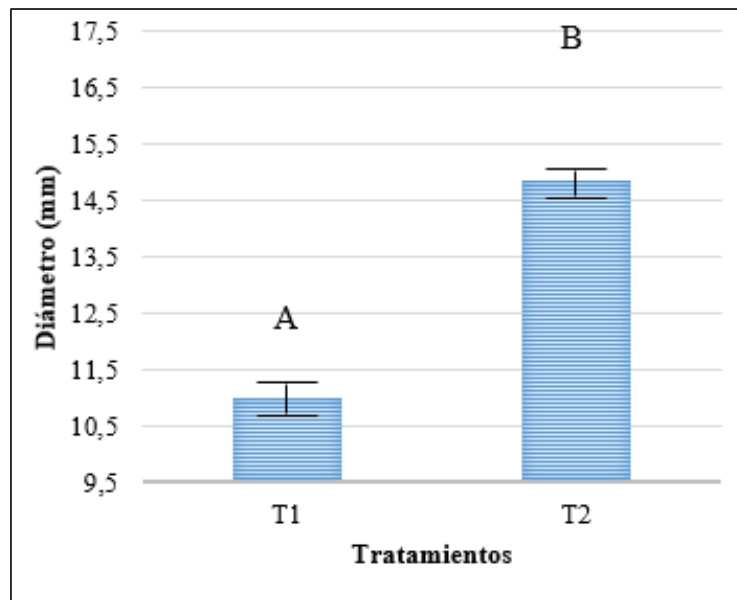


Figura 19. Diámetro de halos inhibitorios de *Bacillus thuringiensis* (Tratamiento 1) y *Bacillus subtilis* (Tratamiento 2) vs *Phytophthora infestans*

Conforme a los valores obtenidos en la tabla 7, se acepta la hipótesis alternativa determinando que las Bacterias tanto de *Bacillus thuringiensis* como de *Bacillus subtilis*, tiene acción inhibitoria frente al hongo *Phytophthora infestans*.

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Layton et al., (2006) la eficiencia de la bacteria *Bacillus subtilis* controla más de 23 tipos de patógenos en plantas, y todo ello gracias a la secreción de sustancias de la bacteria cuando ésta recibe los nutrientes que se encuentran en las raíces de las plantas, su actividad bio controladora inicia con la producción de fengimicina, que es el lipopéptido responsable de mostrar actividad contra hongos filamentosos.

Por otro lado las cepas de *Bacillus thuringiensis* y en acuerdo con Carreras, (2011) la cual menciona que, a pesar de la virulencia, seguridad y potencia contra organismos patógenos, su potencial anti fúngico es desconocido, por ello, en la presente investigación se probó el efecto inhibitor de la bacteria frente al hongo *Phytophthora infestans*, determinando que existe efecto antagonista debido a la producción de enzimas como la quitinasa, que actúan contra la pared celular y, por lo tanto, inhiben el crecimiento del hongo.

5.5 Conteo en cámara de Neubauer y Espectrofotometría

Para llevar a cabo el conteo del crecimiento bacteriano y de esporangios fue necesario la utilización del espectrofotómetro, la tabla 8 muestra las variables en estudio para estimar la densidad poblacional, con la interacción de las bacterias vs el hongo.

La lectura en el espectrofotómetro lee la turbimetría de cada muestra, donde luego de colocar las micro placas en el espectrofotómetro y leer la absorbancia a 450nm, se procedió a estimar el número de células por unidad de volumen del cultivo con la ayuda de la cámara de Neubauer.

Tabla 8.

Tratamientos en estudio para determinar el crecimiento bacteriano y fúngico.¹¹

	Caldo nutritivo ml	Hongo <i>Phytophthora infestans</i> ml	Bacterias	
			<i>Bacillus subtilis</i> ml	<i>Bacillus thuringiensis</i> ml
T1	9,00	1,00	---	---
T2	8,00	1,00	---	1,00
T3	8,25	1,00	0,75	---
T4	9,00	---	---	1,00
T5	9,00	---	1,00	---

5.6 Resultados de la absorbancia por Espectrofotometría (450 nm)

Para obtener resultados de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de las Bacterias frente a *Phytophthora infestans* se evaluaron 5 tratamientos que se muestran en la Tabla 8.

Las muestras fueron incubadas a 37,5 °C durante un período de 48 horas. Para obtener estos resultados se obtuvieron valores de absorbancia durante un lapso de 24 horas Anexo 23.

¹¹**Nota:** *T1= Tratamiento1: Crecimiento de esporangios; *T2= Tratamiento2: Crecimiento celular del hongo Vs. *Bacillus thuringiensis*; *T3= Tratamiento3: Crecimiento celular del hongo Vs. *Bacillus subtilis*; *T4= Tratamiento4: Crecimiento celular de *Bacillus thuringiensis*; *T5= Tratamiento5: Crecimiento celular de *Bacillus subtilis*.

Al analizar los resultados mostrados en dicho anexo, se determina que todos los tratamientos evaluados tienen efectos similares, esto se da por la incidencia de la luz que actúa en el espectrofotómetro, ya que, al pasar la muestra de bacterias se tornan turbias y esto provoca esos cambios en las lecturas del espectrofotómetro a 450 nm, el tratamiento 3 es la que mejores resultados obtuvo en comparación con el tratamiento 2 es decir que al comparar resultados frente a las cepas de *Phytophthora infestans*, en un tiempo determinado de 24 horas, según los criterios de Derevici y Dima (1969), demostraron la capacidad inhibitoria de las cepas de *Bacillus subtilis* frente a *P. infestans*, teniendo resultados altamente significativos, por otro lado aun después de comparar la dosis de *B. thuringiensis* frente al hongo, y considerando que esta cepa es entomopatógena resulta con un antagonismo positivo lo que lleva a la conclusión que sirve como un bio controlador fitopatógeno en nuestra investigación.

Una vez determinados los valores promedio de los niveles de absorbancia, determinados por el espectrofotómetro, se realizó el análisis de varianza tabla 9, donde se determinó el valor del *p-value* el cual fue de 0,0346 y de 0,0213 en los tratamientos, es decir $< 0,05$ esto expresa que existen diferencias significativas entre los cinco tratamientos, por lo que los datos se distribuyen de forma normal.

Tabla 9.

*Análisis de varianza de los niveles de absorbancia (nm)*¹²

F.V.	SC	GL	CM	F	<i>p-value</i>	significancia
Modelo	0,15	4	0,04	26,85	0,0346	*
Tratamientos	0,15	4	0,04	26,85	0,0213	*
Error	0,17	120	1,0004			
Total	0,33	124				
CV	6,8 %		$\bar{X}= 0,279$			

* Significante

** Altamente significativa

ns Sin significancia

La Tabla antes descrita (tabla 9), muestra que hay diferencias significativas entre tratamientos, ($p < 0,05$), además, al obtener un coeficiente de variación de 6,8 % determina que existe una variabilidad aceptable, con respecto al promedio de niveles de absorbancia de 0,279 nm, indicando que se dan condiciones similares en el momento en que las muestras son introducidas en el espectrofotómetro, cabe recalcar que el coeficiente de variación se encuentra dentro de los parámetros establecidos para pruebas in vitro ($CV \leq 8\%$),

En la presente investigación, el crecimiento bacteriano, no necesariamente es directamente proporcional con el crecimiento del hongo, debido a que los tratamientos 4 y 5 no crecen lo suficiente en el periodo de 24 horas, el cual coincide con la tasa de mayor crecimiento, sino que el tratamiento 1, a pesar de tener menor cantidad de bacterias por mililitro de caldo de cultivo, pudo crecer notablemente a diferencia de los otros tratamientos que crecieron en interacción bacterias y hongo respectivamente, teniendo en cuenta que el medio se mantuvo a una temperatura constante de 37,5°C.

Según Fernández-Larrea Vega, (2001) recientemente, determinó el efecto de *Bacillus sp.* sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium var cubensis*; también se realizaron pruebas in vitro con *Pseudomonas sp.* y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente. Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium*, *f. s. lycopersici*, *Pythium ultimum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Castellanos et al. (1995) evaluaron *Bacillus subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de fungicidas, determinándose que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos.

¹²**Nota:** *F.V.= Fuentes de variación; *SC= Suma de cuadrados; *GL= Grados de libertad; *CM= Cuadrados medios; *F= Distribución; *CV = Coeficiente de variación.

Uno de los usos de *B.subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

Con respecto a *Bacillus subtilis*, se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. Friddaman y Rossal (1993) observaron vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas.

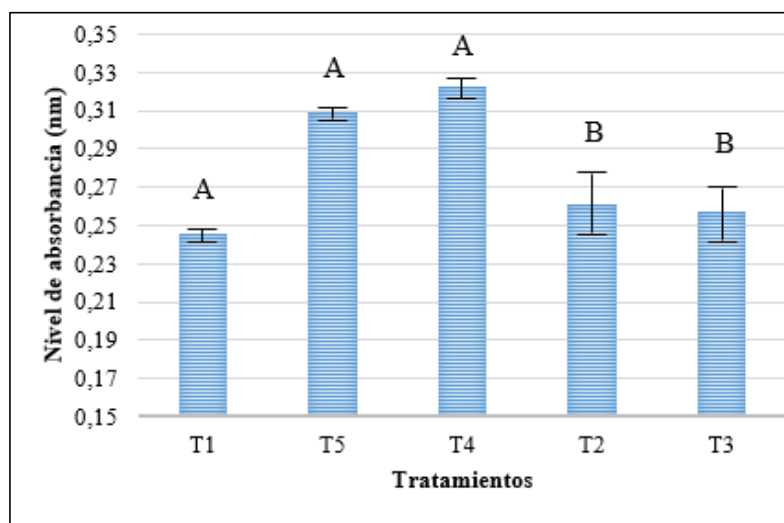


Figura 20. Niveles de absorbancia determinados en el espectrofotómetro, de los tratamientos en estudio¹³

Fuente: Autoría

¹³**Nota:** *T1= Nivel de absorbancia del Hongo; *T2= Nivel de absorbancia de *B. thuringiensis* vs Hongo; *T3= Nivel de absorbancia de *B. subtilis* vs Hongo; *T4 Nivel de absorbancia de *B. thuringiensis*; *T5= Nivel de absorbancia de *B. subtilis*.

La figura 20, con respecto a la prueba Tukey al 5% de los niveles de absorbancia entre los cinco tratamientos, se pueden observar dos rangos, de los cuales, el primer rango A pertenece a los tratamientos que crecieron en un lapso de 24 horas ya sea hongo o bacterias, destacándose el tratamiento 4 con una absorbancia de 0,267nm que representa 5×10^9 ufc.ml⁻¹, siendo esta la bacteria con mayor cantidad de organismos iniciales que fueron monitoreados para el análisis de crecimiento celular, a diferencia del rango B, tratamiento 2 y 3 cuya absorbancia es menor (0,195 nm) representando $1,05 \times 10^6$ ufc.ml⁻¹, ya que existe un reducido número inicial de organismos en el medio con respecto a los demás tratamientos.

A continuación, se detallan los resultados de espectrofotometría, figura 26, en la que se puede observar el crecimiento de las Bacterias y el Hongo en un tiempo determinado de 24 horas.

Los resultados mostrados en dicha figura, determinan que las dos dosis de bacterias tienen efectos inhibitorios frente al Hongo, a pesar de los picos que se forman, debido a la incidencia de la luz que actúa en el espectrofotómetro al pasar por las muestras, además se muestra que en un lapso no mayor a las 12 horas es cuando inicia el mayor efecto inhibitorio por parte de las bacterias donde se observa el decrecimiento notable por parte del hongo, en comparación con los dos tratamientos de las Bacterias.

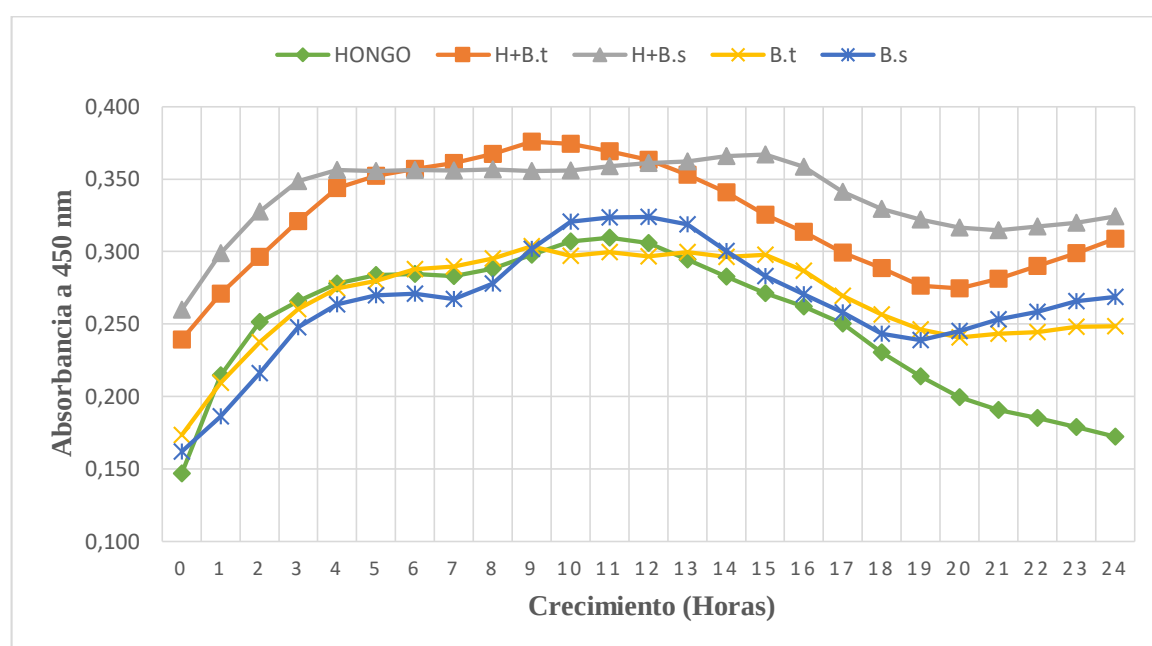


Figura 26. Curva de Absorbancia por espectrofotometría (450nm) de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* vs. *Phytophthora infestans* ¹⁴

El crecimiento bacteriano, depende de diversos factores, entre ellos la concentración de los compuestos en el medio, elementos adicionales o inclusive si el medio se presenta de manera sólida o líquida, en la presente investigación se muestra claramente que en un periodo de 72 horas de incubación, se llega a un máximo crecimiento celular, en las 2 bacterias estudiadas, pasado este tiempo, empiezan a decrecer, debido a la falta de nutrientes y a la temperatura a la que están sometidas (37,5°C).

En lo que respecta a los tratamientos 2 y 3 luego de llegar al máximo número de células en el medio, empiezan a disminuir rápidamente. Por otra parte, la cepa 1 tiene un crecimiento lento y no numeroso.

Rosell (2015), llega a tener un máximo crecimiento celular a los 60 días, realizando un conteo en cámara de Neubauer, debido al crecimiento individual que se tiene en el medio, pudiendo identificar cada organismo, mediante la utilización de un microscopio con un aumento de 40X, a diferencia de este estudio, que se alcanzó un máximo crecimiento a las 48 horas (2 días), en donde el crecimiento fue evaluado por espectrofotometría debido a que el crecimiento celular se efectuaba de manera agrupada, esto se comprobó debido a que inicialmente el crecimiento celular se lo realizó con ayuda de una cámara de Neubauer.

¹⁴**Nota:** *H=*Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹

*H+B.t = *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹ vs. *Bacillus thuringiensis*, dosis 5×10^9 UFC.ml⁻¹

*H+B.s = *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹ vs. *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹

*B.t = *Bacillus thuringiensis*, dosis 5×10^9 UFC.ml⁻¹

*B.s= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹

5.7 Crecimiento de Bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en Cámara de Neubauer (24 horas consecutivas)

De acuerdo a la tabla 10, los valores muestran diferencias conforme el paso de las horas debido a que inicia el crecimiento celular sin ningún limitante, esto favorece el rápido desarrollo del agente patógeno pudiéndose evidenciar lo antes dicho mediante un conteo celular en cámara de Neubauer.

Tabla 10.

Recuento de esporangios (esporangios.ml⁻¹) de Phytophthora infestans, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹ en cámara de Neubauer.

Horas	<i>Phytophthora infestans</i> Tratamiento 1
0	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	8,2x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	9,4x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	8,2x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	5,3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

En la figura 21 se determina que existe un crecimiento significativo del hongo, sin embargo con el paso del tiempo existe un decrecimiento de las cepas de *Phytophthora infestans*, dando inicio con 3000 esporangios por mililitro, y terminando en un lapso de 24 horas con 3020 esporangios lo que representa un crecimiento total del 18% de la población determinado por conteo en la cámara de Neubauer desde la hora 0 hasta la hora 24, tomando en cuenta los resultados propuestos por Derevici y Dima (1969), en los que también obtenían un decrecimiento en las cepas de hongos lo que demuestra que en un periodo no máximo a las 15 horas el hongo decrece significativamente.

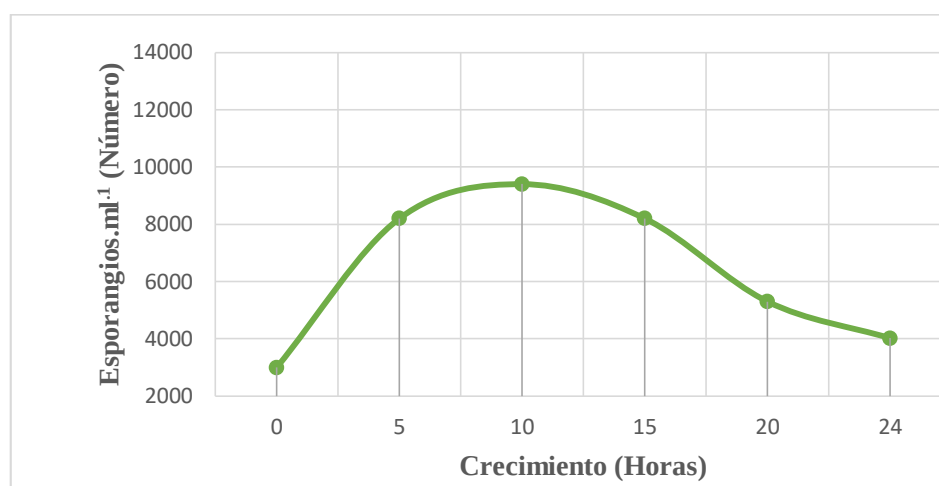


Figura 21. Crecimiento del Hongo *Phytophthora infestans* (T1), determinado por conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.

Fuente: Autoría

La tabla 11, expresa los datos registrados en cuanto al crecimiento celular entre la interacción de la bacteria *Bacillus thuringiensis* vs. *Phytophthora infestans*, se puede apreciar la diferencia en el crecimiento celular debido a la competencia que existe entre microorganismos.

Tabla 11.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios. ml⁻¹) de *Bacillus thuringiensis* (dosis 5x10⁹ ufc.ml⁻¹) vs. *Phytophthora infestans* (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer.

Horas	Tratamiento 2	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
0	5x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	15x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹	2,4x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	17x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹	2x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	13x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹	1,6x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	8x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹	1,2x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	9x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹	1x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

En la figura 22 se muestra la interacción que tiene la Bacteria *Bacillus thuringiensis* frente a *Phytophthora infestans*, mostrándose de esta manera que existe un decrecimiento significativo del hongo, esto comprueba que aun considerando a esta bacteria como entomopatógena, y luego de haber realizado las pruebas de antagonismo, se encontró a esta bacteria medianamente inhibitoria frente a las cepas de *Phytophthora infestans*, mediante el conteo en cámara de Neubauer se determinó que en la hora 10 es donde inicia la interacción de la Bacteria frente al Hongo produciendo así una muerte del 67% de la población del hongo, desde la hora 0 hasta la hora 24.

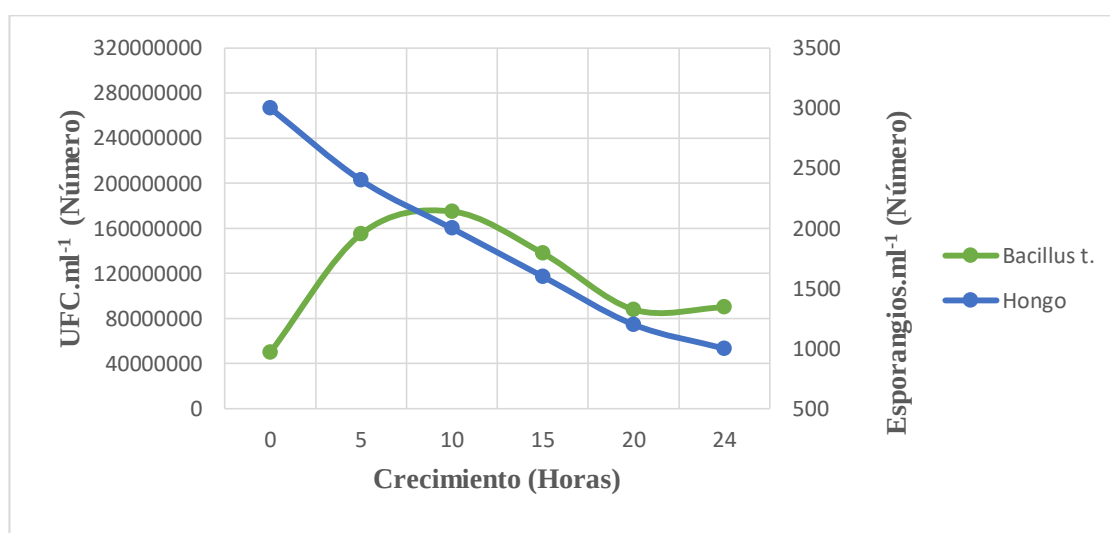


Figura 22. Resultados del Crecimiento de la Bacteria *Bacillus thuringiensis* vs. Crecimiento del Hongo *Phytophthora infestans* (T2), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.

Fuente: Autoría

La tabla 12, expresa los datos registrados en cuanto al crecimiento celular entre la interacción de la bacteria *Bacillus subtilis* vs. *Phytophthora infestans*, se puede apreciar la diferencia en el crecimiento celular debido a la competencia que existe entre microorganismos.

Tabla 12.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios. ml⁻¹) de Bacillus subtilis (dosis 1x10⁶ ufc.ml⁻¹) vs. Phytophthora infestans (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer.

Horas	Tratamiento 3	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
0	1x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	2,5x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹	2,4x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	2,6x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹	2,2x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	2,8x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹	2x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	2,1x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹	1,6x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	2,1x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹	1,4x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

En la figura 23 se muestra la interacción que tiene la Bacteria *Bacillus subtilis* frente al hongo *Phytophthora infestans*,, esto comprueba que la bacteria actúa de manera antagonista mucho antes, en comparación con la otra bacteria, es decir que el antagonismo inicia a la hora 5 produciendo el decrecimiento del hongo de una manera más rápida, se encontró a esta bacteria altamente inhibitoria frente a las cepas de *Phytophthora infestans*, mediante el conteo en cámara de Neubauer se determinó que antes de la hora 5 es donde inicia la interacción de la Bacteria frente al Hongo produciendo así una muerte del 54% de la población del hongo, desde la hora 0 hasta la hora 24.

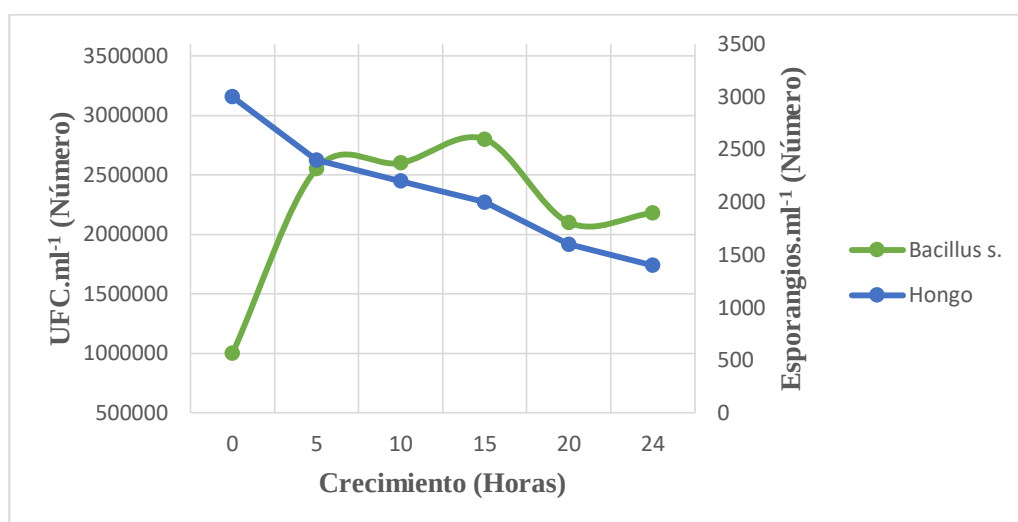


Figura 23. Resultados del Crecimiento de la Bacteria *Bacillus subtilis* vs. Crecimiento del Hongo *Phytophthora infestans* (T3), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.

Fuente: Autoría

Conforme a los datos presentados en la tabla 13, se registró diferencias en el crecimiento celular, ya que sin la interacción entre microorganismos se favorece el crecimiento para el microorganismo en estudio.

Tabla 13.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) de *Bacillus thuringiensis* (dosis 5x10⁹ ufc.ml⁻¹), en cámara de Neubauer.

Horas	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	Tratamiento 4
0	5x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹
5	7,6x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹
10	8,4x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹
15	8,4x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹
20	6,8x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹
24	7x10 ⁹ ufc.ml ⁻¹

En la figura 24 se determina que existe un crecimiento poblacional de las cepas de *Bacillus thuringiensis* iniciando con una dosis de 5×10^9 UFC.ml⁻¹ la cual alcanza un crecimiento total de 7×10^9 UFC.ml⁻¹ lo que representa un crecimiento del 40 % de la población determinado en la cámara de Neubauer desde la hora 0 hasta la hora 24, analizando los resultados según Romero, (2014), en el cual se determina un crecimiento de las cepas de la bacteria de *B. thuringiensis*, se puede determinar que esta bacteria resulta beneficiosa utilizada como bio controlador.

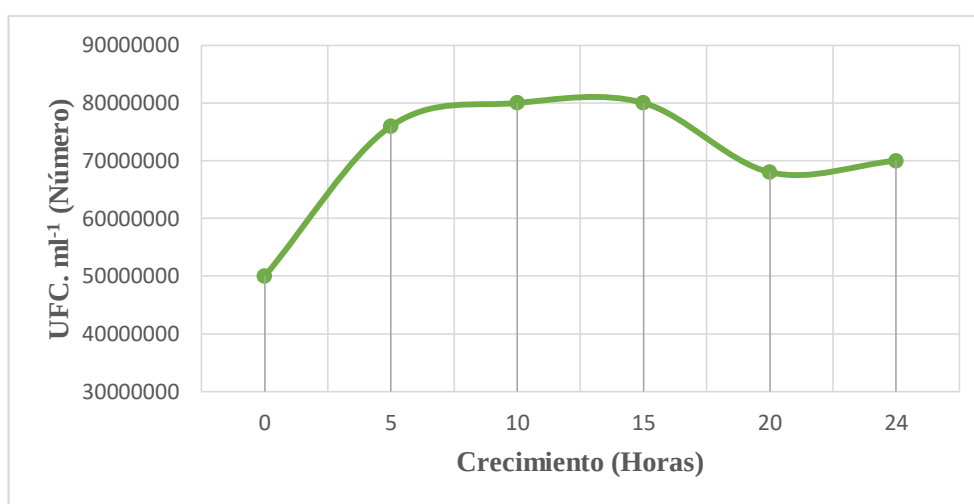


Figura 24. Resultados del Crecimiento de la Bacteria *Bacillus thuringiensis* (T4), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.

Fuente: Autoría

Conforme a los datos presentados en la tabla 14, se registró diferencias en el crecimiento celular, ya que sin la interacción entre microorganismos se favorece el crecimiento para el microorganismo en estudio.

Tabla 14.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) de *Bacillus subtilis* (dosis 1x10⁶ ufc.ml⁻¹), en cámara de Neubauer.

Horas	<i>Bacillus subtilis</i> Tratamiento 5
0	1x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹
5	1,8x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹
10	2,1x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹
15	2x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹
20	1,6x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹
24	2x10 ⁶ ufc.ml ⁻¹

En la figura 25 se determina que existe un crecimiento poblacional de las cepas de *Bacillus subtilis* iniciando con una dosis de 1x10⁶ UFC por mililitro a 2x10⁶ UFC lo que representa un crecimiento del 50 % de la población determinado en la cámara de Neubauer desde la hora 0 hasta la hora 24, analizando los resultados según Gómez, et al., (2012), en el cual se determina un crecimiento de las cepas de la bacteria de *B. subtilis*, se puede determinar que esta bacteria resulta altamente adaptable a diferentes condiciones, resultando así que se puede obtener un crecimiento poblacional elevado en un periodo no máximo a las 24 horas.

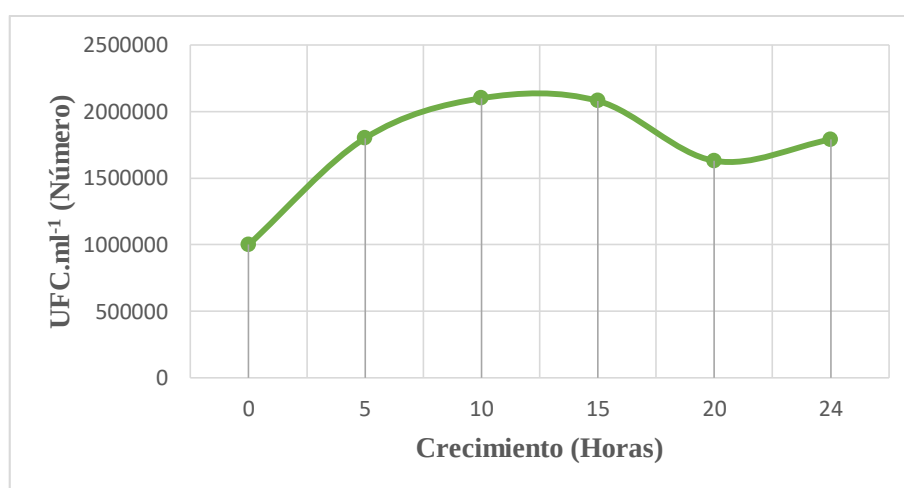


Figura 25. Resultados del Crecimiento de la Bacteria *Bacillus subtilis* (T5), determinado por el conteo en la Cámara de Neubauer, realizado a las 0, 5, 10, 15, 20 y 24 horas.

Fuente: Autoría

5.8 Resultados de la socialización

La socialización del presente trabajo de investigación se realizó en La Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, a las personas que cursan el octavo nivel de la carrera de Agropecuaria, a los cuales se les realizó una encuesta para evaluar el proceso de socialización.

Pregunta 1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?

La Figura 26 nos indica el resultado de la pregunta 1 donde el 53% de los encuestados consideraron un nivel alto de satisfacción a la sala donde se realizó la socialización diciendo que se brindó las comodidades necesarias, mientras que el 40% consideró un nivel muy alto.

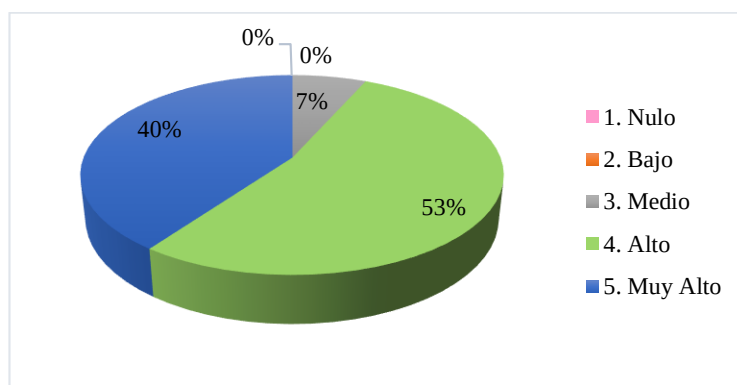


Figura 26. Tabulación a la pregunta 1.

Pregunta 2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?

La Figura 27 nos indica el resultado de la pregunta 2 donde el 67% de los encuestados consideraron un nivel alto de acuerdo al material audiovisual utilizado en la presentación, mientras que el 33% consideró un nivel muy alto.

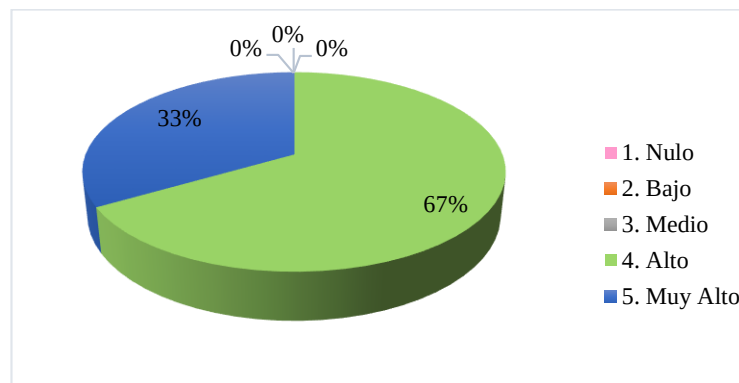


Figura 27. Tabulación a la pregunta 2.

Pregunta 3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?

La Figura 28 nos indica el resultado de la pregunta 3 donde el 67% de los encuestados consideraron un nivel muy alto, que el expositor mostró dominio del tema, mientras que el 33% consideró un nivel alto.

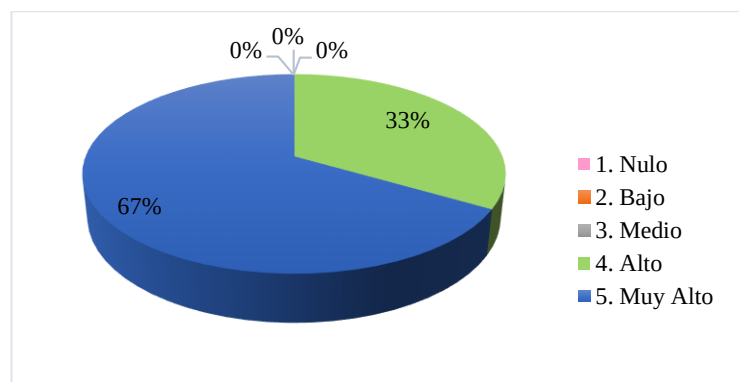


Figura 28. Tabulación a la pregunta 3.

Pregunta 4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?

La Figura 29 nos indica el resultado de la pregunta 4 donde el 53% de los encuestados consideraron un nivel alto, que el manejo del auditorio por parte del expositor fue el adecuado, mientras que el 40% consideró un nivel alto.

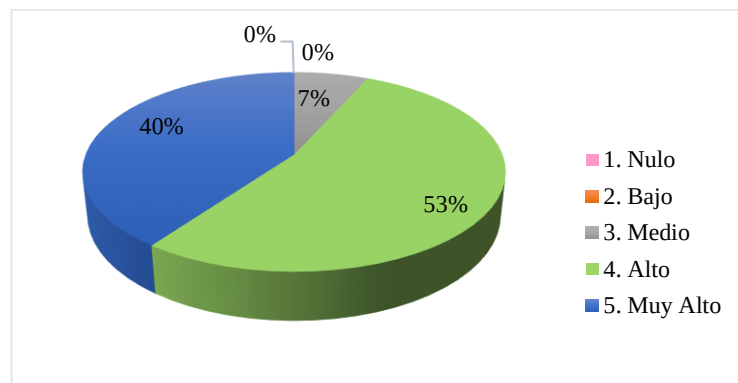


Figura 29. Tabulación a la pregunta 4.

Pregunta 5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?

La Figura 30 nos indica el resultado de la pregunta 5 donde el 60% de los encuestados consideraron un nivel muy alto, que el expositor demostró facilidad de expresión, mientras que el 40% consideró un nivel alto.

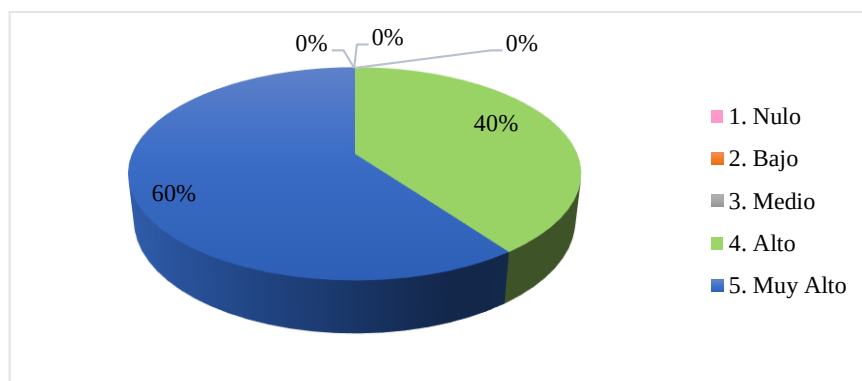


Figura 30. Tabulación a la pregunta 5.

Pregunta 6. ¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

La Figura 31 nos indica el resultado de la pregunta 6 donde el 53% de los encuestados consideraron un nivel alto, que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad, mientras que el 47% consideró un nivel muy alto.

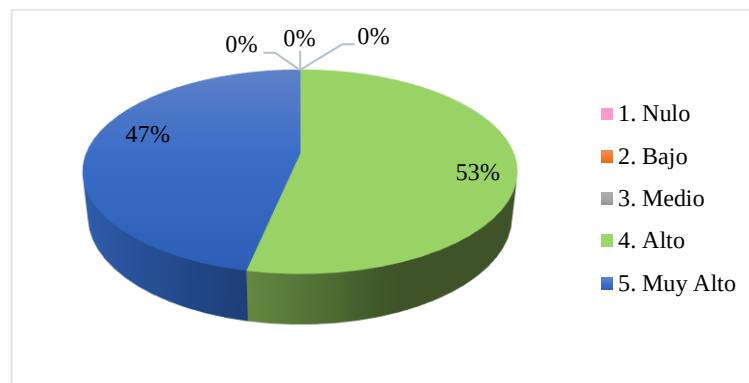


Figura 31. Tabulación a la pregunta 6.

Pregunta 7. ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores?

La Figura 32 nos indica el resultado de la pregunta 7 donde el 60% de los encuestados consideraron un nivel muy alto, que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores, mientras que el 40% consideró un nivel muy alto.

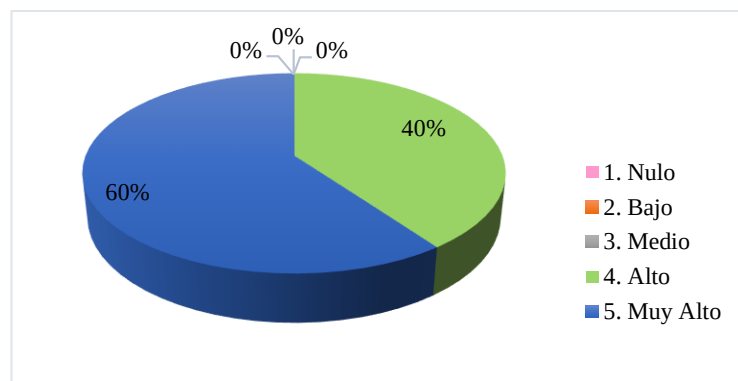


Figura 32. Tabulación a la pregunta 7.

Pregunta 8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución?

La Figura 33 nos indica el resultado de la pregunta 8 donde el 60% de los encuestados consideraron un nivel muy alto, que el tema investigado genera actualmente o a futuro un

beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución, mientras que el 33% consideró un nivel alto.

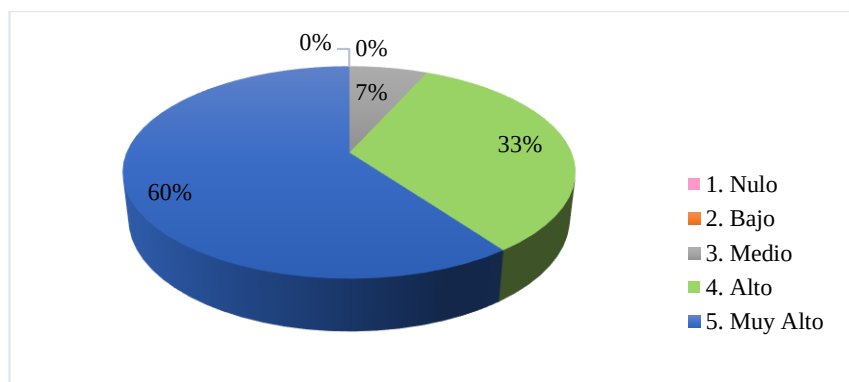


Figura 33. Tabulación a la pregunta 8.

Pregunta 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?

La Figura 34 nos indica el resultado de la pregunta 9 donde el 60% de los encuestados consideraron un nivel muy alto, que en función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, éstos se cumplieron, mientras que el 33% consideró un nivel alto.

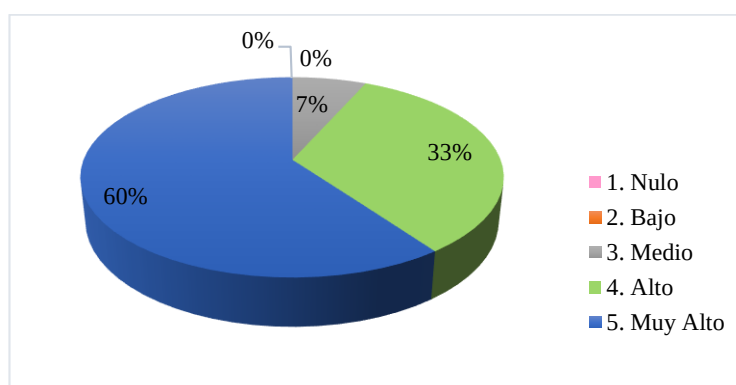


Figura 34. Tabulación a la pregunta 9.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Al ser Huaca uno de los principales cantones productores de papa se determinó mediante la zonificación, que es una zona óptima para realizar el aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis*, dando como resultado que la rizósfera es la zona donde más bacterias se encuentran presentes, debido a la gran capacidad de adaptabilidad, obteniendo así las cepas *Bacillus subtilis* KJ870198.1 y *Bacillus thuringiensis* AM747224.1
- En base a los resultados obtenidos en los antibiogramas se llegó a la conclusión que el tratamiento de *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*, presentó un control antagónico, mostrando mayor sensibilidad del patógeno con un halo de inhibición de 14,87 mm.
- Además, mediante la realización de antibiogramas se llegó a la conclusión que el tratamiento de *Bacillus thuringiensis* vs *Phytophthora infestans*, presentó una incidencia medianamente significativa frente al hongo, con un promedio de halo inhibitorio de 10,98 mm, lo que muestra tener un control antagónico.
- Se evidenció que el tratamiento 3 (Dosis de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*) fue el de mayor incidencia en comparación con el tratamiento 2 (Dosis de *Bacillus thuringiensis* vs *Phytophthora infestans*), lo que demuestra que aun siendo una bacteria fitopatógena comparada con una entomopatógena, los resultados se mostraron significativos pero no negativos.
- La curva de crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*., que fue medida en UFC durante 24 horas, demostró que la dosis (1×10^6 UFC.ml⁻¹) creció el 50% el número de UFC's (cel.ml⁻¹), en un período de 24 horas.

- La curva de crecimiento bacteriano de *Bacillus thuringiensis*., que fue medida en UFC durante 24 horas, demostró que la dosis (5×10^9 UFC.ml⁻¹) creció en un 40% el número de UFC's (cel.ml-1), en 24 horas.
- Se evidenció que el tratamiento 3 (Dosis de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*), obtuvo una diferencia altamente significativa. Indicando que los 5 tratamientos no tienen el mismo efecto.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- En relación a los resultados obtenidos, se recomienda continuar con la investigación, con la finalidad de realizar pruebas de campo para determinar el real efecto antagónico de las Bacterias obtenidas y así respaldar las cualidades antagónicas frente a hongos fitopatógenos.
- Para verificar con certeza la especie aislada, se recomienda utilizar un sistema analítico de identificación rápida para *Bacillus*, API 50 CHB y en lo posible pruebas de identificación molecular, esto conlleva a obtener resultados más efectivos y de manera más eficaz.
- Los resultados obtenidos demuestran que el aislamiento de bacterias a nivel de laboratorio resultan altamente efectivos si se realizan bajo un protocolo ya establecido, por lo que, al momento de realizar las pruebas de antagonismo, éstas generan un efecto positivo con respecto a los halos inhibitorios, por lo que, se recomienda trabajar con distintas bacterias y probar su efecto antagónico frente a distintas enfermedades, lo cual servirá de base para que se propongan nuevos temas de investigación.
- El uso de diferentes bacterias como bio controladores, nos permite hacer un buen uso de los recursos naturales disponibles y evitar con la continuidad de productos químicos en el medio, por ello, la implementación de un control biológico permite que no se impacte de manera negativa a nuestra madre naturaleza.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basantes, F., Albúja, M., & Vélez, A. (2016). Caracterización de la Cadena Agroproductiva de la papa y su fluctuación de los precios en mercados mayoristas de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha. *Economía Agraria (Revista Economía Agraria)*, 19(2016), 18–30. Obtenido de http://www.aeachile.cl/wp-content/uploads/2017/07/art2.2016-34_Basantes.pdf
- Cabezas, M. de L. C. (2009). *Producción de Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio, 1–87. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf>
- Caicedo Morales, S. E., & Chacón Muela, J. A. (2017). *Pruebas bajo inveradero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. en Brassica oleracea var italica y tecnicas de conservación de cepas*. Quito. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT11349.pdf>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). *Caracterizacion fisiologica de cepas de Bacillus spp. aisladas de la rizosfera de papa (Solanum tuberosum)*. *Ecología Aplicada*, 9(1), 31–39. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v9n1/a04v9n1.pdf>
- Carreras, B. (2011). *Aplicaciones de la bacteria entomopatógena Bacillus thuringiensis en el control de fitopatógenos Bertha*. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 129–133. Obtenido de <http://www.redalyc.org/html/4499/449945031006/>
- Cristian Layton , Edna Maldonado , Luisa Monroy, Lucia Constanza Corrales, L. C. S. (2011). *Bacillus spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos*. *Nova*, 10. <https://doi.org/1794-2470>
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Bogotá. Obtenido de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>

- De la Cruz-Armas, A. (2014). *Caracterización de bacterias antagonistas en el control de hongos fitopatógenos in vitro*. México. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/1153>
- Fernández-Larrea Vega, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)*, (62), 96–100. <https://doi.org/10.1080/09583150310001517992>
- Fernández, X., & Ortega, A. (2013). Uso de biocontroladores, una tendencia al alza. Retrieved October 21, 2018, Obtenido de <https://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2013/05/29/Uso-de-biocontroladores-una-tendencia-al-alza.aspx>
- Flores, A., Ecusquiza, R., Patiño, A., Sanchez, T., Alcarraz, M., Claudio, J., ... Evangelio, A. (2014). Selección evaluación de microorganismos nativos con potencial antagonista de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* promotores del crecimiento de tuberculillos de papa *Solanum tuberosum* L . in vitro. *Theorema - UNMSM*, 1(1), 27–36. Obtenido de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/Theo/article/view/11935>
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(1), 58–79. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4>
- García, A., Reyes, A., Ruiz, E., & Ibarra, J. (2018). Aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v9n3/2007-0934-remexca-9-03-539.pdf>
- García, J. E. (1997). Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente. *Agronomía Mesoamericana*, 8(1), 119–135. <https://doi.org/10.1117/12.469567>
- Hernández, A., Bautista, S., Velásquez, M., & Hernández, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos.

- Revista Mexicana de Fitopatología, 25(1), 66–74. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225109>
- Huilcapi C. E., (2012). *Combate de tizón tardío (Phytophthora infestans) con activadores de defensas naturales en el cultivo de papa (Solanum tuberosum) cv. superchola; Tesis - Pregrado. Ambato. ECUADOR.* Obtenido de http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1607/1/Tesis_010agr.pdf
- Lucero, S. (2013). *“Modelamiento a través de un SIG para la zonificación agroecológica de los principales cultivos (papa, maíz, brócoli, cebolla blanca, cebada y pasto) dentro de la parroquia de Alóag”*. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1663/1/106532.pdf>
- Márquez Torres, F. J. (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. Licenciatura.* Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/sources/fcm357a.pdf>
- Martín M, Martínez-Granero F., Rivilla R., (2011). *Colonización de la rizósfera por Pseudomonas.* Soiedad Española de Fijación de nitrógeno (SEFIN). Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/sources/fcm357a.pdf>
- Méndez, J. M., Flores, M. S., & Páramo, L. . (2018). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>
- Mojica, V., Luna, H., Saldoval, C., Pereyra, B., Morales, L., Gonzáles, N., ... Alvarado, O. (2009). *Control biológico de la marchitez del chile (Capsicum annuum L.) por Bacillus thuringiensis.* Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v78n2/v78n2a04.pdf>
- Ñacato, C., & Valencia, M. F. (2016). *Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp en Brassica oleracea var.italica.* Quito. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12144/1/UPS-QT09671.pdf?fbclid=IwAR0A9ynrIvwLHI1WRLtLcDBa2lTvKvElOLOQXt72pb4vI>

- Orbera, R., Pérez, P., Ferrer, S., Ramos, C., & Gonzales, G. (2005). Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioproteccion y la estimacion del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Quimica*, XVII(6), 189–196. Obtenido de <http://www.redalyc.org/html/4435/443543685078/index.html>
- Pérez, W., & Forbes, G. (2011). *Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina*. Lima - Perú. Obtenido de www.cipotato.org
- Pírez, M., & Mota, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9705-2>
- Probanza A., (2012). La rozósfera: un "criptoecosistema" vita. Aspectos básicos y aplicados. *Revista CONAMA del Congreso Nacional del Medio ambiente*. 9-12. <http://www.conama2012.conama.org/conama10/download/files/conama11/CT%202010/1896700116.pdf>
- Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*. *Biomédica* (Vol. 22). Instituto Nacional de Salud. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84322204>
- Robaina, B., Capalbo Fontana, D., & Nascimento Dos Santos, R. (2009). Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad Actividad Biológica Hacia *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmantalis* hübnér (Lepidoptera: Noctuidae). *Fitosanidad*, 13(3), 187–192. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092009000300005
- Rodríguez, A., Guillen, C., Uva, V., Segura, R., Laprade, S., & Sandoval, J. (2010). Proyecto demostrativo con Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Aspectos a Considerar Sobre El Control Biológico. *Corbana*, 2–3. <https://doi.org/10.1088/0953-4075/49/24/245204>
- Rojas, M., Sánchez, D., Rosales, K., & Lugo, D. (2017). *Antagonismo de Bacillus frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas*. *Revista de Protección Vegetal* (Vol. 32). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Obtenido de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000200005

- Rosero, J. L. (2016). Identificación y evaluación de bacterias endógenas en la solubilización de fósforo de tres órdenes y cinco usos de suelo de la provincia del Carchi., 22.
- Sánchez, E. (2001). Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas contra *Tribolium castaneum* (coleoptora: Tenebrionidae) (Herbst) y *Oryzaephilus surinamensis* (L). Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/1069/1/1080124486.PDF>
- Serrano, L., & Galindo, E. (2007). *Control Biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario*. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control Biologico Ciencia.pdf](http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf)
- Silva, B., Jaramillo, S., & Marín, M. (2009). *Caracterización genética de aislamientos de Phytophthora infestans en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y norte de Santander (Colombia)*. *Actual Biol* (Vol. 31). Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v31n90/v31n90a1.pdf>
- Tejera, B., Rojas, M., & Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3). Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/1812/181222321004/>
- Torres, L., Taipei, A., & Piedra, J. (2011). MANEJO DE LANCHA.
- Vélez C.P., Meneses R. L., zúñiga D. D., (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas alto andinas, Ecuador. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a17v7n1-2.pdf>
- Yanggen, D., Crissman, C. C., & Espinosa, P. (2003). Los plaguicidas: impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Obtenido de <https://www.share4dev.info/ffsnet/documents/3408.pdf>
- Yépez, J. (2016). *Validación de estrategias de manejo del tizón tardío (phytophthora infestans) de la papa, en tres variedades, píllaro, 2016*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8223/1/T-UCE-0004-53.pdf>

CAPÍTULO IX

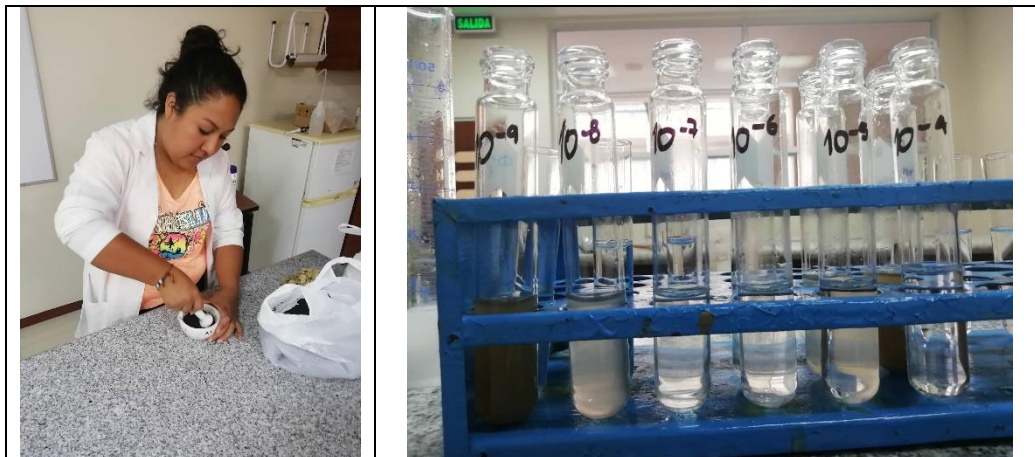
ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras y datos con el GPS del área de investigación ubicado en el Sector Solferino de la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre.



Fuente: Autoría

Anexo 2. Preparación de la solución madre en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCE-SI.



Fuente: Autoría

Anexo 3. Pesaje de muestras y preparación del medio de cultivo y materiales



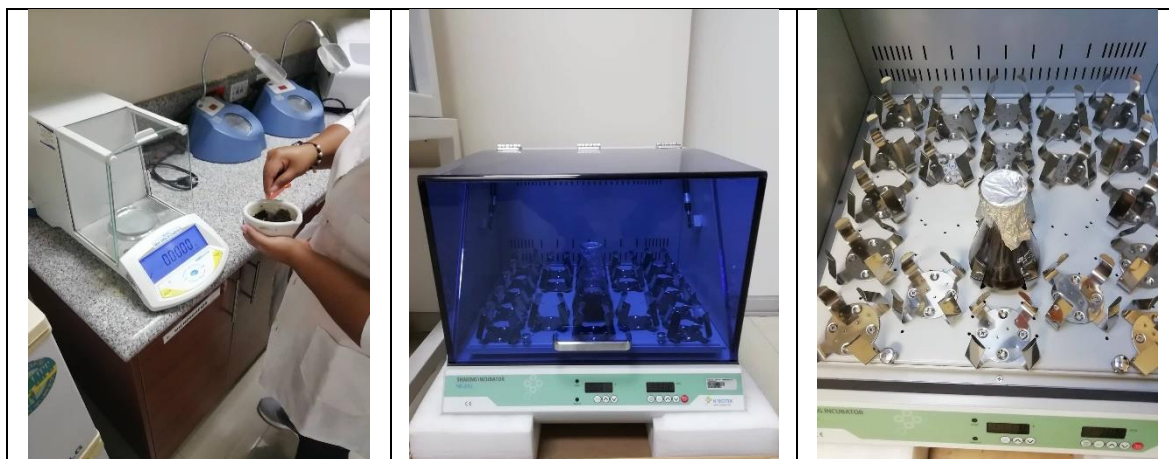
Fuente: Autoría

Anexo 4. Medios de cultivo NUTRINT BROTH (TM MEDIA®) y POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®)

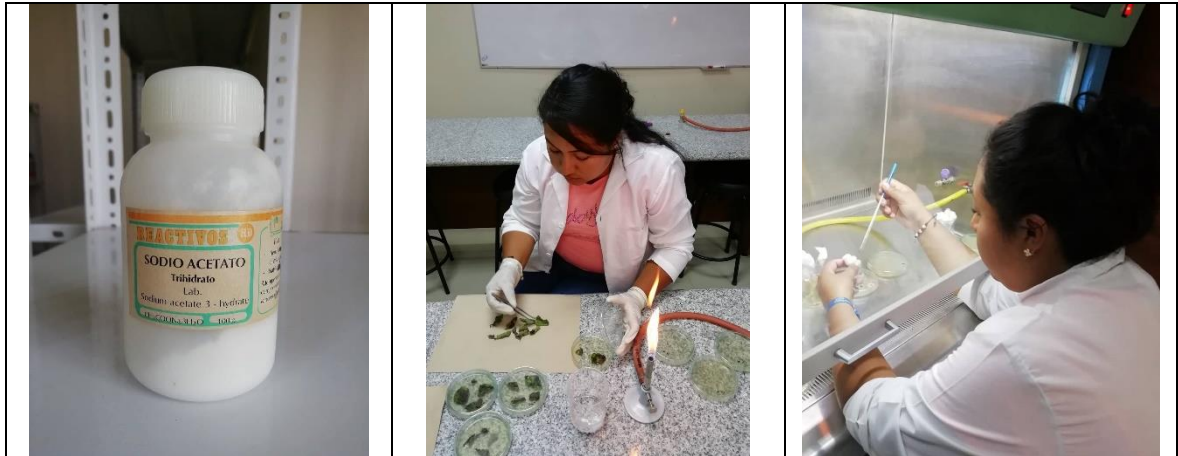


Fuente: Autoría

*Anexo 5. Aislamiento de Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis*.*

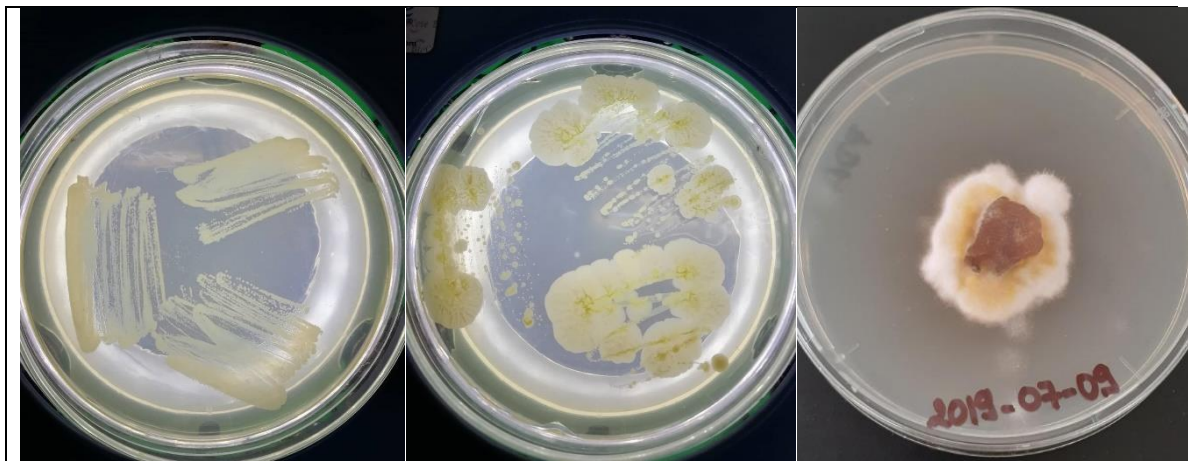


Fuente: Autoría



Fuente: Autoría

Anexo 6. Identificación macroscópica de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* además del Hongo *Phytophthora infestans*.

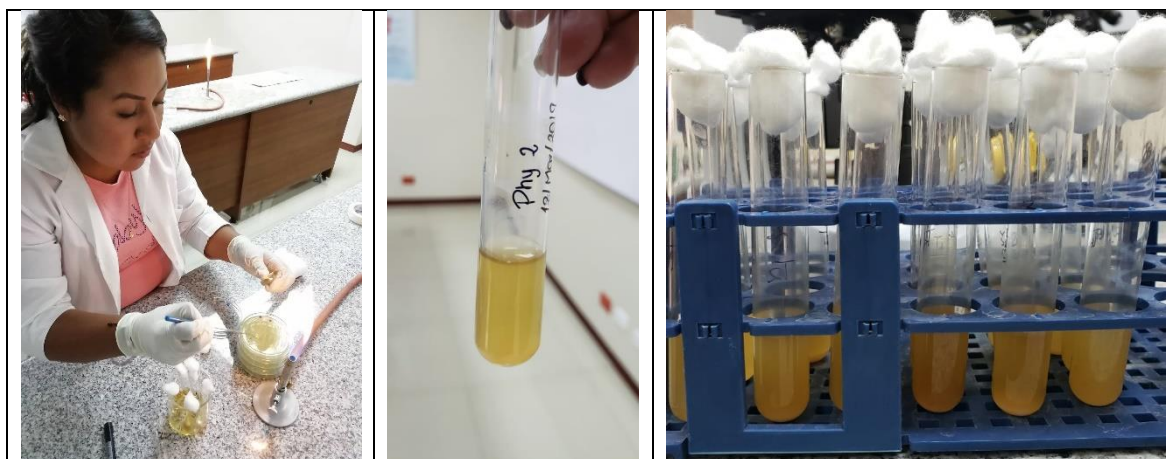


Fuente: Autoría

Anexo 7. Purificación de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* además de *Phytophthora infestans*.

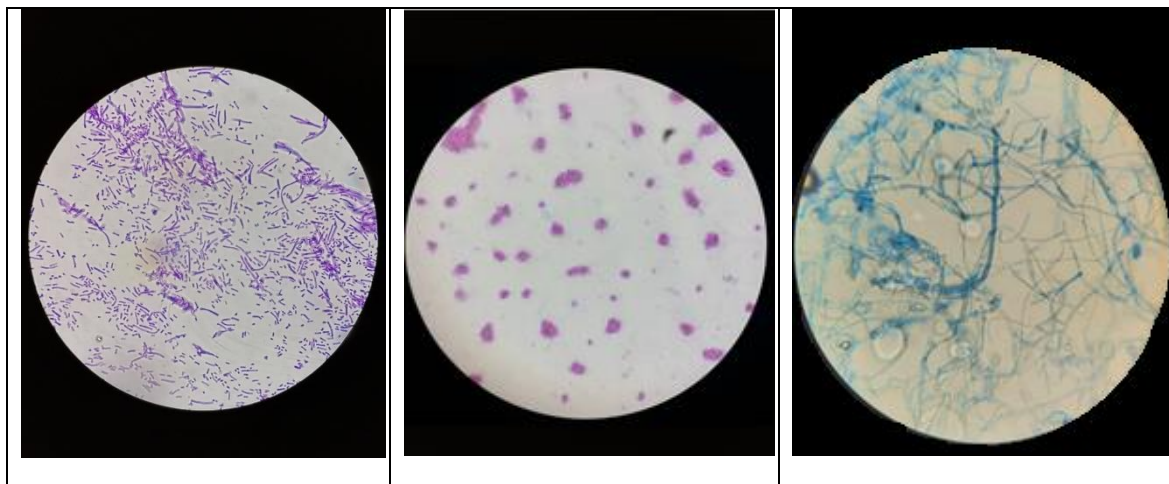


Fuente: Autoría



Fuente: Autoría

Anexo 8. Identificación Microscópica de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis*, además del Hongo *Phytophthora infestans*, observadas con el objetivo 100x.



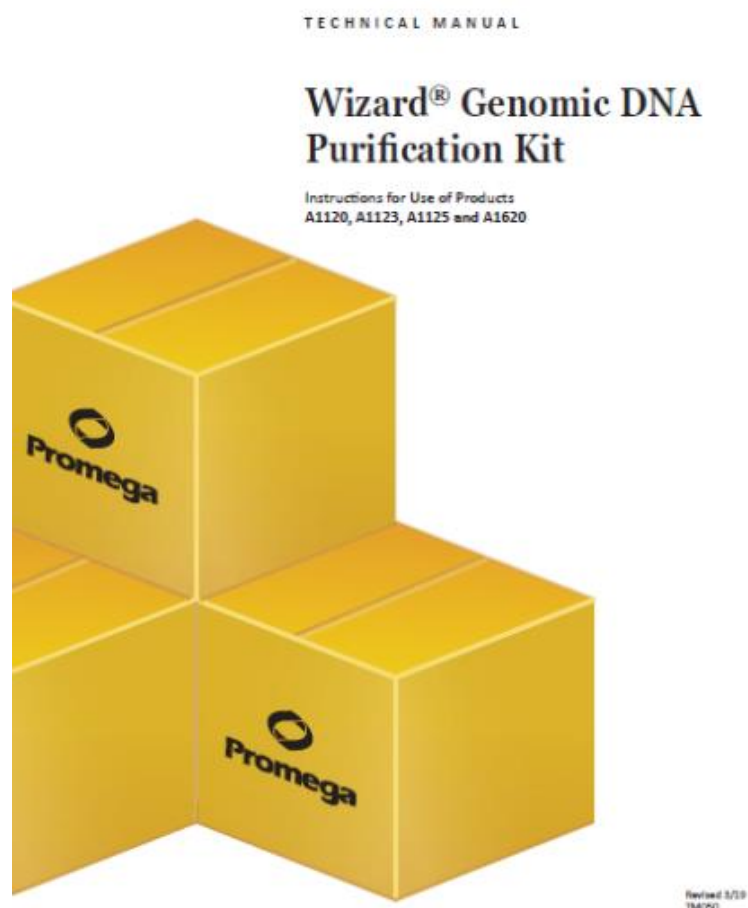
Fuente: Autoría

Anexo 9. Conteo de UFC en el Contador de Colonias



Fuente: Autoría

Anexo 10. Protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit utilizado para la identificación molecular



Fuente: Macrogen. Inc, (2019)

Anexo 11. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de Bacterias



3.F. Isolating Genomic DNA from Yeast (continued)

19. Rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2–8°C.

3.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
 - water bath, 80°C
 - water bath, 37°C
 - isopropanol, room temperature
 - 70% ethanol, room temperature
 - water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
 - 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
 - 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L4919) (for gram positive bacteria)
 - 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)
1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
 2. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. **For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.**
 3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
 4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl, and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.
Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidum*) lyse efficiently using lysozyme alone.
 5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g* and remove the supernatant.
 6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
 7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
 8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
 9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
 10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
 11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.

Fuente: Macrogen. Inc, (2019)

Anexo 12. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de *Phytophthora infestans*



3.E. Isolating Genomic DNA from Plant Tissue

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
 - liquid nitrogen
 - microcentrifuge tube pestle or mortar and pestle
 - water bath, 65°C
 - water bath, 37°C
 - isopropanol, room temperature
 - 70% ethanol, room temperature
1. Process leaf tissue by freezing with liquid nitrogen and grinding into a fine powder using a microcentrifuge tube pestle or a mortar and pestle. Add 40mg of this leaf powder to a 1.5ml microcentrifuge tube.
 2. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution, and vortex 1–3 seconds to wet the tissue.
 3. Incubate at 65°C for 15 minutes.
 4. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate, and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes. Allow the sample to cool to room temperature for 5 minutes before proceeding.
 5. Add 200µl of Protein Precipitation Solution, and vortex vigorously at high speed for 20 seconds.
 6. Centrifuge for 3 minutes at 13,000–16,000 × *g*. The precipitated proteins will form a tight pellet.
 7. Carefully remove the supernatant containing the DNA (leaving the protein pellet behind) and transfer it to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
 8. Gently mix the solution by inversion until thread-like strands of DNA form a visible mass.
 9. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature.
 10. Carefully decant the supernatant. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature.
 11. Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette.
 12. Invert the tube onto clean absorbent paper and air-dry the pellet for 15 minutes.
 13. Add 100µl of DNA Rehydration Solution and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
 14. Store the DNA at 2–8°C.

Anexo 13. ADN secuenciado de la cepas de *Bacillus thuringiensis*

GATGAACGCT	GGCGGCGTGC	CTAATACATG	CAAGTCGAGC	GAATGGATTG	AGAGCTTGCT
CTCAAGAAGT	TAGCGGCGGA	CGGGTGAGTA	ACACGTGGGT	AACCTGCCCCA	TAAGACTGGG
ATAACTCCGG	GAAACCGGGG	CTAATACCGG	ATAACATTTT	GAACTGCATG	GTTCGAAATT
GAAAGGCGGC	TTCGGCTGTC	ACTTATGGAT	GGACCCGCGT	CGCATTAGCT	AGTTGGTGAG
GTAACGGCTC	ACCAAGGCAA	CGATGCGTAG	CCGACCTGAG	AGGGTGATCG	GCCACACTGG
GACTGAGACA	CGGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTA	GGGAATCTTC	CGCAATGGAC
GAAAGTCTGA	CGGAGCAACG	CCGCGTGAGT	GATGAAGGCT	TTCGGGTCGT	AAAACCTCTGT
TGTTAGGGAA	GAACAAGTGC	TAGTTGAATA	AGCTGGCACC	TTGACGGTAC	CTAACCAGAA
AGCCACGGCT	AACTACGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGT	AGGTGGCAAG	CGTTATCCGG
AATTATTGGG	CGTAAAGCGC	GCGCAGGTGG	TTTCTTAAGT	CTGATGTGAA	AGCCACGGC
TCAACCGTGG	AGGGTCATTG	GAAACTGGGA	GACTTGAGTG	CAGAAGAGGA	AAGTGGAATT
CCATGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGAGATA	TGGAGGAACA	CCAGTGGCGA	AGGCGACTTT
CTGGTCTGTA	ACTGACACTG	AGGCGCGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	TAGATACCCT
GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGAGTGCTA	AGTGTTAGAG	GGTTTCCGCC	CTTTAGTGCT
GAAGTTAACG	CATTAAGCAC	TCCGCCTGGG	GAGTACGGCC	GCAAGGCTGA	AACTCAAAGG
AATTGACGGG	GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAAGC	AACGCGAAGA
ACCTTACCAG	GTCTTGACAT	CCTCTGAAAA	CCCTAGAGAT	AGGGCTTCTC	CTTCGGGAGC
AGAGTGACAG	GTGGTGTCATG	GTTGTCGTCA	GCTCGTGTCG	TGAGATGTTG	GGTTAAGTCC
CGCAACGAGC	GCAACCCCTG	ATCTTAGTTG	CCATCATTA	GTTGGGCACT	CTAAGGTGAC
TGCCGGTGAC	AAACCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAA	TCATCATGCC	CCTTATGACC
TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGACGGTA	CAAAGAGCTG	CAAGACCGCG	AGGTGGAGCT
AATCTCATAA	AACCGTTCTC	AGTTCGGATT	GTAGGCTGCA	ACTCGCCTAC	ATGAAGCTGG
AATCGCTAGT	AATCGCGGAT	CAGCATGCCG	CGGTGAATAC	GTTCCCGGGC	CTTGATACACA
CCGCCCCGTCA	CACCACGAGA	GTTTGTAACA	CCCGAAGTCG	GTGGGGTAAC	CTTTTTTGAG
CCAGCCGCCT	AAGGTGGGAC	AGATGATTGG	GGTGAAGTCG	TAACAA	

Fuente: BLAST Online – Página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 14. ADN secuenciado de la cepa de *Bacillus subtilis*

AATATGGGGC	GTCCTAATAC	ATGCAAGTCG	AGCGGACAGA	TGGGAGCTTG	CTCCCTGATG
TTAGCGGCGG	ACGGGTGAGT	AACACGTGGG	TAACCTGCCT	GTAAGACTGG	GATAACTCCG
GGAAACCGGG	GCTAATACCG	GATGGTTGTT	TGAACCGCAT	GGTTCAAACA	TAAAAGGTGG
CTTCGGCTAC	CACTTACAGA	TGGACCCGCG	GCGCATTAGC	TAGTTGGTGA	GGTAACGGCT
CACCAAGGCA	ACGATGCGTA	GCCGACCTGA	GAGGGTGATC	GGCCACACTG	GGAAGTACAG
ACGGCCCAGA	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGT	AGGGAATCTT	CCGCAATGGA	CGAAAGTCTG
ACGGAGCAAC	GCCGCGTGAG	TGATGAAGGT	TTTCGGATCG	TAAAGCTCTG	TTGTTAGGGA
AGAACAAGTA	CCGTTTCAAT	AGGGCGGTAC	CTTGACGGTA	CCTAACCAGA	AAGCCACGGC
TAAGTACGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG	TAGGTGGCAA	GCGTTGTCCG	GAATTATTGG
GCGTAAAGGG	CTCGCAGGCG	GTTTCTTAAG	TCTGATGTGA	AAGCCCCCGG	CTCAACCGGG
GAGGGTCATT	GGAAACTGGG	GAAGTTGAGT	GCAGAAGAGG	AGAGTGGAAT	TCCACGTGTA
GCGGTGAAAT	GCGTAGAGAT	GTGGAGGAAC	ACCAGTGGCG	AAGGCGACTC	TCTGGTCTGT
AACTGACGCT	GAGGAGCGAA	AGCGTGGGGA	GCGAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA

CGCCGTAAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGG GGGGTTTCCG CCCCTTAGTG CTGCAGCTAA
 CGCATTAAGC ACTCCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGACT GAAACTCAA GGAATTGACG
 GGGGCCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA GAACCTTACC
 AGGTCTTGAC ATCCTCTGAC AATCCTAGAG ATAGGACGTC CCCTTCGGGG GCAGAGTGAC
 AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA
 GCGCAACCCCT TGATCTTAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGGTG
 ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGCTAC
 ACACGTGCTA CAATGGACAG AACAAAGGGC AGCGAAACCG CGAGGTTAAG CCAATCCCAC
 AAATCTGTTT TCAGTTCGGA TCGCAGTCTG CAACTCGACT GCGTGAAGCT GGAATCGCTA
 GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGTACA CACCGCCCGT
 CACACCACGA GAGTTTGTAA CACCCGAAGT CGGTGAGGTA ACCTTTTAGAG ATTACAGCGC
 GACTTTGTTA CAAGCCCAAC CACTGTGGGC C

Fuente: BLAST Online – Página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 15. ADN secuenciado de la cepa de *Phytophthora infestans*

CCACACCTAA AAACCTTTCCA CGTGAACCGT TTCAACCCAA TAGTTGGGGG TCTTACTTGG
 CGGCGGCTGC TGGCTTTATT GCTGGCGGCT ACTGCTGGGC GAGCCCTATC AAAAGGCGAG
 CGTTTGACT TCGGTCTGAG CTAGTAGCTT TTTTATTTTA AACCTTTTAC TTAATACTGA
 TTATACTGTG GGGACGAAAG TCTCTGCTTT TAACTAGATA GCAACTTTCA GCAGTGGATG
 TCTAGGCTCG CACATCGATG AAGAACGCTG CGAACTGCGA TACGTAATGC GAATTGCAGG
 ATTCAGTGAG TCATCGAAAT TTTGAACGCA TATTGCACTT CCGGGTTAGT CCTGGAAGTA
 TGCCTGTATC AGTGTCCGTA CAACAACTT GGCTTTCTTC CTTCCGTGTA GTCGGTGGAG
 GAGATGCCAG ATGTGAAGTG TCTTGCGGTT GGTTTTCGGA CCGACTGCGA GTCCTTTTAA
 ATGTACTAAA CTGTACTTCT CTTTGCTCCA AAAGTGGTGG CATTGCTGGT TGTGGACGCT
 GCTATTGTAG CGAGTTGGCG ACCGGTTTGT CTGCTGCGGC GTTAATGGAG AAATGCTCGA
 TTCGTGGTAT GGTGCGCTTC GGCTGAACAA TGCCTTATT GGGTGATTTT CCTGCTGTGG
 CGTGATGGAC TGGTGAACCA TGGCTCTTTA GCTTGGCATT TGAATCGGCT TTGCTGTTGC
 GAAGTAGAGT GGCGGCTTCG GCTGCCGAGG GTCGATCCAT TTGGGAAATG TTGTGTACTT
 CGGTATGCAT CTCAA

Fuente: BLAST Online – Página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 16. Secuencias relativamente más cercanas de *Bacillus thuringiensis* secuenciadas por BLAST

☐ Bacillus thuringiensis MC28, genoma completo	2745	41256	100%	0.0	100.00%	CP003687.1
☐ Bacillus thuringiensis HD-789, genoma completo	2745	38350	100%	0.0	100.00%	CP003763.1
☐ Bacillus thuringiensis HD-771, genoma completo	2745	32743	100%	0.0	100.00%	CP003752.1
☐ Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43, genoma completo	2745	37828	100%	0.0	100.00%	CP001907.1
☐ Bacillus sp. clon Filt 98 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	2745	2745	100%	0.0	100.00%	HM152685.1
☐ Bacillus cereus G9842, genoma completo	2745	35582	100%	0.0	100.00%	CP001186.1
☐ Bacillus thuringiensis gen parcial 16S rRNA e ITS1, cepa IEBCT24001	2745	2745	100%	0.0	100.00%	AM747224.1
☐ Bacillus thuringiensis cepa 4Q281 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	2745	2745	100%	0.0	100.00%	AF155954.1
☐ Bacillus cereus biovar toyoi 16S rRNA gene, CNM I-1012 / NCIB 40112	2745	2745	100%	0.0	100.00%	AJ310100.1
☐ Bacillus thuringiensis cepa IAM 12077 16S ARN ribosómico, secuencia parcial	2745	2745	100%	0.0	100.00%	NR_043403.1

Fuente: BLAST Online – Página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 17. Secuencias relativamente más cercanas de *Bacillus subtilis* secuenciadas por BLAST

← → ↻ 🏠 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 🔍 ⭐ 📄

Descripciones

Secuencias que producen alineaciones significativas:
 Seleccionar: [Todos](#) [Ninguno](#)
 Seleccionado: 0

[Alineaciones](#) [Descargar](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Árbol de distancia de resultados](#)

Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor e	Por. Ident	Adhesión
☐ Bacillus subtilis cepa B18 16S gen ribosómico del ARN, secuencia parcial	2712	2712	100%	0.0	99.93%	KJ870198.1
☐ Bacillus subtilis cepa SEM-9 cromosoma, genoma completo	2623	26111	96%	0.0	99.86%	CP021123.1
☐ Bacillus subtilis 16S gen ribosomal RNA, secuencia parcial	2623	2623	96%	0.0	99.86%	KX092006.1

Fuente: BLAST Online – Página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 18. Secuencias relativamente más cercanas de *Phytophthora infestans* secuenciadas por BLAST

← → ↻ 🏠 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 🔍 ⭐ 📄

Descripciones

Secuencias que producen alineaciones significativas:
 Seleccionar: [Todos](#) [Ninguno](#)
 Seleccionado: 0

[Alineaciones](#) [Descargar](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Árbol de distancia de resultados](#)

Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor e	Por. Ident	Adhesión
☐ Phytophthora infestans gen 13-A2 18S ARN ribosomal gen, secuencia parcial, espaciador transcrito interno 1, gen del ARN ribosomal 5.8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa	1469	1469	100%	0.0	100.00%	MH401206.1
☐ Phytophthora infestans aislan el gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña phyto24, secuencia parcial, espaciador transcrito interno 1, gen del ARN ribosomal 5.8S, y espaciador transcrito	1469	1469	100%	0.0	100.00%	MH178350.1
☐ Phytophthora mirabilis cepa transcrita interna 1 tipo CPHST BL 25 tipo Ex, secuencia parcial, 5.8S gen de ARN ribosomal, secuencia completa, y espaciador transcrito interno 2, secuencia parcial	1469	1469	100%	0.0	100.00%	M3865541.1

Fuente: BLAST Online – Página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 19. Elaboración de cultivos duales, Laboratorios de la PUCE-SI



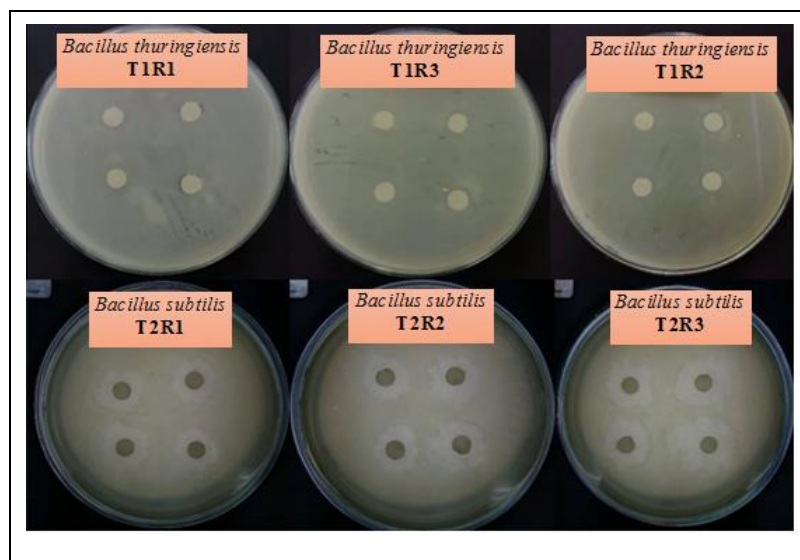
Fuente: Autoría

Anexo 20. Medición de Halos inhibitorios (mm) con pie de rey, Laboratorios de la PUCE-SI.



Fuente: Autoría

Anexo 21. Resultados de los tratamientos en estudio de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* vs. *Phytophthora infestans*.



Fuente: Autoría

Anexo 22. Preparación de tratamientos para lectura mediante Espectrofotometría (450 nm)



Fuente: Autoría

Anexo 23. Promedios de los niveles de absorbancia de los cinco tratamientos, en el espectrofotómetro (450 nm)

Nivel de absorbancia ¹⁶					
H	T1	T2	T3	T4	T5
0	0,147	0,239	0,260	0,173	0,162
1	0,215	0,271	0,299	0,209	0,186
2	0,251	0,296	0,328	0,237	0,216
3	0,266	0,321	0,349	0,260	0,248
4	0,278	0,344	0,356	0,275	0,264
5	0,284	0,352	0,356	0,280	0,270
6	0,284	0,357	0,356	0,288	0,271
7	0,283	0,361	0,356	0,29	0,267
8	0,288	0,367	0,357	0,295	0,278
9	0,298	0,376	0,356	0,304	0,302
10	0,307	0,374	0,356	0,297	0,321
11	0,309	0,369	0,359	0,300	0,324
12	0,306	0,363	0,361	0,297	0,324
13	0,294	0,353	0,362	0,300	0,319
14	0,283	0,341	0,366	0,296	0,300
15	0,271	0,325	0,367	0,298	0,283
16	0,262	0,314	0,358	0,287	0,271
17	0,250	0,299	0,341	0,269	0,258
18	0,230	0,289	0,329	0,256	0,243
19	0,214	0,276	0,322	0,246	0,239
20	0,199	0,275	0,317	0,241	0,245
21	0,191	0,281	0,315	0,243	0,253
22	0,185	0,290	0,317	0,244	0,259
23	0,179	0,299	0,32	0,248	0,266
24	0,172	0,309	0,324	0,248	0,269

Fuente: Autoría

Anexo 24. Invitación a la socialización



LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial Invitación a la socialización del trabajo de investigación:

*"Evaluación de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*) para el control de *Phytophthora infestans*"*

Cuyo autor es la señorita PAMELA ALEXANDRA VILAÑEZ MONTENEGRO, de la carrera de INGENIERÍA AGROPECUARIA

Fecha: Miércoles, 08 de mayo del 2019

Lugar: Edificio 4, Aula 4.3.12 de la PUCE-SI

Hora: 09:00 am

RESUMEN

Bacillus es un género altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos debido a su gran capacidad de formación de esporas, lo cual le da una ventaja de supervivencia en la rizósfera vegetal. En la presente investigación se realizó una descripción morfológica de las colonias, además, se estudió el efecto inhibitorio de las Bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* presentes en la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío o lancha. La fase de campo se llevó a cabo en el sector Solferino, ubicado en la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca, parroquia rural Mariscal Sucre, donde se recolectaron muestras de la rizósfera, en cantidades de 1 kg por muestra aproximadamente, con la finalidad de aislar y purificar cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* para posteriormente realizar pruebas de antagonismo frente a *Phytophthora infestans*, en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra.

Fuente: Autoría

Anexo 25. Socialización de Resultados, instalaciones de la PUCE-SI



Fuente: Autoría

Anexo 26. Encuesta aplicada en la socialización



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA	08 de mayo del 2019		
EXPOSITOR	Sra. Pamela Alexandra Vilardez Montenegro		
LUGAR	DENTRO PUCESI	☒	FUERA PUCESI

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					X
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?				X	
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					X
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					X
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?			X		
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					X
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					X
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					X
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la Investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					X
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENTIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					

Fuente: Autoría

Anexo 27. Lista de Participantes



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: Sra. Pamela Alexandra Vilañez Montenegro
CARRERA: Ingeniería Agropecuaria
FECHA: Miércoles, 08 de mayo de 2019

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CEDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Florencia Sosa Hernández	1003112961	PUCE-SI	
Josefina Joana Reyes	1004343594	PUCE-SI	
Emerson Recalde	1003538323	PUCE-SI	
Jorge Quesada	0902033400	PUCE-SI	
Cristian Quesada	0302033297	PUCE-SI	
Uriel Gallo	1003089307	PUCE-SI	
Julia Wybicka	100411139.6	PUCE-SI	
Alfredo Cadena	1003739429-9	PUCE-SI	
Rolando Echeverría Sánchez	100404411-2	PUCE-SI	
Jorge Baquer	1003835877	PUCE-SI	
Karla Elizabeth Guzmán Heredia	100378028-3	PUCE-SI	
Frick Vaca Jiménez	100365108-3	PUCE-SI	
Johann Reinaldo Mafía	100323622-9	PUCE-SI	
Alexander Vázquez U.	100378742-4	PUCE-SI	
David Chorro	090183103-8	PUCE-SI	

Fuente: Autoría