

Caracterización de bacterias con potencial de uso en el control biológico de la broca del café,
Hypothenemus hampei Ferrari (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae)

Por
Dainette A. Vázquez Soto

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en
Protección de Cultivos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2013

Aprobado por

Fernando Gallardo Covas, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Ángel L. González Rodríguez, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Zapata Serrano, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Skip J. Van Bloem, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

Jay Omar Soto, MS, MIS, EdD (Candidato)
Representante Estudios Graduados

Fecha

RESUMEN

La broca del café (CBB), *Hypothenemus hampei* Ferrari, es una de las plagas más importantes del cultivo de café debido a que este insecto se alimenta y reproduce dentro del fruto de café. Las bacterias del grupo *Bacillus* son alternativas de control biológico para éste insecto debido a las propiedades insecticidas que poseen. Esta investigación consistió de cinco estudios: (I) Efecto de bacterias del grupo *Bacillus spp.* con potencial de control biológico bajo condiciones *in vitro*, (II) Determinación *in vitro* de la virulencia de las bacterias *B. thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) seleccionadas para el control biológico de la broca, (III) Sobrevivencia de los cultivos bacterianos del tipo *Bacillus* aplicados en árboles de cafeto bajo condiciones de campo, (IV) Presencia de plásmidos en bacterias tipo *Bacillus* antagónica a la broca, y (V) Proteínas presentes en bacterias tipo *Bacillus*. Las bacterias Bt3971, Bt4155, Bp3461 y Bp 4176 indujeron el mayor índice de mortandad a las 72h después de la inoculación con 80%, 40%, 50% y 40% respectivamente ($p=0.05$). A las 96h todas las cepas bacterianas mostraron diferencias significativas con una mortandad de 80% versus el control positivo con 50%. Las cepas de Bp4096 y Bp4185 fueron significativas en la reducción del movimiento del CBB. La virulencia de Bt 3971 fue mayor ($p=0.05$) en las suspensiones de 0.6A y 0.8A, y con Bp 4185 en 0.6A y 1.0A. El periodo de tiempo más corto para causar el 50% de mortandad de la broca tratados con Bt fue a las 48h (55%) y a las 72h (82%) a 0.8A; y para Bp fue a las 72h (55%) a 1.0A y a las 96h (46%) a 0.8A. Se pudo establecer las concentraciones necesarias de Bt y Bp para obtener un efecto significativo en la mortandad y confirmar el potencial de control biológico para la broca del café *in vitro*. Durante los años 2010 y 2011 se determinó la sobrevivencia de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* hasta seis meses después de la inoculación. Los plásmidos detectados en bacterias tipo *Bacillus* resultaron con bandas de ADN $\geq 12,000$ pb en todas las cepas. Las proteínas resultaron con bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda; de acuerdo al peso molecular estas podrían estar relacionadas a las proteínas *cry* informadas como tóxicas a coleópteros.

ABSTRACT

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* Ferrari, is one of the most important pests of the coffee crop because it feeds and reproduces inside the coffee fruit. Bacteria within the *Bacillus* group are an alternative of biological control to this insect because they have insecticide properties. This research consist of five studies: (I) Effect of *Bacillus* group bacteria with biological control potential to the CBB under *in vitro* conditions, (II) Determination of the virulence *in vitro* of *B. thuringiensis* and *B. pumilus* bacteria selected for the biological control of the coffee borer, (III) Survival of bacterial cultures of the *Bacillus* type applied in coffee trees under field conditions, (IV) Presence of plasmids in *Bacillus* type bacteria antagonistic to the coffee borer , (V) Proteins in *Bacillus* type bacteria. The bacteria Bt3971, Bt4155, Bp3461 and Bp4176 induced the highest mortality at 72h after inoculation with 80%, 40%, 50% and 40% respectively ($p=0.05$). At 96h all bacteria strains showed significant mortality of 80% versus the positive control with 50% over the CBB. The strains Bp4096 and Bp4185 reduced the insect movement significantly. The virulence of Bt 3971 was greater at 0.6A and 0.8A and for Bp 4185 were at 0.6A and 1.0A ($p=0.05$). The shorter time to cause 50% mortality in a population of insects treated with Bt was at 48h (55%) and 72h (82%) with 0.8A; and for Bp was at 72h (55%) with 1.0A and at 96h (46%) with 0.8A. The concentrations of Bt and Bp necessary to obtain a significant effect on the insect mortality and confirmation of their potential for biological control of CBB were established. During the years 2010 and 2011 it was confirmed that *B. thuringiensis* and *B. pumilus* are able to survive at least for six months after inoculation. The plasmid detected from the *Bacillus* type bacteria resulted with DNA bands of $\geq 12,000$ pb in all the strains. Proteins showed bands between the molecular weight of 116Kda, 97Kda and 45Kda, which can be related with the cry proteins toxic to coleopteran.

A mi Dios por permitirme estar aquí y cumplir una de mis metas;
A mis padres Juan R. Vázquez y Neida I. Soto, mi hermana Dianette A. Vázquez y su esposo Ángel L. Ortiz
por su apoyo incondicional, por darme la fuerza y confianza de creer en mí;
Y a Diangelis Esthel Ortiz Vázquez porque su llegada traerá la mayor alegría y felicidad en nuestras familias.

¡Te amamos princesita!

Agradecimientos

Primeramente le agradezco a Dios por permitirme llegar aquí en esta etapa de mi vida. A mis padres Neida I. Soto Piñeiro y Juan R. Vázquez Jiménez porque con su amor, dedicación, su enseñanza y su apoyo incondicional me han motivado a seguir adelante, ha crecer como persona y sobretodo valorar lo que obtengo con mucho sacrificio. A mi hermana Dianette A. Vázquez y su esposo Ángel L. Ortiz por apoyarme y ayudarme en todo lo que necesitaba.

Agradezco a la Dra. Mildred Zapata por su ayuda, enseñanza, y consejos que me ha permitido crecer como profesional. Le agradezco por haber creído en mi y brindarme su confianza y el haberme dado la oportunidad de aceptarme como su estudiante graduada.

A los doctores Ángel L. González y Fernando Gallardo por su ayuda, consejos y por aceptar ser parte de mi comité.

A los agrónomos Víctor González y Evelio Hernández por su ayuda en este trabajo que sin ella no habría sido exitosa. A todo el personal de la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas, Puerto Rico. Al personal del Departamento de Cultivos y Ciencias Agro Ambientales.

A la Srta. Verónica Rivera Andújar por ofrecerme su amistad, apoyo y comprensión y ayudarme en toda esta investigación en estos años. A mis compañeros y amigos Carlos A. Bolaños, Alexis Cruz González, Odalíz Faría Medina, Gabriela Estévez y Denisse Rivera por su amistad y ayuda.

Gracias al Proyecto FIDA-3 “Uso de bacterias y desarrollo de tecnologías para la reducción de la broca en los cafetales” y al Departamento de Agricultura de Puerto Rico por el financiamiento de esta investigación.

Gracias a todos los que me ayudaron para que este trabajo pudiera ser completado exitosamente.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I. Efecto de bacterias del grupo <i>Bacillus sp.</i> con potencial de control biológico bajo condiciones <i>in vitro</i>.....	4
Resumen/Abstract.....	5
Introducción.....	6
Materiales y Métodos.....	9
Resultados y Discusión.....	11
Conclusiones.....	27
Literatura citada.....	28
CAPÍTULO II. Determinación <i>in vitro</i> de la virulencia de las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus pumilus</i> seleccionadas para el control biológico de la broca del café.....	30
Resumen/Abstract.....	31
Introducción.....	32
Materiales y Métodos.....	34
Resultados y Discusión.....	36
Conclusiones.....	45
Literatura citada.....	46
CAPITULO III. Supervivencia de los cultivos bacterianos del tipo <i>Bacillus</i> aplicados en árboles de cafeto bajo condiciones de campo.....	48
Resumen/Abstract.....	49
Introducción.....	50
Materiales y Métodos.....	53
Resultados y Discusión.....	57
Conclusiones.....	101
Literatura citada.....	101
CAPITULO IV. Presencia de plásmidos en bacterias tipo <i>Bacillus</i> antagonica a la broca.....	103

Resumen/Abstract.....	104
Introducción.....	105
Materiales y Métodos.....	108
Resultados y Discusión.....	109
Conclusiones.....	115
Literatura citada.....	116
CAPITULO V. Proteínas presentes en bacterias tipo <i>Bacillus</i>.....	118
Resumen/Abstract.....	119
Introducción.....	120
Materiales y Métodos.....	122
Resultados y Discusión.....	124
Conclusiones.....	127
Literatura citada.....	128
RECOMENDACIONES.....	130

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Resumen de ANOVAS realizados en tres ensayos separados para medir efectos de <i>Bacillus</i> en el movimiento y mortandad de la broca.....	12
Cuadro 2.1 Evaluación de la mortalidad provocada en la broca por diferentes concentraciones de <i>B. thuringiensis</i> (Bt) y <i>B. pumilus</i> (Bp) en periodos de 24 a 96h horas.....	37
Cuadro 2.2. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre las concentraciones de <i>B. thuringiensis</i>	38
Cuadro 2.3. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. thuringiensis</i>	38
Cuadro 2.4. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre las concentraciones de <i>B. pumilus</i>	39
Cuadro 2.5. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. pumilus</i>	40
Cuadro 2.6. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. thuringiensis</i> con la concentración bacteriana de 0.6A.....	40
Cuadro 2.7. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. thuringiensis</i> con la concentración bacteriana de 0.8A.....	41
Cuadro 2.8. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. thuringiensis</i> con la concentración de 1.0A.....	42
Cuadro 2.9. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. pumilus</i> con la concentración de 0.6A.....	42
Cuadro 2.10. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. pumilus</i> con la concentración de 0.8A.....	43
Cuadro 2.11. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de <i>B. pumilus</i> con la concentración de 1.0A.....	44
Cuadro 3.1. Fechas de las inoculaciones realizadas por año y el volumen aplicado de cada especie bacteriana.....	54
Cuadro 3.2: Muestras de tejido de la corteza de árboles de cafetos seleccionadas para determinar las población bacteriana presente en los predio.....	57

Cuadro 3.3: Monitoreo 1: Corteza; 2010, marzo 10. Población bacteriana total presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de marzo antes de la primera inoculación.....	58
Cuadro 3.4: Monitoreo 1: Corteza; 2010, marzo 10. Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de marzo antes de la primera inoculación.....	59
Cuadro 3.5: Monitoreo 1: Corteza; 2010, marzo 10. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos en el monitoreo 1 antes de la primera inoculación realizado en el mes de marzo 2010.	59
Cuadro 3.6. Monitoreo 2: Corteza; 2010, abril 21. Población bacteriana total presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de abril después de la primera inoculación.....	60
Cuadro 3.7. Monitoreo 2: Corteza; 2010, abril 21. Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de abril después de la primera inoculación.....	61
Cuadro 3.8: Monitoreo 2: Corteza; 2010, abril 21. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos en el monitoreo 2 después de la primera inoculación realizado en abril, 2010.....	62
Cuadro 3.9: Monitoreo 3: Frutos; 2010, junio 3. Población bacteriana total presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de junio después de la segunda inoculación.....	63
Cuadro 3.10: Monitoreo 3: Frutos; 2010, junio 3. Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de junio después de la segunda inoculación.....	64
Cuadro 3.11: Monitoreo 3: Frutos; 2010, junio 3. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de cafetos en el monitoreo 3 realizado en el mes de junio 2010.....	65
Cuadro 3.12: Monitoreo 4: Frutos; 2010, septiembre 2. Población bacteriana total presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de septiembre después de la segunda inoculación.....	66
Cuadro 3.13: Monitoreo 4: Frutos; 2010, septiembre 2. Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de septiembre después de la segunda inoculación.....	67

Cuadro 3.14: Monitoreo 4: Frutos; 2010, septiembre 2. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de cafetos en el monitoreo 4 realizados en el mes de septiembre 2010.....	68
Cuadro 3.15: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	69
Cuadro 3.16: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	69
Cuadro 3.17: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	70
Cuadro 3.18: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	70
Cuadro 3.19: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	70
Cuadro 3.20: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	71
Cuadro 3.21: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	71
Cuadro 3.22: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	72
Cuadro 3.23: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	72
Cuadro 3.24: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	72
Cuadro 3.25: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	73
Cuadro 3.26: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	73

Cuadro 3.27: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	73
Cuadro 3.28: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	74
Cuadro 3.29: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	74
Cuadro 3.30: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	74
Cuadro 3.31: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	75
Cuadro 3.32: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	75
Cuadro 3.33: Monitoreo 1. Muestras de tejido de la corteza de árboles de cafetos seleccionadas para determinar las población bacteriana presente en los predios.....	76
Cuadro 3.34: Monitoreo 1: tejidos de corteza; 2011, marzo 15. Población bacteriana total presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de marzo antes de la primera inoculación.....	76
Cuadro 3.35: Monitoreo 1: Corteza; 2011, marzo 15). Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos antes de la primera inoculación.....	77
Cuadro 3.36: Monitoreo 1: Corteza; 2011, marzo 15. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos antes de la primera inoculación realizado en el mes de marzo 2011.....	77
Cuadro 3.37: Monitoreo 2: Corteza; 2011, marzo 24 y abril 11. Población bacteriana total presente en tejidos de la corteza de árboles de cafetos entre los meses de marzo-abril después de la primera inoculación.....	79
Cuadro 3.38: Monitoreo 2: Corteza; 2011, marzo 24 y abril 11. Población bacteriana de tipo <i>Bacillus</i> presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos entre los meses de marzo-abril después de la primera inoculación.....	80
Cuadro 3.39: Monitoreo 2: Corteza; 2011, marzo 24 y abril 11. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos realizado después de la primera inoculación entre los meses de marzo-abril.....	80

Cuadro 3.40: Monitoreo 3: Corteza; 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp). Población bacteriana total presente en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de mayo después de la segunda inoculación.....	81
Cuadro 3.41: Monitoreo 3: Corteza; 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp). Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de mayo después de la segunda inoculación.....	82
Cuadro 3.42: Monitoreo 3; Corteza; 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp). Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos realizado después de la segunda inoculación en el mes de mayo 2011.....	83
Cuadro 3.43: Monitoreo 4: Frutos; 2011, junio 20. Población bacteriana total presente en frutos de árboles de cafetos en el mes de junio después de la tercera inoculación.....	84
Cuadro 3.44: Monitoreo 4: Frutos; 2011, junio 20. Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en frutos de árboles de cafetos en el mes de junio después de la tercera inoculación.....	85
Cuadro 3.45: Monitoreo 4: Frutos; 2011, junio 20. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de árboles de cafetos realizado después de la tercera inoculación en el mes de julio 2011.....	86
Cuadro 3.46: Monitoreo 5: Frutos; 2011, septiembre 6. Población bacteriana total presente en frutos de árboles de cafetos en el mes de septiembre después de la tercera inoculación.....	86
Cuadro 3.47: Monitoreo 5: Frutos; 2011, septiembre 6. Población bacteriana tipo <i>Bacillus</i> presentes en frutos de árboles de cafetos en el mes de septiembre después de la tercera inoculación.....	87
Cuadro 3.48: Monitoreo 5: Frutos; 2011, septiembre 6. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo <i>Bacillus</i> : tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de árboles de cafetos realizado después de la tercera inoculación en el mes de septiembre 2011.....	88
Cuadro 3.49: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2011, marzo 24) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	89
Cuadro 3.50: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2011, marzo 24) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	89
Cuadro 3.51: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2011, marzo 24) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	90

Cuadro 3.52: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2011, abril 11) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	90
Cuadro 3.53: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2011, abril 11) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	90
Cuadro 3.54: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 2 (corteza; 2011, abril 11) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	91
Cuadro 3.55: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 4) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	91
Cuadro 3.56: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 4) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	91
Cuadro 3.57: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 4) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	92
Cuadro 3.58: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 11) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	92
Cuadro 3.59: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 11) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	92
Cuadro 3.60: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 11) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	93
Cuadro 3.61: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	93
Cuadro 3.62: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	93
Cuadro 3.63: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	94
Cuadro 3.64: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	94
Cuadro 3.65: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	94

Cuadro 3.66: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	95
Cuadro 3.67: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	95
Cuadro 3.68: Evaluación de las bacterias <i>Bacillus</i> del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	95
Cuadro 3.69: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias <i>Bacillus</i> del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con <i>B. thuringiensis</i>	96
Cuadro 3.70: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	96
Cuadro 3.71: Evaluación de las bacterias tipo <i>Bacillus</i> del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio de Bp.....	96
Cuadro 3.72: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias <i>Bacillus</i> del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con <i>B. pumilus</i>	97
Cuadro 4.1. Descripción de cepas de <i>Bacillus</i> utilizadas para aislamientos de plásmidos.....	108
Cuadro 4.2. Lectura de las concentraciones de ADN plasmídico utilizando el sistema de nanodrop (nanophotometer) con diferentes productos de extracción de plásmidos.....	110
Cuadro 5.1. Descripción de cepas de <i>Bacillus</i> utilizadas para aislamientos de plásmidos.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: a) Suspensión bacteriana estandarizada a 0.8 de absorbancia, b) Suspensión bacteriana dentro del círculo, c) Colocación del insecto en la suspensión bacteriana, d) Insecto donde se removió el inóculo, e) Bloques con 11 repeticiones por tratamiento, f) Bloques dentro del contenedor de cristal cubierto con tela para evitar que se escapen los insectos.....	10
Figura 1.2: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 24 horas de inoculación.....	11
Figura 1.3: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.....	13
Figura 1.4: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.....	13
Figura 1.5: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.....	14
Figura 1.6: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.....	14
Figura 1.7: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.....	15
Figura 1.8: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.....	15
Figura 1.9: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.....	16
Figura 1.10: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.....	16
Figura 1.11: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 24 horas de inoculación.....	17
Figura 1.12: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.....	18

Figura 1.13: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.....18

Figura 1.14: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.....19

Figura 1.15: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.....19

Figura 1.16: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.....20

Figura 1.17: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.....21

Figura 1.18: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.....21

Figura 1.19: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.....22

Figura 1.20: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 24 horas de inoculación.....22

Figura 1.21: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.....23

Figura 1.22: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.....23

Figura 1.23: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.....24

Figura 1.24: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.....24

Figura 1.25: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.....25

Figura 1.26: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.....25

Figura 1.27: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.....	26
Figura 1.28: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.....	26
Figura 2.1: a) Suspensiones bacterianas estandarizada a 0.6A, 0.8A y 1.0A, b) Suspensión bacteriana depositada en el círculo, c) Colocación del insecto en la suspensión bacteriana, d) Insecto tratado donde se removió la suspensión bacteriana, e) Bloques con 11 repeticiones por tratamiento, f) Bloques dentro del contenedor de cristal cubierto con tela.....	35
Figura 2.2: Porcentaje de mortalidad de la broca vs. diferentes concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
Figura 2.3: Porcentaje de mortalidad de la broca vs. tiempo de aplicación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
Figura 2.4: Porcentaje de mortalidad de la broca vs. diferentes concentraciones de <i>Bacillus pumilus</i>	39
Figura 2.5: Porcentaje de mortandad de la broca vs. tiempo de aplicación de <i>Bacillus pumilus</i>	40
Figura 2.6: Mortalidad (%) de la broca inducido por <i>Bacillus thuringiensis</i> con la concentración de 0.6A.....	41
Figura 2.7: Mortalidad (%) de la broca inducido por <i>Bacillus thuringiensis</i> con la concentración de 0.8A.....	41
Figura 2.8: Mortalidad (%) de la broca inducido por <i>Bacillus thuringiensis</i> con la concentración de 1.0A.....	42
Figura 2.9: Mortalidad (%) de la broca inducido por <i>Bacillus pumilus</i> con la concentración de 0.6A.....	43
Figura 2.10: Mortalidad (%) de la broca inducido por <i>Bacillus pumilus</i> con la concentración de 0.8A.....	43
Figura 2.11: Mortalidad (%) de la broca inducido por <i>Bacillus pumilus</i> con la concentración de 1.0A.....	44

Figura 3.1: A y B) Aplicación de las bacterias Bt 3971 y Bp 4185 mediante bomba con CO ₂ en arboles de café en Adjuntas, Puerto Rico.....	56
Figura 3.2: A) Tejidos de corteza en caldo nutritivo de árboles de cafeto, B) Frutos de cafeto en caldo nutritivo, C-D) Crecimiento de colonias de diferente pigmentación, E) Bacteria Gram positiva con esporas.....	56
Figura 3.3: Microscopía de luz de células con morfología tipo bacilo gram positiva y presencia de esporas concéntricas.....	60
Figura 3.4: Células con morfología tipo bacilo gram positiva y presencia de esporas del monitoreo 3 después de la segunda inoculación detectados con microscopía de luz.....	65
Figura 3.5: Precipitación (pulg.) y temperatura (°F) registrada durante el año 2010 en Adjuntas, Puerto Rico.....	69
Figura 3.6: Microscopía de luz de células con morfología tipo bacilo gram positiva y presencia de esporas dentro y fuera de las células.....	78
Figura 3.7: Gráfica de precipitación en la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas, Puerto Rico durante el año 2011.....	88
Figura 3.8: Monitoreo 1 y 2 (Corteza; 2010): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo <i>Bacillus</i> antes (M1) y después de la primera inoculación (M2).....	97
Figura 3.9: Monitoreo 3 y 4 (Frutos; 2010): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo <i>Bacillus</i> después de la segunda inoculación (M3 y M4).....	98
Figura 3.10: Monitoreo 1, 2 y 3 (Corteza; 2011): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo <i>Bacillus</i> antes (M1) y después de la primera (M2) y segunda inoculación (M3).....	99
Figura 3.11: Monitoreo 4 y 5 (Frutos; 2011): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo <i>Bacillus</i> después de la tercera inoculación (M4 y M5).....	100
Figura 4.1: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de Life Technologies (1).....	111
Figura 4.2: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de Life Technologies (2).....	112

Figura 4.3: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de Promega.....113

Figura 4.4: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de IBI.....113

Figura 5.1: SDS-PAGE al 12.5% de las extracciones de proteínas mediante el Kit de B-PER.....125

INTRODUCCIÓN

La producción mundial del café (*Coffea spp.*) es afectada por la presencia de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Scolytidae). Este insecto es considerado una de las plagas más serias en la industria cafetalera. Se origina en África. En América se encuentra desde México hasta Brasil, incluyendo algunos de los países de la Región del Caribe como Cuba, Jamaica, República Dominicana, y Puerto Rico (Barrera, 2007). La plaga se alimenta y reproduce dentro del fruto del café, reduciendo su peso y calidad, y a su vez causando pérdidas de hasta un 50% en la cosecha si no se realizan las prácticas culturales correctas (De la Rosa et al, 2005).

En Puerto Rico, el café es el cultivo agrícola de mayor importancia social, económica y ecológica de la zona montañosa de la isla. La zona cafetalera está localizada en la parte oeste central, incluyendo 21 municipios, siendo el municipio de Adjuntas líder en producción de café (Rullan, 2006). La producción de café para el año 2007-08 fue de 178,000 quintales para un valor de la cosecha de \$40.8 millones (OEADA, 2008).

En el 2007, el Prof. Miguel F. Monroig, especialista del SEA de la Universidad de P.R., descubrió en su finca en San Sebastián la presencia de la broca del café. Se ha sugerido un plan de manejo integrado de la broca del fruto del cafeto, mediante diferentes métodos de control biológico tales como el uso de los parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* Betrem y *Prorops nasuta* Waterston, y el hongo *Beauveria bassiana* (Monroig, 2007; De la Rosa et al., 2005). La broca es un insecto que ataca exclusivamente al fruto de café. La hembra perfora los granos y pone sus huevos que al eclosionar salen larvas que se alimentan del fruto. Este es el estado donde más daño causa (Rodrigo et al., 2009). Los niveles poblacionales de este insecto son tan elevados que si no se aplica alguna práctica de control puede infestar todos los frutos del cafetal.

Recientemente, se han encontrado otros enemigos naturales de la broca del café como protozoarios, hongos y bacterias que podrían tener una aplicación potencial como control biológico (Hernández, 2002). En los protozoarios se encontró el microsporidio *Mattesia spp.* en el intestino de adultos de la broca criados en laboratorio, en Colombia. Los individuos afectados son relativamente inactivos, y su reproducción se reduce o muestran incapacidad para reproducirse (Bustillo, 2002). En los hongos hay 5 especies que infectan el adulto de la broca. El más frecuente es *B. bassiana*. Otra de las especies encontradas que infectan a la broca es *Hirsutella eleutheratorum*. Este hongo se caracteriza por la formación de estromas filamentosos de color marrón emergiendo del cuerpo del insecto, pero su nivel de infección es bajo. *Metarhizium anisopliae*, es otro hongo que ha sido reportado afectando los adultos de *H. hampei*. Las infecciones causadas por *Fusarium oxysporum* se han observado frecuentemente en la broca. El hongo aparece en el cuerpo de la broca como un micelio blanco polvoriento con ligeros tonos rosa o amarillo, sin embargo no causa alta mortalidad bajo condiciones de laboratorio y campo. *Paecilomyces lilacinus* fue aislado de granos de café infestados con *H. hampei* colectados del suelo. Fue encontrado en adultos de la broca de café, que salen de los granos caídos en el suelo (Barrera, 2007; Bustillo, 1999). También se han encontrado infecciones causadas por las bacterias *Bacillus spp.* y *Serratia spp.* Su presencia se caracteriza por un color oscuro en los tegumentos del insecto de la broca y por septicemia (Bustillo, 2002). La bacteria entomopatógena *Bacillus spp.* es uno de los posibles enemigos naturales que se ha estado evaluando como posible control de la broca del café. Este estudio busca caracterizar bacterias del tipo *Bacillus* con potencial biológico contra la broca mediante electroforesis, bioensayos y sobrevivencia bajo condiciones de campo.

OBJETIVOS

1. Evaluar cepas de bacterias para el control de la broca bajo condiciones de laboratorio.
2. Determinar la virulencia de las bacterias seleccionadas para el control de la broca in vitro usando diferentes concentraciones.
3. Establecer la sobrevivencia de los cultivos bacterianos seleccionados de tipo *Bacillus* aplicados en árboles de cafeto bajo condiciones de campo.
4. Aislar plásmidos de bacterias tipo *Bacillus* con potencial letal o antagónico a la broca.
5. Determinar la presencia de proteínas presentes en los cultivos bacterianos seleccionados tipo *Bacillus*.

CAPÍTULO I.

USO DE BACTERIAS DEL GRUPO *BACILLUS SP.* CON POTENCIAL DE CONTROL BIOLÓGICO BAJO CONDICIONES *IN VITRO.*

CAPÍTULO I

USO DE BACTERIAS DEL GRUPO *BACILLUS SP.* CON POTENCIAL DE CONTROL BIOLÓGICO BAJO CONDICIONES *IN VITRO*.

Resumen

El café (*Coffea arabica* L.) es uno de los renglones más importantes para nuestra economía agrícola y social. En la actualidad, el problema principal del café se conoce como broca causada por el insecto *Hypothenemus hampei* Ferrari. La plaga se alimenta y reproduce dentro del fruto, reduciendo su peso y calidad, y a la vez causando pérdidas de hasta un 50% en la cosecha. *Bacillus spp.* representa uno de los posibles enemigos naturales de la broca del café debido a que contiene especies bacterianas con propiedades insecticidas. En este estudio, se utilizaron ocho cepas bacterianas de *Bacillus*: *B. thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) para determinar el efecto biocontrolador sobre la broca del café bajo condiciones *in vitro*. Las variables evaluadas fueron el efecto de las bacterias en la mortandad y movimiento de la broca utilizando la hembra del insecto en su estado adulto. En un diseño de bloques al azar con 11 repeticiones de adultos hembras se utilizó un control (adulto tratado con agua), 8 tratamientos bacterianos: Bp3461, Bt3480, Bt3971, Bp4096, Bt4153, Bt4155, Bp4176, Bp4185 y un adulto sin tratamiento. Los datos fueron tomados a las 24h, 48h, 72h y 96h y ajustados con la fórmula de Abbott (1925). Se estableció que las bacterias Bt3971, Bt4155, Bp3461 y Bp4176 indujeron el mayor índice de mortandad a las 72h después de la inoculación con 80%, 40%, 50% y 40% respectivamente, con diferencias significativas. A las 96h todas las cepas bacterianas mostraron diferencias significativas con una mortandad de 80% versus el control positivo con 50% sobre la población de insectos. Las cepas de Bp4096 y Bp4185 fueron significativas en la reducción del movimiento del insecto. En general, las cepas *B. thuringiensis* se relacionaron a una mayor mortandad, mientras que las de *B. pumilus* tuvieron mayor efecto en el movimiento del insecto. El efecto bacteriano en el movimiento y la mortandad de los insectos es importante ya que representan el posible modo de acción de algunos bio-insecticidas.

Abstract

Coffee (*Coffea arabica* L.) is one of the most important crops in our agricultural economy and society. At present, the main problem affecting this crop is known as the coffee berry borer caused by the insect *Hypothenemus hampei* Ferrari. This pest feeds and reproduces inside the coffee berry reducing its weight and quality, causing losses up to 50%. *Bacillus* spp. represent one of the possible natural enemies of the coffee berry borer because it contain bacterial species with insecticidal properties. In this study, eight bacterial strains of *Bacillus* were used: *B. thuringiensis* (Bt) and *B. pumilus* (Bp) to determine the biocontrol effect in the coffee berry borer under *in vitro* conditions. The variables studied were: the effect of bacteria on mortality and movement using the female of the coffee borer in its adult stage. A randomized block design with 11 replications was used using female adults. Treatments were: control (adult treated with water), 8 bacterial treatments: Bp3461, Bt3480, Bt3971, Bp4096, Bt4153, Bt4155, Bp4176, Bp4185 and untreated adult. Data were taken at 24h, 48h, 72h, 96h and adjusted with the Abbott (1925) formula. It was established that the bacteria Bt3971, Bt4155, Bp3461 and Bp4176 induced the highest mortality at 72h after the inoculation with 80%, 40%, 50% and 40%, respectively with significant differences. At 96h all bacterial strains were detected with significant differences with a mortality of 80% versus the positive control of 50% on insect population. The strains Bp4096 and Bp4185 reduced significantly the insect movement. In general, the strains of *B. thuringiensis* were related with the highest mortality, while *B. pumilus* had more effect in the insect movement. The bacterial effect in the movement and mortality of the insects is important because they represent the potential mode of action of some bioinsecticides.

1.1 Introducción

La broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari es considerada unas de las plagas de mayor importancia económica en el café en Puerto Rico. La plaga se alimenta y reproduce dentro del fruto del café, reduciendo su peso y calidad, provocando pérdidas de hasta un 50% de la cosecha (De la Rosa, 2005). La broca hembra perfora el fruto por la parte de la corona llegando al endospermo donde pone sus huevos. Estos eclosionan a la etapa larval, barrenan el tejido de la cereza haciendo bolsillos de apertura al túnel principal barrenado por la madre. En esta etapa es donde causa más daño al fruto. Luego, la hembra madura sale de la semilla ya fecundada por un macho hermano y se traslada a otro fruto que esté comenzando a madurar (Franqui y Medina; 2003). Este coleóptero ataca de menor a mayor grado, todas las variedades y especies de café de importancia comercial, aunque tiende a presentar mayor preferencia por el café robusta (*Coffea canephora*) que por el café arábica (*Coffea arabica* L.) (Barrera *et al.*, 2008).

Para el control de la broca se han estado utilizando diferentes estrategias, principalmente las prácticas culturales. En las medidas de control cultural se está enfatizando la colecta manual de granos de café tanto del árbol como del suelo. También se recomienda la poda de estos y llevar un registro de las floraciones. Además del uso de trampas para la captura del insecto. En el control químico se utilizan el Endosulfan y Clorpirifos, solo cuando la plaga está fuera de control y los otros métodos han fallado (Monroig, 2007). En el control biológico tradicional recomiendan el uso de insectos parasitoides como el *Cephalonomia stephanoderis* (de Costa de Marfil, Togo), *Heterospilus coffeicola* (de Camerún, Zaire, Kenia, Tanzania, Uganda), *Prorops nasuta* (de Camerún, Costa de Marfil, Zaire, Kenia, Tanzania, Togo, Uganda) (Barrera, 2007). La broca además puede ser parasitada por los hongos entomopatógenos como el *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* siempre y cuando no haya taladrado profundo en el fruto (Gallardo *et al.*, 2009). Otra alternativa de control biológico que se ha encontrado infestando a la broca del café son las bacterias del género *Bacillus sp.* Dentro de este grupo se encuentra *Bacillus thuringiensis* (Bustillo *et al.*, 2002).

Bacillus thuringiensis (Bt) pertenece a la familia Bacillaceae. Es un género de bacterias con forma de bastón, gram positivo con presencia de esporas y aerobia. Las endoesporas son de forma elipsoidales y se encuentran en la parte central de la célula. Estas endoesporas de resistencia pueden permanecer activas por largos periodos de tiempo. Además de las endoesporas, las células de la bacteria forman un cuerpo para-esporal o proteínas de cristal. Los cristales de Bt tienen diversas formas durante la esporulación y son de naturaleza proteica (De la Rosa *et al.*, 2005). Bt tiene la capacidad de sintetizar una cantidad de proteínas tóxicas como la δ -endotoxina denominada como *Cry* y *Cyt*. Estas proteínas resultan tóxicas al ser ingeridas por insectos susceptibles, en los que se incluyen importantes plagas agrícolas. Las toxinas forman un complejo spora-cristal que posee propiedades insecticidas efectivos para el control de Lepidópteros (*Spodoptera frugiperda*), Dípteros (*Neobellieria bullata*) y Coleópteros (*Anthonomus grandis*) (Baró *et al.*, 2009). Al ingerirse el cristal, la proteína *cry* se disuelve en el mesenterón del insecto creando poros en la membrana intestinal, lo que conlleva a que este cese la ingesta y eventualmente su muerte por septicemia. La identificación de una variante de Bt que controle la broca sería ideal ya que las proteínas *Cry* representan una forma de control sostenible; puesto que no afectan a los insectos benéficos como los depredadores y parasitoides (Hernández, 2002).

Por otro lado, *Bacillus pumilus* (Bp) al igual que *Bacillus thuringiensis* es una bacteria del tipo bacilo formadora de esporas del tipo elipsoidal localizada en la parte central de la célula, mayormente se encuentra en el suelo. *Bacillus pumilus* es una bacteria con actividad anti-fúngica solo con ciertos patógenos (Sayeed y Siddiqui, 2006). Esta se caracteriza por la producción de fungicidas tales como bacilomicin D y fengicin (Ramarathnam *et al.*, 2007). Esto hace que su género y sus habilidades sintetizadoras los hagan perfectos especímenes para experimentos en la investigación de posibles bio-controladores fitopatogénicos. En el 2010, Molina *et al.*, a través de un estudio demostraron la actividad tóxica de Bp en adultos y larvas de *Ceratitis capitata*, donde determinaron que la toxicidad de la bacteria está relacionada al proceso de esporulación y a las bajas temperaturas. Por lo que, ambas especies de *Bacillus* tienen potencial como posibles bio-controladores entomopatógenas. En el 2009, Vázquez y Zapata, a través de un estudio determinó el efecto de distintas cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones *in vitro*, donde muestran el potencial de dos especies: *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *Bacillus pumilus* (Bp) para el control de la broca.

El objetivo de este estudios es evaluar el efecto en el movimiento y la mortandad de distintas cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. para el control de la broca del café bajo condiciones *in vitro*.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Colección de insectos:

Se establecieron trampas para brocas en una finca en Las Marías, P.R. Se colectaron hembras de la broca del café de entre 24 a 48 horas y se llevaron al laboratorio. Utilizando un pincel, las hembras se colocaron en viales de cristal en grupo de 11 insectos.

1.2.2 Bioensayos:

Para los bioensayos se utilizó una colección de bacterias nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) perteneciente a la Dra. Mildred Zapata, del Depto. de Cultivos y Ciencias Agro-ambientales UPR-RUM. Las cepas que se evaluaron para determinar el potencial controlador de la broca fueron las siguientes: Bp 3461, Bt 3480, Bt 3971, Bp 4096, Bt 4153, Bt 4155, Bp 4176, y Bp 4185. Estas se incubaron a 28°C en medio de caldo nutritivo (NB) por 24 horas en un agitador marca L.E.D. Orbit a 150rpm. La suspensión bacteriana fue estandarizada a 0.8 de absorbancia a 590nm (Figura: 1.1a). Luego, se depositó 20µl de la suspensión bacteriana en un círculo dentro de cada placa petri (Figura: 1.1b). Utilizando el pincel se colocó el insecto en la suspensión bacteriana de la placa por 15 minutos (Figura: 1.1c). Después se extrajo el inóculo dejando solo el insecto inoculado en la placa (Figura: 1.1d). Luego, estas fueron colocadas en grupos de 11 placas (1insecto inoculado/placa) en envases de cristal y se cubrieron con tela (Figura: 1.1e). Se utilizó un diseño de bloques completo al azar (DBCA) con dos controles: uno con agua esterilizada y un adulto sin tratamiento, además de los 8 tratamientos bacterianos para un total de 10 tratamientos por bloque. Se colocaron en los envases de cristal y cubiertos con tela. Se evaluó la mortandad y el movimiento del insecto cada 24 horas después de la inoculación. En la evaluación de la mortandad se utilizaron los siguientes valores: 1 para insectos muertos y 2 para insectos vivos y corregidos con la formula de Abbott (1925). La evaluación del movimiento de los insectos se midió en cm.

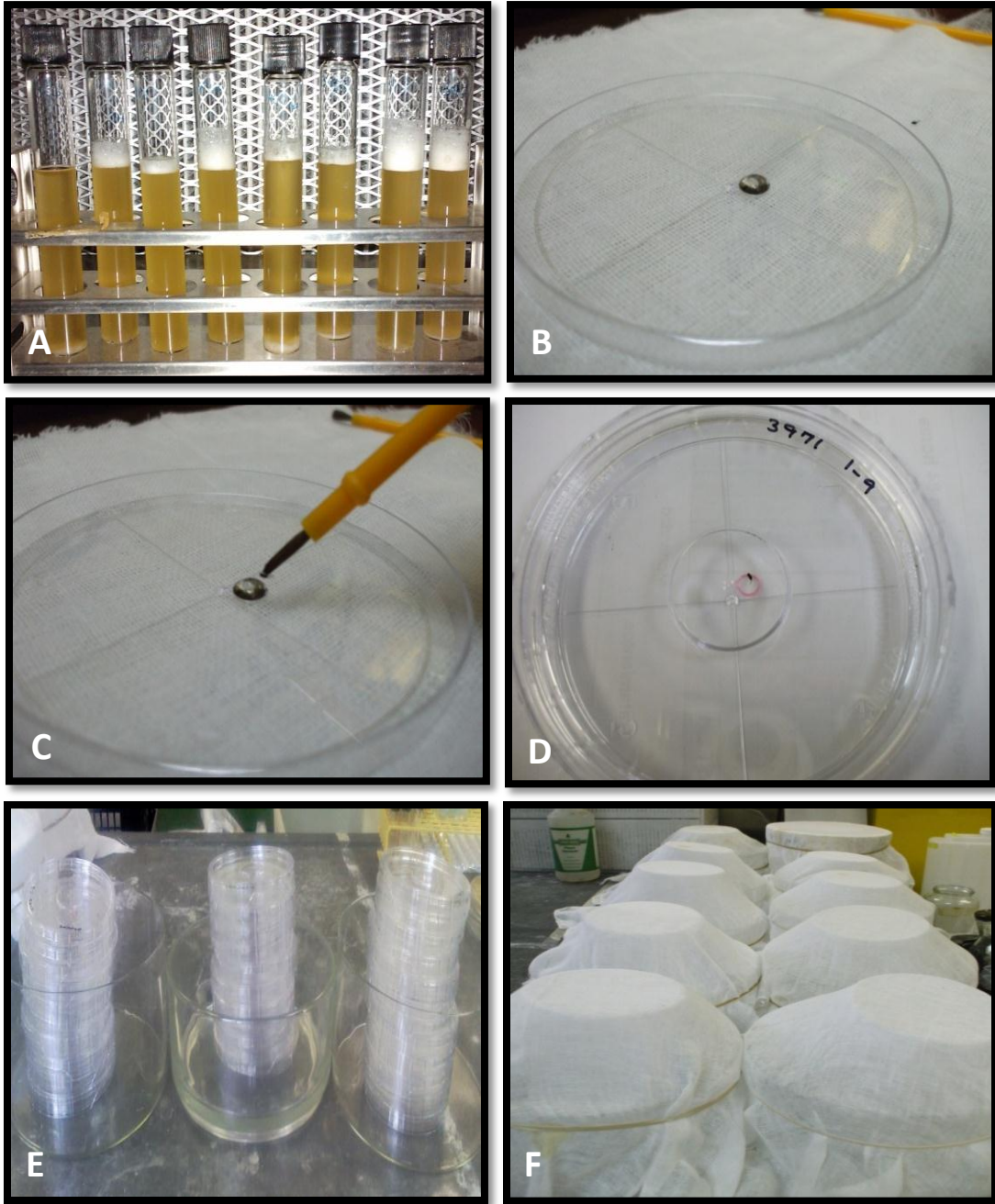


Figura 1.1: a) Suspensión bacteriana estandarizada a 0.8 de absorbancia, b) Suspensión bacteriana dentro del círculo, c) Colocación del insecto en la suspensión bacteriana, d) Insecto donde se removió el inóculo, e) Bloques con 11 repeticiones por tratamiento, f) Bloques dentro del contenedor de cristal cubierto con tela para evitar que se escapen los insectos.

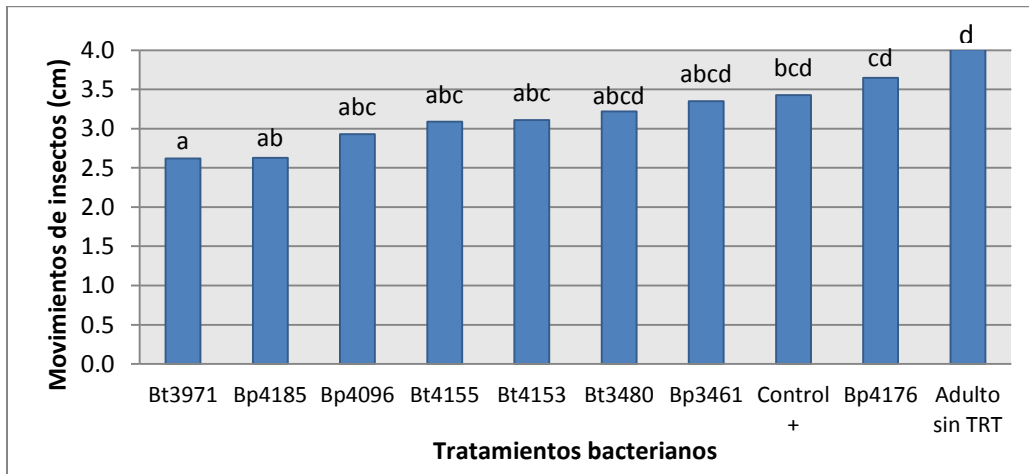
1.3 Resultados y Discusión:

En este estudio se realizaron 3 bioensayos para determinar el efecto potencial de control de las bacterias *B. thuringiensis* y *B. pumilus* en la broca del café. Se evaluaron los efectos de movimiento y mortandad a diferentes periodos de tiempo de las bacterias mediante la inoculación de insectos.

Ensayo 1.

Movimiento: 24horas. A las 24h hubo diferencias estadísticas significativas en el desplazamiento del insecto (Cuadro1.1); se observó diferencias matemáticas en el tratamiento Bt 3971 y Bp 4185 mostrado una reducción en el movimiento al compararse con el adulto sin tratamiento (Figura 1.2).

Figura 1.2: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 24 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Mortandad: 24horas. A las 24h no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos bacterianos. La mortalidad de los insectos se encontraba entre 0 a 9%.

Cuadro 1.1. Resumen de ANOVAS realizados en tres ensayos separados para medir efectos de *Bacillus* en el movimiento y mortandad de la broca.

Análisis estadístico de ANOVA										
Efectos evaluados	24h	DMS ³	48h	DMS	72h	DMS	96h	DMS	120h	DMS
Ensayo 1										
Movimiento	S ¹	Bt 3971,	S	Bp 4096	S	Bp 4096	S	Bp 4096	S	Bp 4096
Mortandad	NS ²	-	NS	-	S	Bp 4176, Bp 4096	NS	-	S	Bt 4155, Bp 4176
Ensayo 2										
Movimiento	NS	-	NS	-	S	Bp 4185	S	Bp 4185, Bp 4096	S	Bp 4185
Mortandad	NS	-	S	Bt 3971	S	Bt 3971, Bp 3461 Bt 4155	S	Bt 3971, Bp 3461 Bt 4155	NS	-
Ensayo 3										
Movimiento	NS	-	NS	-	S	Bt 3971, Bt 3480, Bp 4176, Bt 4155	S	Bt 3971, Bt 4155	NS	-
Mortandad	NS	-	NS	-	NS	-	S	Todas vs. Control ⁴	S	Todas vs. control

¹ S=Diferencias significativas (P<0.5).

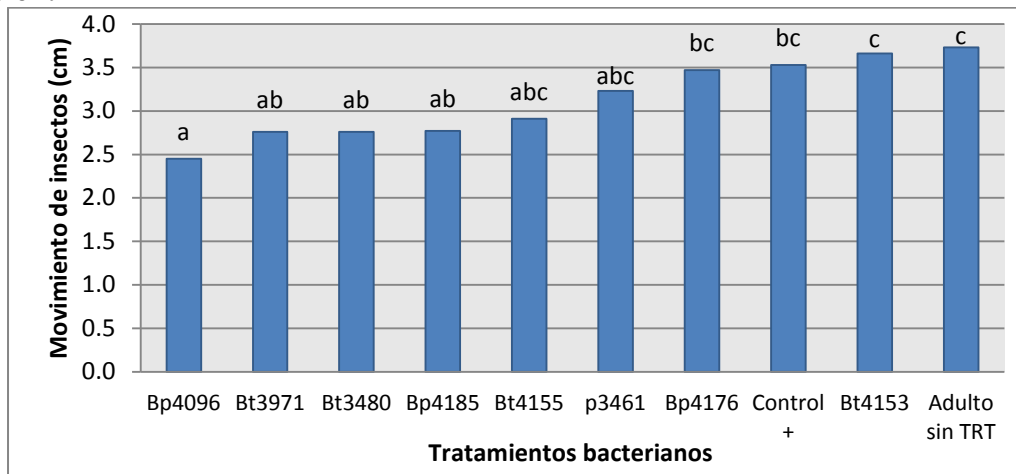
² NS= No significativo (P>0.5).

³ Diferencia mínima significativas (DMS)/ con relación al tratamiento positivo.

⁴ Todos los tratamientos: Bp3461, Bt3480, Bt3971, Bp4096, Bt4153, Bt4155, Bp4176, Bp4185, Adulto sin tratamiento vs. el control positivo.

Movimiento: 48 horas. A las 48h hubo diferencias estadísticas significativas (P<0.5) (Cuadro 1.1) entre los tratamientos bacterianos con la cepa Bp 4096. Esta mostró una reducción en el desplazamiento del insecto versus los otros tratamientos (Figura 1.3).

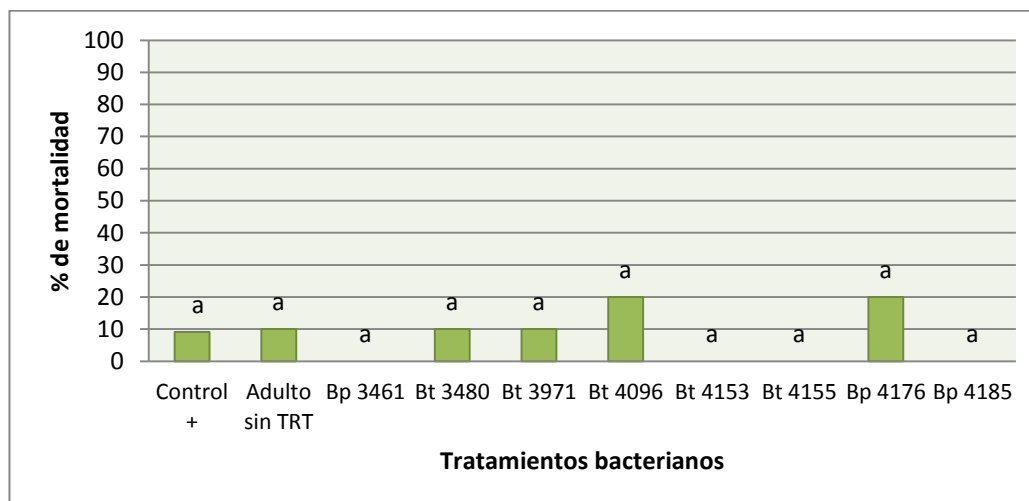
Figura 1.3: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 48horas. No hubo diferencias estadísticas significativas a las 48h (Cuadro 1.1). La mortalidad se encontraba entre 9 a 20% (Figura 1.4).

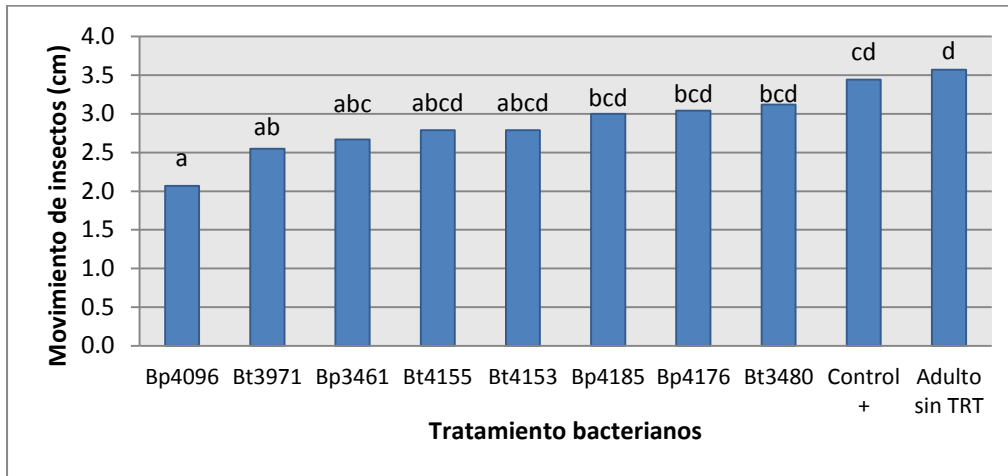
Figura 1.4: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 72horas. Hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) entre los tratamientos bacterianos a las 72h después de la inoculación (Cuadro 1.1). La cepa Bp4096 mostró una reducción en el movimiento del insecto versus el control positivo (Figura 1.5).

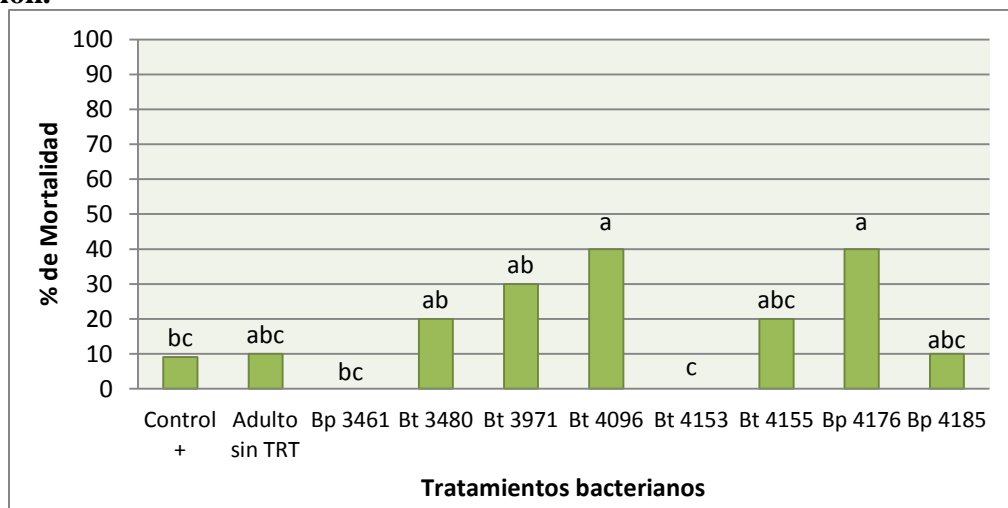
Figura 1.5: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortalidad: 72horas. Hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) a las 72h después de la inoculación (Cuadro 1.1); se observó diferencias significativas en las cepas Bp 4176 y Bp 4096 con 40% de mortandad (Figura 1.6).

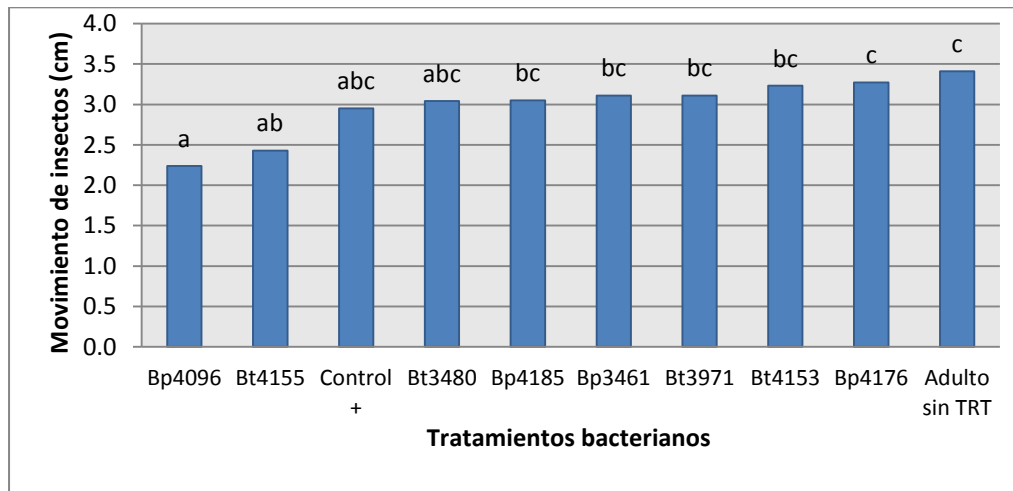
Figura 1.6: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 96horas. A las 96h hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Cuadro 1.1). La cepa Bp 4096 causó una reducción significativa en el movimiento del insecto (Figura 1.7).

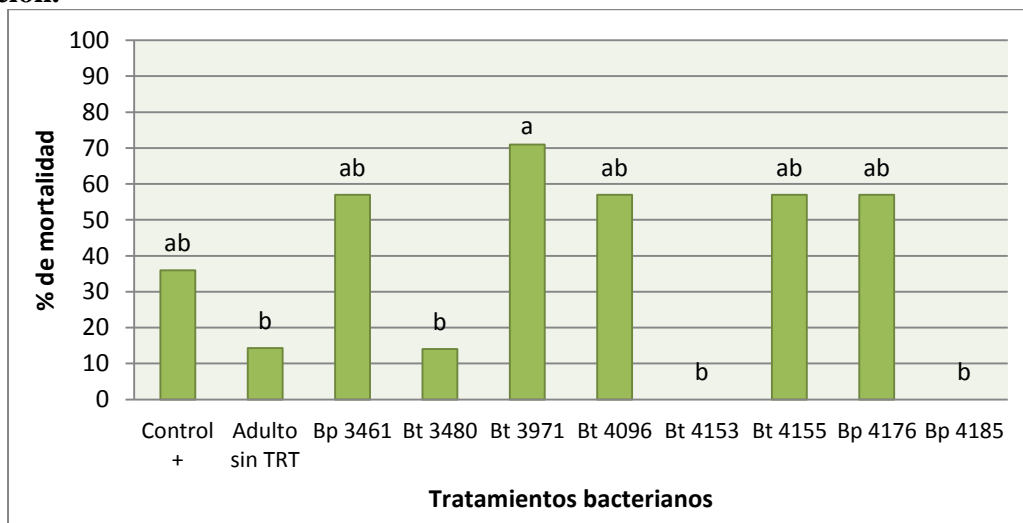
Figura 1.7: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 96horas. A las 96h no hubo diferencias estadísticas significativas (Cuadro 1.1) aunque se observó con el tratamiento Bt 3971 una mortandad no significativa de 71% (Figura 1.8).

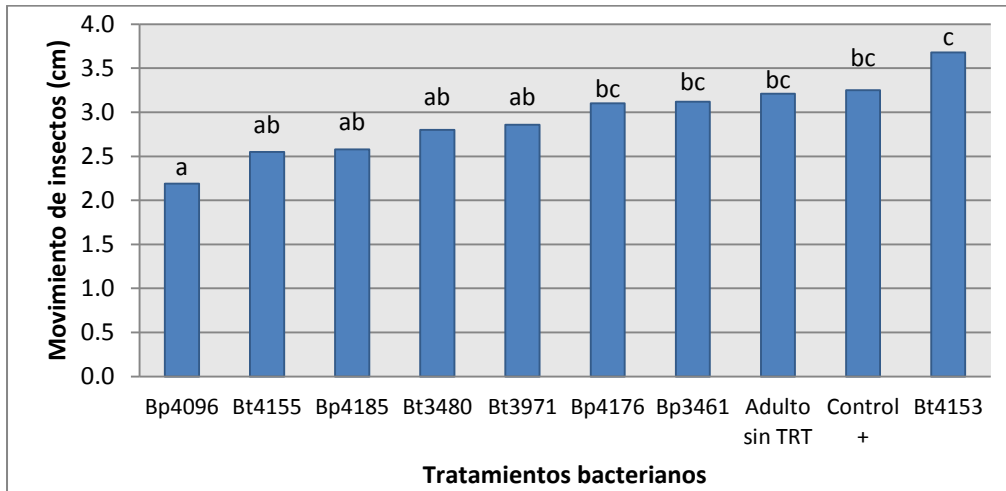
Figura 1.8: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 120horas. A las 120h hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) entre los tratamientos (Cuadro 1.1). Se observó una reducción significativa en el movimiento del insecto con el tratamiento Bp 4096 (Figura 1.9).

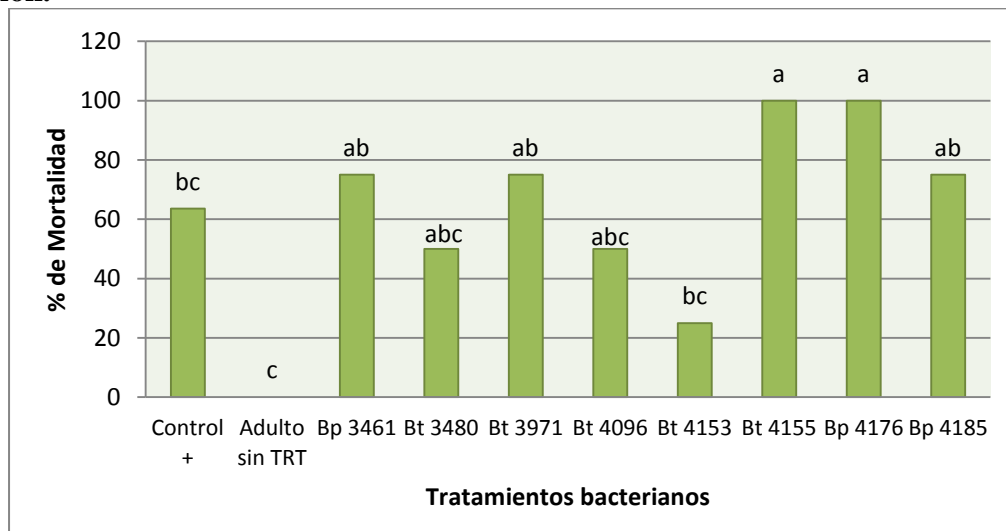
Figura 1.9: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 120horas. A las 120h hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) entre los diferentes tratamientos bacterianos (Cuadro 1.1). Los tratamientos Bt 4155 y Bt 4176 mostraron 100% de mortandad. Mientras que las cepas Bt 3971, Bp 3461 y Bp 4185 tenían una mortandad de 75% versus el control + con 64% (Figura 1.10).

Figura 1.10: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.

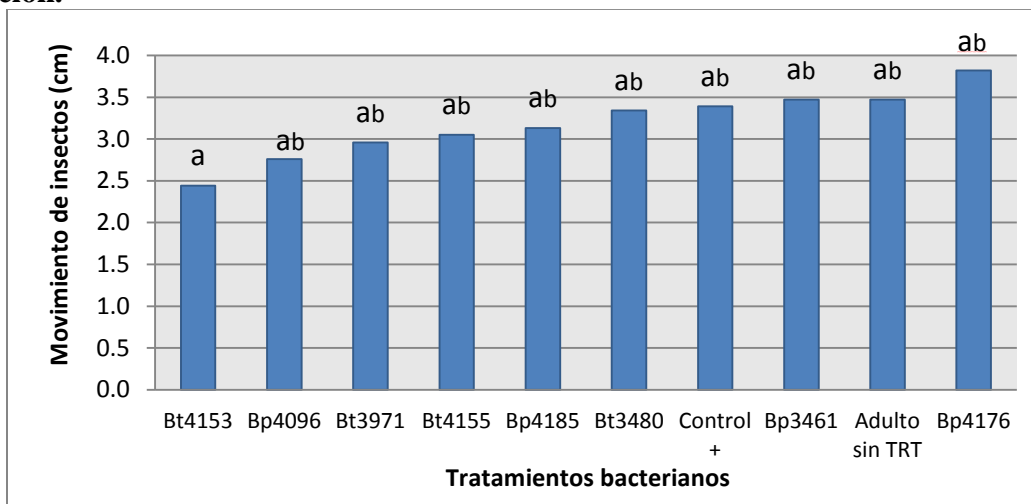


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Ensayo 2.

Movimiento: 24horas. A las 24 horas después de la inoculación no hubo diferencias estadísticas significativas en el movimiento del insecto (Cuadro 1.1); aunque el tratamiento Bt 4153 resultó con una reducción no significativa en el desplazamiento del insecto a las 24 horas de inoculación contrario al tratamiento Bp 4176 que resultó con un aumento en el desplazamiento del insecto (Figura 1.11).

Figura 1.11: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 24 horas de inoculación.

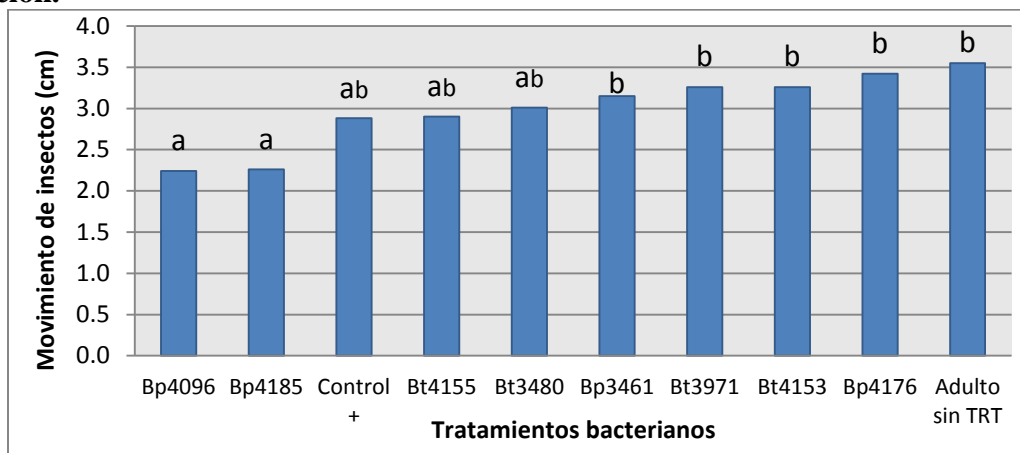


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 24horas. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 1.1).

Movimiento: 48horas. A las 48 horas no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el movimiento del insecto (Cuadro 1.1). Se observó una reducción no significativa en el movimiento con los tratamientos de *B. pumilus*: 4096 y 4185 (Figura 1.12) versus el control positivo. Por otro lado, se observó un aumento en el movimiento con los tratamientos de Bt 3971 y Bt 4153, además de Bp 4176 y Bp 3461 y el Adulto sin tratamiento (Figura 1.12).

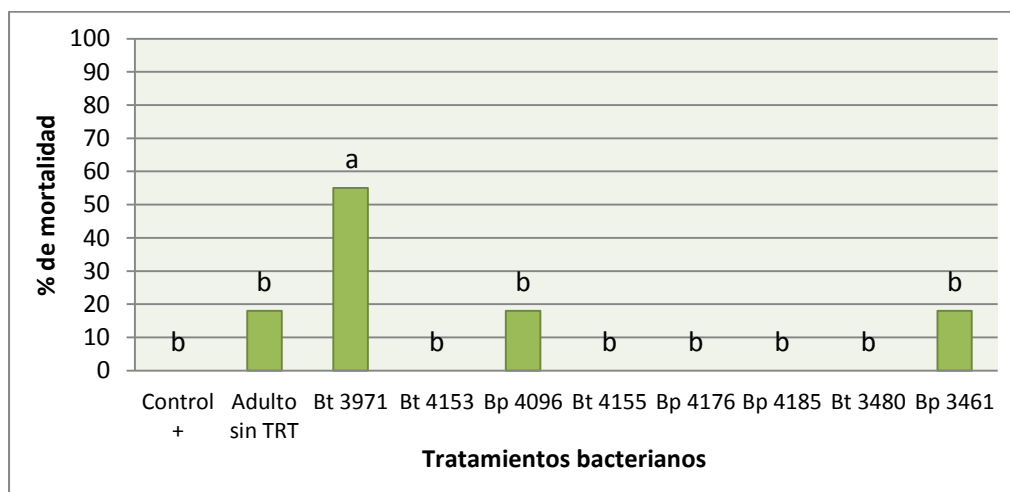
Figura 1.12: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 48horas. Hubo diferencias significativas en el análisis de ANOVA ($P < 0.05$) a las 48 horas después la inoculación (Cuadro 1.1). El tratamiento bacteriano 3971 correspondiente a *B. thuringiensis* causó una mortandad de 55%. Mientras que los otros tratamientos causaron una mortandad de 0% a 18 % (Figura 1.13).

Figura 1.13: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.

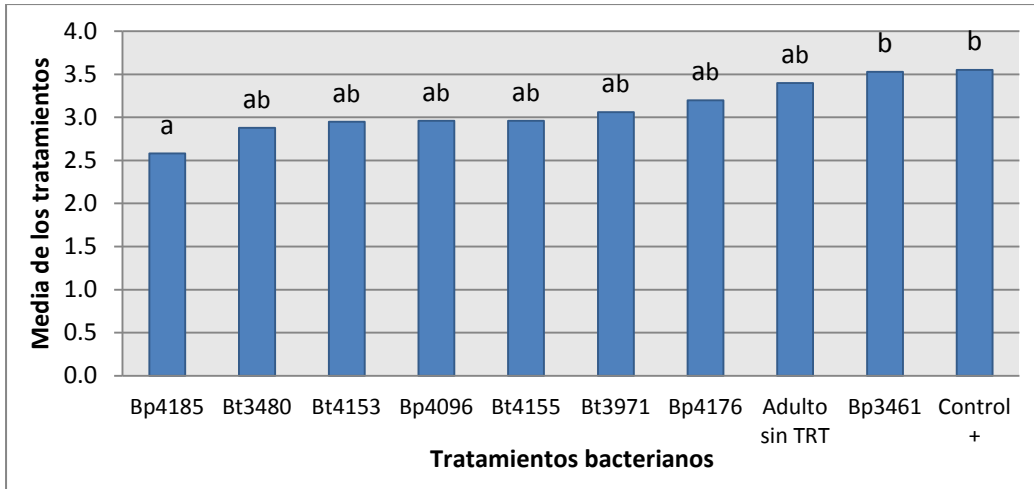


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 72horas. A las 72horas se detectaron diferencias mínimas significativas entre los tratamientos Bp 4185 con una reducción en el movimiento de los insectos versus Bp 3461 y el control+ (con agua) con un aumento en el movimiento de los insectos (Figura 1.14). Esta reducción en el movimiento del insecto puede estar relacionada al modo de acción de algunos

bio-insecticidas ya que afectan el sistema nervioso del insecto causando parálisis y muerte a éste (Cerstiaens *et al.*, 2001).

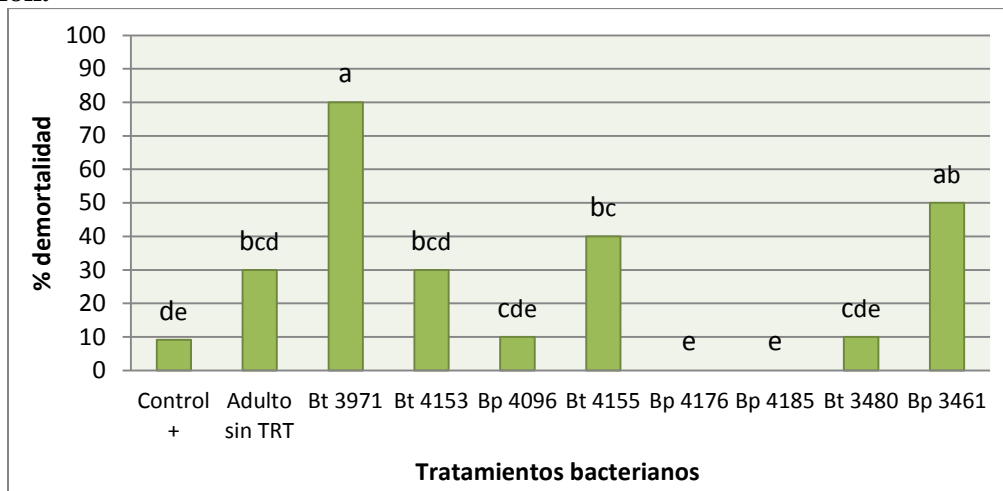
Figura 1.14: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 72horas. Mostró diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 1.1). El tratamiento Bt 3971 fue significativamente más alto al compararse con los demás tratamientos (Figura 1.15). Este indujo un índice de mortalidad de 80% comparada con el Control+ (con agua), el cual mostraba una mortalidad de 9.1%. Por otro lado, Bp 3461 indujo una mortalidad de 50% y Bt 4155 con 40%.

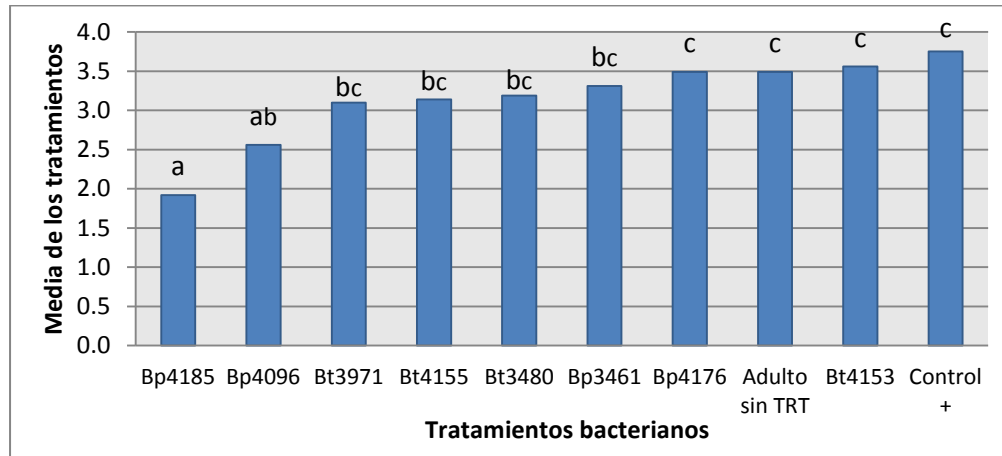
Figura 1.15: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 96horas. En el análisis de ANOVA de las 96horas después de la inoculación hubo diferencias significativas ($P<0.05$) (Cuadro 1.1). Se observó una reducción significativa en el movimiento del insecto en el tratamiento de Bp 4185 y Bp 4096 (Figura 1.16). Mientras que Bp4176, Bt 4153, el control + y adulto sin tratamiento, se obtuvo un aumento no significativo en el movimiento del insecto (Figura 1.16).

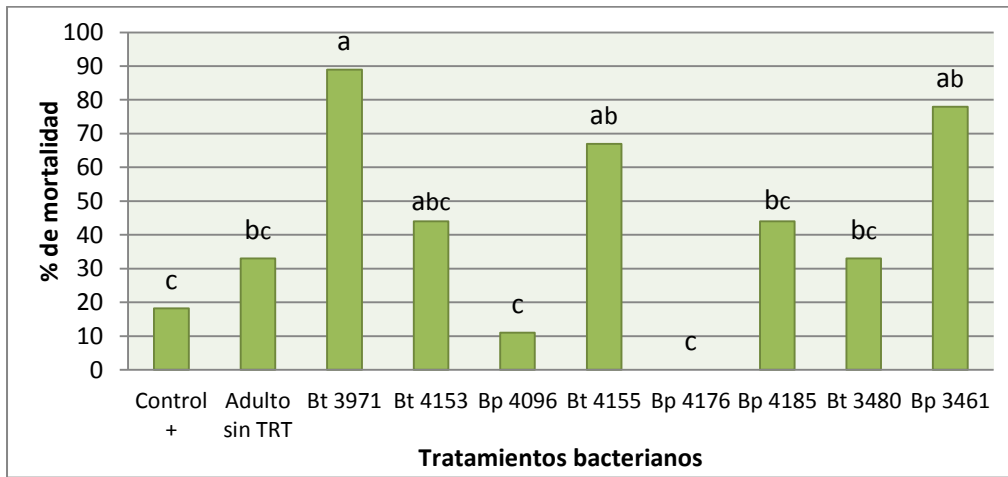
Figura 1.16: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 96horas. En el análisis de ANOVA para mortandad mostró diferencias significativas ($P<0.05$) a las 96 horas (Cuadro 1.1). Este muestra una diferencia significativa con Bt 3971 con 89% de mortandad sobre los insectos. Mientras que Bp 3461, Bt 4155 y Bp 4185 muestran una mortandad de 78%, 67% y 44%, respectivamente versus el control+ (con agua) con 18% (Figura 1.17).

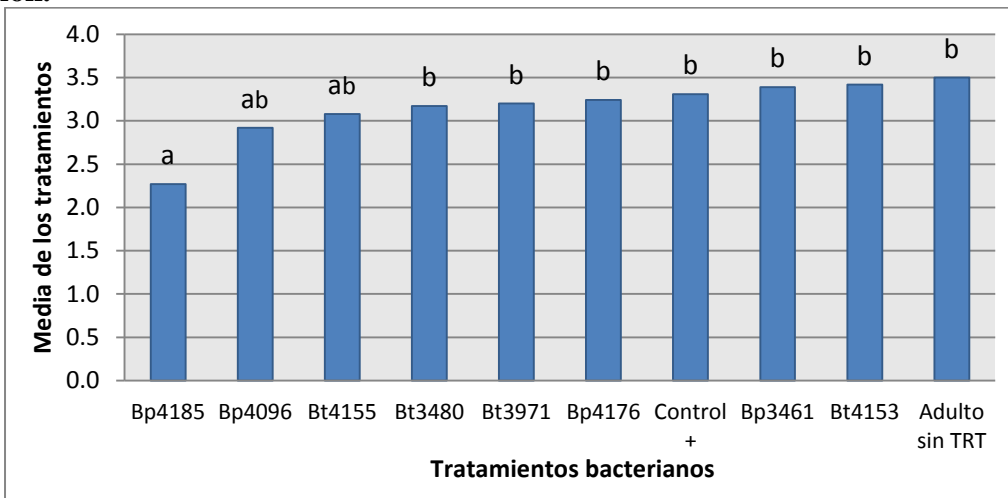
Figura 1.17: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 120horas. A las 120h hubo diferencias significativas de los tratamientos sobre el movimiento de los insectos (Cuadro 1.1). Bp4185 redujo el movimiento de la broca, mientras que los otros tratamientos no fueron tan efectivos en disminuir el movimiento de los insectos (Figura 1.18).

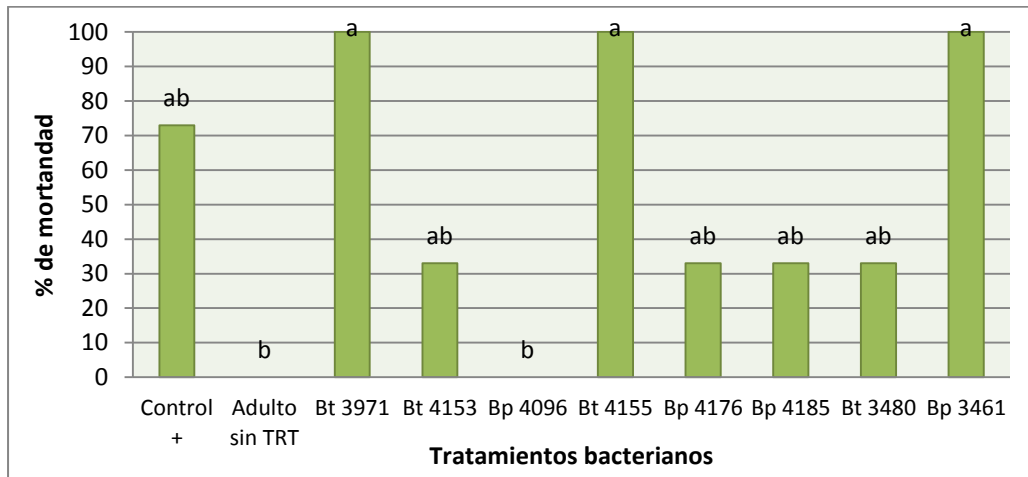
Figura 1.18: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 120horas. Hubo diferencias mínimas significativas entre los tratamientos (Cuadro 1.1). Los tratamientos Bt 3971 y Bt 4155, Bp 3461 indujeron mayor mortandad, mientras que Bp 4185 indujo menor mortandad al igual que los controles + (Con agua) y adulto sin tratamiento (Figura 1.19).

Figura 1.19: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.

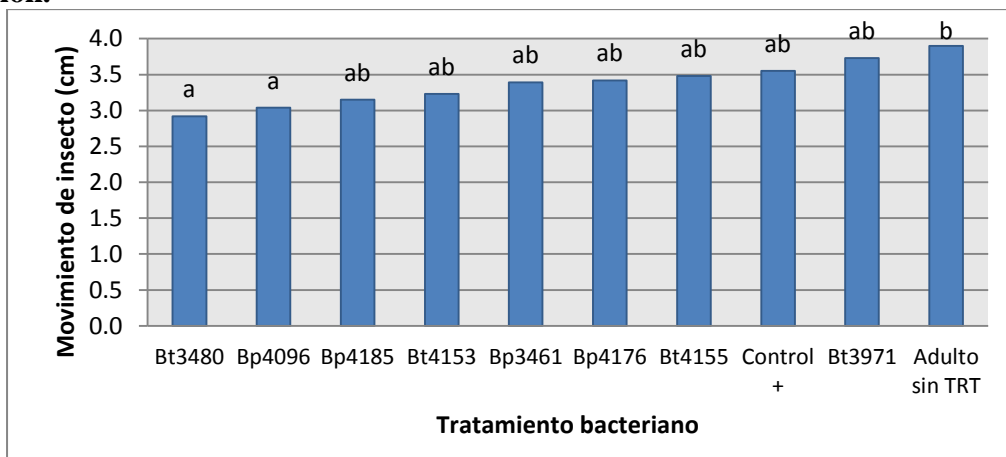


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Ensayo 3.

Movimiento: 24horas. A las 24h no hubo diferencias estadísticas significativas (Cuadro 1.1). Sin embargo, se detectaron diferencias en el movimiento del insecto en los tratamientos Bt 3480 y Bp 4096 versus el adulto sin tratamiento. Ambos tratamiento mostraban una reducción no significativa en el desplazamiento del insecto (Figura 1.20).

Figura 1.20: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 24 horas de inoculación.

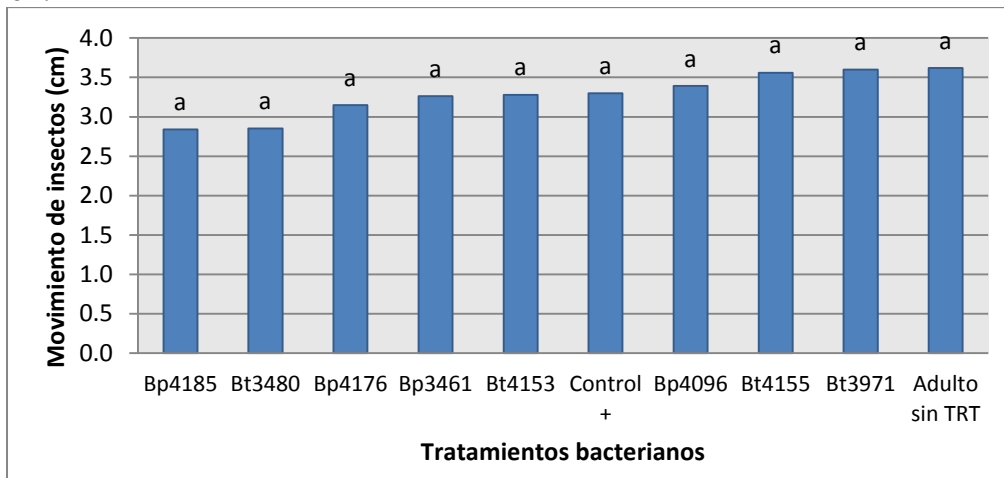


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 24horas. A las 24h no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 1.1). La mortalidad observada en los tratamientos fue de 0 a 9%.

Movimiento: 48horas. No hubo diferencias estadísticas significativas a las 48h después de la inoculación (Cuadro 1.1) (Figura 1.21).

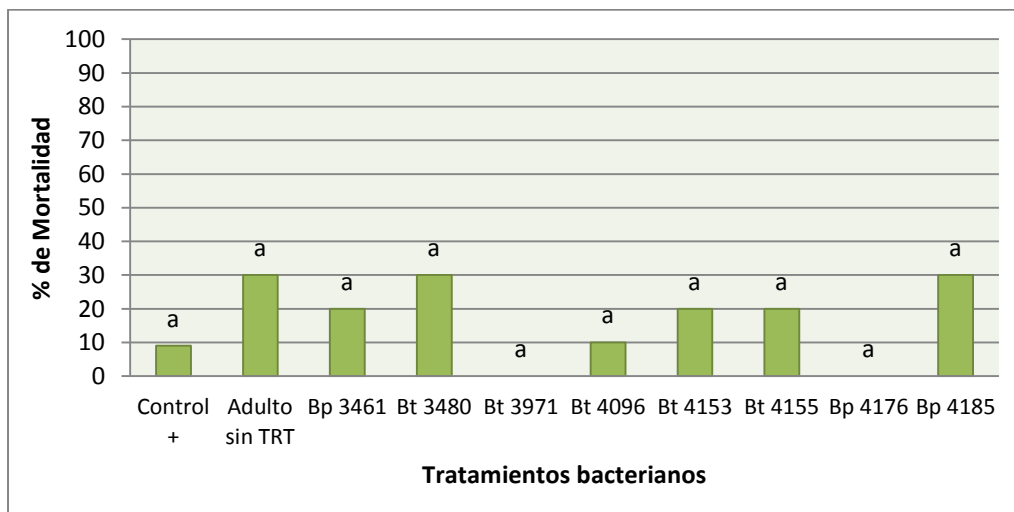
Figura 1.21: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 48horas. A las 48h no hubo diferencias estadísticas significativas (Cuadro 1.1). La mortandad observada fue de 9 a 30% (Figura 1.22).

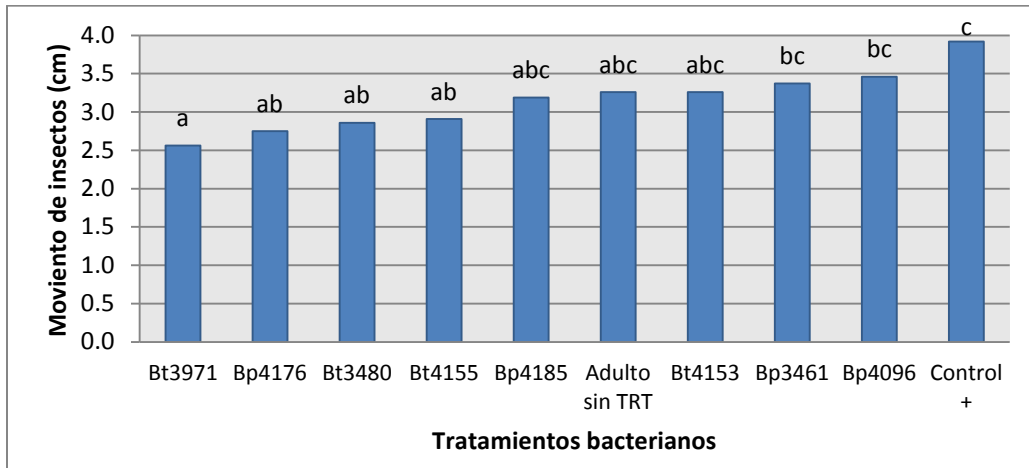
Figura 1.22: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 48 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 72horas. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos bacterianos y el movimiento ($P < 0.5$) (Cuadro 1.1). Las cepas Bt3971, Bp4176, Bt3480 y Bt4155 mostraron una reducción en el movimiento del insecto versus el control positivo (Figura 1.23).

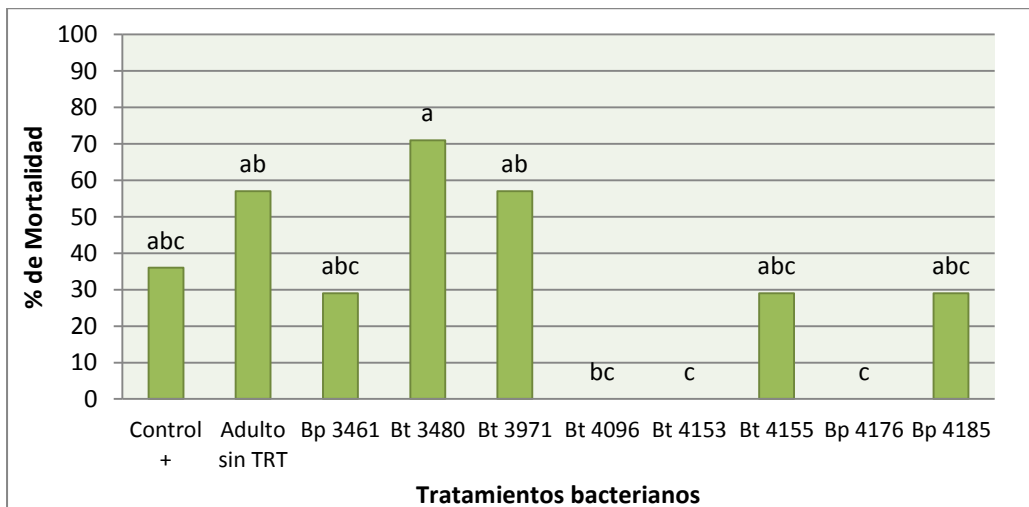
Figura 1.23: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 72horas. Se detectaron diferencias no significativas con el tratamiento Bt 3480 causando una mortandad de 71% (Figura 1.24). Los tratamientos Bt 3971 y el adulto sin tratamiento mostraban una mortandad de 57% versus el control + con 36% (Figura 1.24).

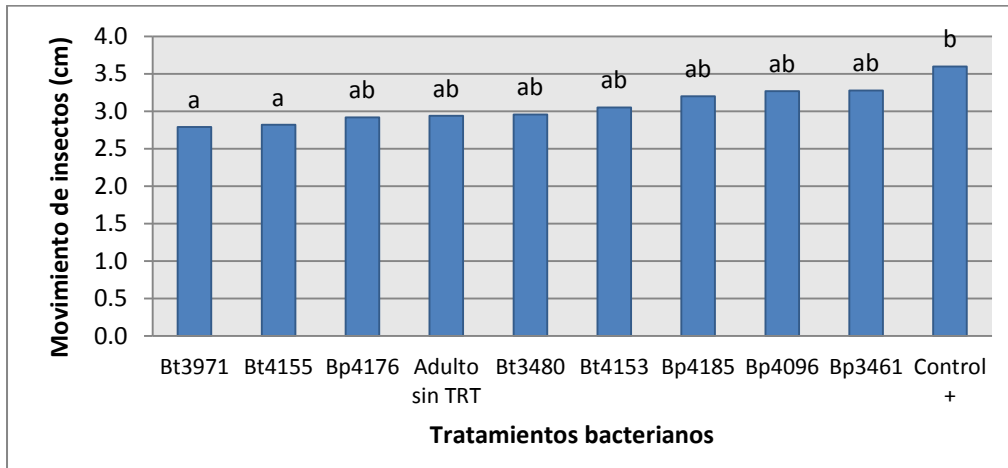
Figura 1.24: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 72 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 96horas. Bt 3971 y Bt 4155 mostraron una reducción significativa en el movimiento del insecto (Figura 1.25).

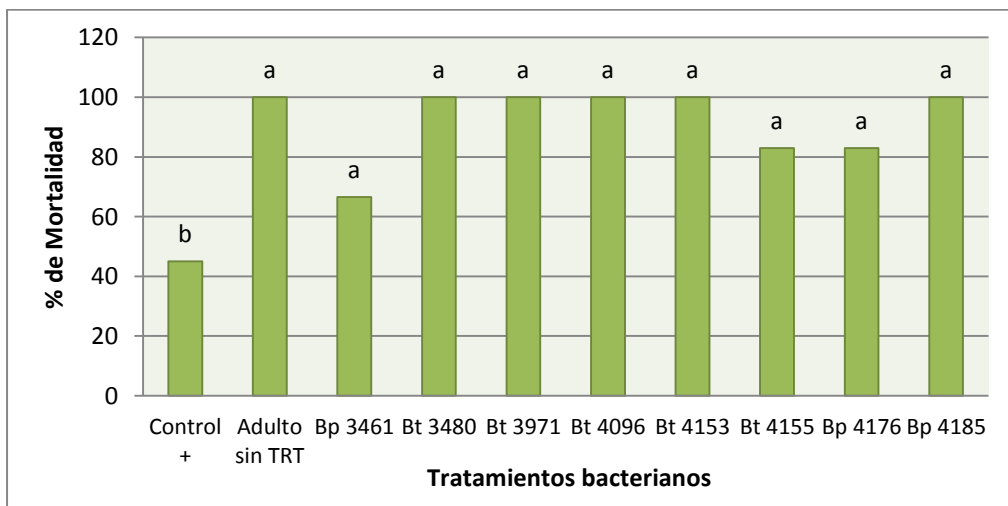
Figura 1.25: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 96horas. Hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) a las 96h en los tratamientos bacterianos (Cuadro 1.1). Los tratamientos Bt 4153, Bp 4185, Adulto sin tratamiento, Bp 4096, Bt 3971y Bt 3480 mostraron una mortandad de 100%. Mientras que Bp 4176, Bt 4155 y Bp3461 mostraron una mortandad de 80% versus el Control + con 55% (Figura 1.26).

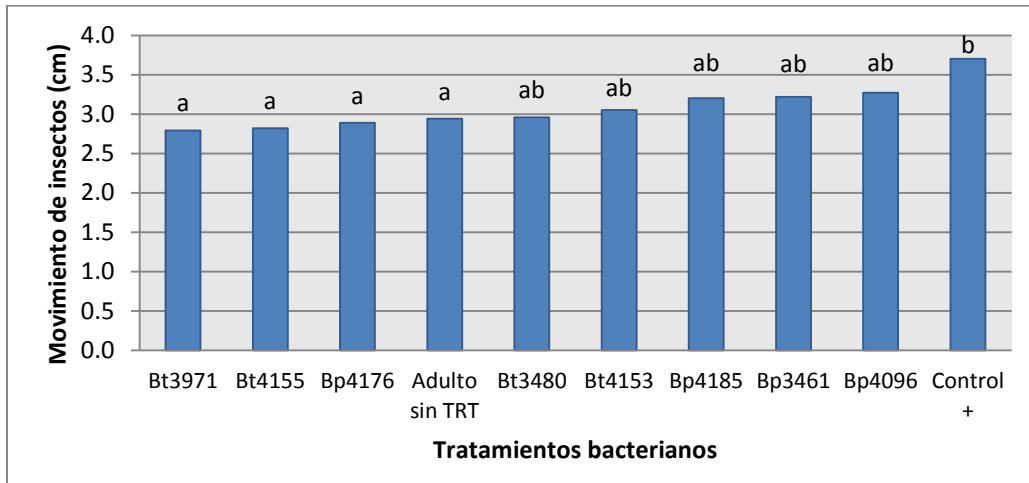
Figura 1.26: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 96 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Movimiento: 120horas. Se detectó una reducción en el movimiento del insecto con los tratamientos Bt 3971, Bt 4155, Bp 4176 y el adulto sin tratamiento (Figura 1.27).

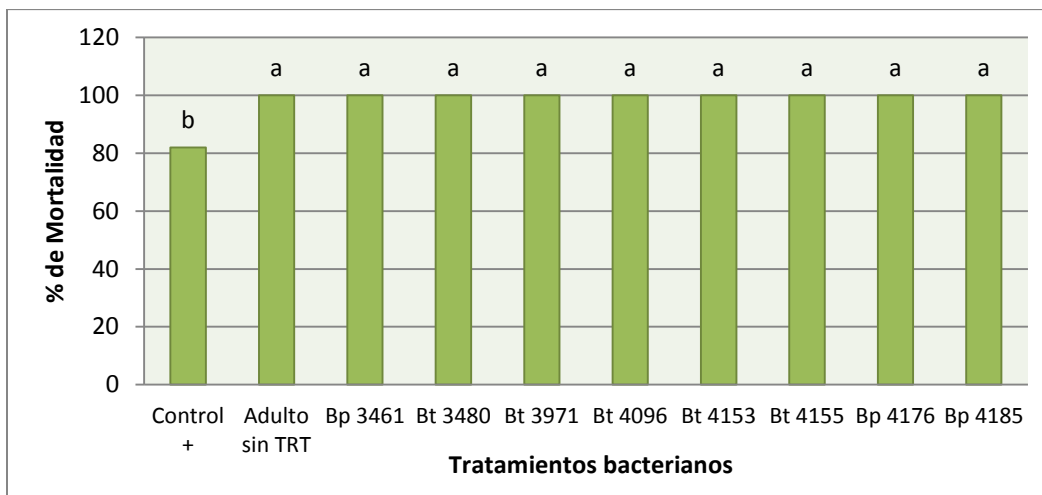
Figura 1.27: Efecto en el movimiento del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mortandad: 120horas. A las 120h hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) en los tratamientos bacterianos (Cuadro 1.1). Los tratamientos bacterianos Bt 3480, Bp 3461, Bt 3971, Bp 4096, Bt 4153, Bt4155, Bp 4176, Bp 4185, Adulto sin tratamiento mostraron una mortandad de 100% versus el Control + con 82% (Figura 1.28).

Figura 1.28: Efecto en la mortandad del insecto de la broca después de 120 horas de inoculación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mediante los bioensayos se estableció que entre los periodos de 48, 72 y 96 horas después de la inoculación ocurrió la mortandad sobre el 50% de la población. La bacteria *Bacillus thuringiensis* Bt 3971 indujo la mayor mortandad en los periodos de 48h, 72h y 96h, con 55%, 80% y 89%, respectivamente. En la cepa bacteriana *Bacillus pumilus* Bp 3461 se obtuvo mejor

efectividad a las 72h con 50% y las 96h con 78% de mortandad. Las cepas Bt 4155 y Bp 4185 fueron efectivas a partir de las 96h con 67% y 44% en la mortandad del insecto.

En el movimiento del insecto las cepas de *B. pumilus* Bp4096 y Bp4185 fueron significativas en la reducción del movimiento, mientras que las *B. thuringiensis* fueron más efectivas en cuanto a la mortandad del insecto.

El efecto de la mortandad obtenido de las cepas *B. thuringiensis* es característico al modo de acción de la bacteria ya que al exponerse el insecto a la suspensión bacteriana, éste ingiere la bacteria activándose los cuerpos para-esporales causando toxicidad en el insecto y ocasionando que el insecto cese la ingesta de alimento y muera por septicemia (Hernández, 2002). Mientras que la bacteria *B. pumilus* es menos conocida en el control de insectos, ésta se conoce mayormente por sus efectos anti fúngicos. Sin embargo, Molina *et al.*, 2010, en un estudio realizado con *Bacillus pumilus* en larvas de *C. capitata*, determinaron que la bacteria es altamente tóxica a temperaturas bajas durante el proceso de esporulación.

1.4 CONCLUSIONES

1. Se estableció que entre los periodos de 48, 72 y 96 horas después de la inoculación ocurrió la mortandad sobre el 50% de la población.
2. La bacteria *Bacillus thuringiensis* Bt 3971 indujo la mayor mortandad en los periodos de 48h, 72h y 96h, con 55%, 80% y 89%, respectivamente.
3. En la cepa bacteriana *Bacillus pumilus* Bp 3461 se obtuvo mejor efectividad a las 72h con 50% y las 96h con 78% de mortandad. Para las cepas Bt 4155 y Bp 4185 fueron efectivas a partir de las 96h con 67% y 44% en la mortandad del insecto.
4. En el movimiento del insecto las cepas de *B. pumilus* Bp4096 y Bp4185 fueron significativas en la reducción del movimiento, mientras que las *B. thuringiensis* fueron más efectivas en cuanto a la mortandad del insecto.
5. Mediante este estudio se confirma el potencial de ambas bacterias como control biológico de la broca del café.

1.5 Literatura citada:

- Abbot, W. S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Barrera, J. F., 2007. Coffee Pest and their Management: Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México. 961p.
- Barrera, J. F. y J. I. López-Arroyo, 2008. Control biológico de insectos plaga en el sureste de México, pp. 201-233. *En*: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.), Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Baró Robaina, Y, D. M. Fontana y R. D. Santos, 2009. Caracterización de cepas *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y *Anticarsia Gemmatalis* Hübner (Lepidóptera: Noctuidae). *Fitosanidad.* 13 (3): 187-192.
- Bustillo, A.E., R. Cárdenas and F.J. Posada, 2002. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. *Neotropical Entomology.* 31(4): 635-639.
- Cerstiaens, A., P. Verleyen, J. Van Rie, E. Van Kerkhove, J. Schwartz, R. Laprade, A. De Loof and L. Schoofs, 2001. Effect of *Bacillus thuringiensis* Cry 1 Toxins in Insect Hemolymph and Their Neurotoxicity in Brain Cells of *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67 (9): 3923-3927.
- De la Rosa, W., M. Figueroa and J. E. Ibarra, 2005. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains native to Mexico active against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Vedalia* 12 (1): 3-9.
- Franqui Rivera, R. A. y S. Medina Gaud, 2003. Identificación de Insectos de Posible Introducción a Puerto Rico. Depto. de Protección de Cultivos, Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto Universitario de Mayagüez, Univ. de P.R.. Estación Experimental Agrícola. Jardín Botánico, Sur 1193 Calle Guayacán, San Juan, PR 00926-1118. 6-7p.
- Gallardo, F., E. Hernández y J. Pagán, 2009. Presencia natural del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en Puerto Rico. SOPCA. Reunión Científica Annual, Ponce, P.R. (Presentación oral).
- Hernández Soto, A., 2002. Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari). M.S. Tesis. Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular, Univ. Costa Rica, CR. 10p.
- Molina, C. A., J. F. Caña Roca, A. Osuna and S. Vilchez, 2010. Selection of *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) Larvae. *Applied and Environmental Microbiology.* 76 (5): 1320-1327.
- Monroig, M. F., 2007. Manejo Integrado de la Broca del Café: Control Biológico. <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id34.htm>

- Ramarathnam, R., S. Bo, Y. Chen, W. G. Fernando, G. Xuewen and T. de Kievit, 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus spp.*, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can J Microbiol.* 53(7):901-11.
- Sayeed Akhtar, M., and Z. A. Siddiqui, 2006. *Glomus intradaradices*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Gen. Plant Pathol.* 74:53–60.
- Vázquez, D. y M. Zapata, 2009. Resultados preliminares sobre el control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) con bacterias del tipo *Bacillus spp.* Investigación sub-graduada. Univ. de Puerto Rico, Mayagüez, PR. (*unpublished*).

CAPÍTULO II

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA VIRULENCIA DE LAS BACTERIAS
BACILLUS THURINGIENSIS Y *BACILLUS PUMILUS* SELECCIONADAS
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFÉ.**

CAPÍTULO II

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA VIRULENCIA DE LAS BACTERIAS *BACILLUS THURINGIENSIS* Y *BACILLUS PUMILUS* SELECCIONADAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFÉ.

RESUMEN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es considerada una de las plagas más devastadora del cultivo de café a nivel mundial. Esta reduce el peso y calidad del café al reproducirse y alimentarse dentro del fruto. Estudios recientes realizados en la UPR muestran el potencial de dos especies: *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *Bacillus pumilus* (Bp) para el control de la broca. Bt se caracteriza por poseer propiedades tóxicas a insectos. Bp es una bacteria formadora de esporas con actividad antifúngica a ciertos patógenos. El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro* la capacidad de ocasionar mortandad de *Bacillus thuringiensis* 3971 y *Bacillus pumilus* 4185 para el control de la broca del café. Se realizaron bioensayos con suspensiones bacterianas estandarizadas a 0.6, 0.8 y 1.0 de absorbancia en un diseño de bloques al azar. Se determinó la mortandad del insecto a las 24h, 48h, 72h, 96h utilizando la fórmula de Abbott (1925) y se utilizaron análisis estadísticos de ANOVA para detectar diferencias significativas. En Bt 3971 se encontraron diferencias estadísticas significativas en las suspensiones de 0.6A y 0.8A, y para Bp 4185 en 0.6A y 1.0A. El periodo de tiempo más corto para causar el 50% de mortandad en una población de insectos tratados con Bt fue a las 48h (55%) y a las 72h (82%) a 0.8A. Para Bp el periodo de tiempo más corto para causar el 50% de mortandad fue a las 72h (55%) a 1.0A y las 96h (46%) a 0.8A. Estos resultados establecen las concentraciones necesarias de Bt y Bp para obtener un efecto significativo en la mortandad del insecto y confirman que ambas especies bacterianas tienen el potencial de control biológico para la broca del café.

ABSTRACT

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is one of the most devastating pests of the coffee crop in the world. It feeds and reproduces inside the fruit reducing the weight and quality of coffee. Recently, studies conducted at the UPR have shown the potential of two species: *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Bacillus pumilus* (Bp) for controlling the coffee berry borer. Bt is characterized to have insecticidal properties toxic to insects. Bp is a spore forming bacterium with antifungal activity to certain pathogens. The purpose of this study was to determine *in vitro* the ability to cause mortality of *Bacillus thuringiensis* 3971 and *Bacillus pumilus* 4185 to control the coffee berry borer. Bioassays were conducted with standardized bacterial suspensions at 0.6, 0.8 and 1.0 absorbance in a randomized block design. The insect mortality was determined at 24h, 48h, and 96h using the Abbott (1925) formula and statistical analysis by ANOVA was used to detect significant difference. In Bt 3971 significant statistical differences were found in the suspensions 0.6A and 0.8A and for Bp 4185 were at 0.6A and 1.0A. The shorter time to cause 50% mortality in a population of insects treated with Bt was at 48h (55%) and 72h (82%) with 0.8A. For Bp the shorter time to cause 50% mortality was at 72h (55%) with 1.0A and at 96h (46%) with 0.8A. These results establish the concentrations of Bt and Bp necessary to obtain a

significant effect on the insect mortality and confirm that both bacterial species have the potential for biological control of coffee berry borer.

2.1 INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica en Puerto Rico. Este ocupa la quinta posición de las empresas agrícolas con un ingreso bruto de \$40.8 millones que beneficia a 22 municipios de la región oeste central (OEADA, 2008). Sin embargo, en los últimos años la producción de café en la isla se ha limitado debido a varios factores: la falta de mano de obra para el recogido del café, el alto costo de producción y recientemente por el daño causado por la broca del café la cual fue detectada en el 2007.

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleóptero: Scolytidae) es considerada una de las plagas más devastadora del cultivo de café a nivel mundial (Méndez et al., 2003). La broca del fruto del café es considerada una de las plagas que más daño causa, ya que reduce el peso y calidad del café al reproducirse y alimentarse dentro del fruto (De la Rosa et al., 2005). La broca hembra perfora el fruto por la parte de la corona llegando al endospermo donde pone sus huevos. Estos eclosionan a la etapa larval, barrenan el tejido de la cereza haciendo bolsillos de apertura al túnel principal barrenado por la madre. En esta etapa es donde causa más daño al fruto. Luego, la hembra madura sale de la semilla ya fecundada por un macho hermano y se traslada a otro fruto que esté comenzando a madurar (Franqui y Medina, 2003).

Para el control de la broca del café se han utilizado agentes de control biológico como: *Cephalonomia stephanoderis* (de Costa de Marfil, Togo), *Heterospilus coffeicola* (de Camerún, Zaire, Kenia, Tanzania, Uganda), *Prorops nasuta* (de Camerún, Costa de Marfil, Zaire, Kenia, Tanzania, Togo, Uganda) (Barrera, 2007). La broca además puede ser parasitada por los hongos entomopatógenos como el *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* siempre y cuando no haya taladrado profundo en el fruto (Gallardo et al., 2009). Otras alternativas que se incluyen para el control en la broca es el uso de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bustillo et al., 2002).

Bacillus thuringiensis (Bt) es uno de los entomopatógenos más exitosos a nivel mundial en control biológico de algunas de las plagas más importantes en la agricultura. Esta bacteria pertenece a la familia Bacillaceae. Es un género de bacterias con forma de bastón, gram positivo y aerobia. Las endoesporas de *Bacillus* son de forma elipsoidales y se encuentran en la parte

central de la célula. Estas endoesporas de resistencia pueden permanecer activas por largos periodos de tiempo. Además, las células de ésta bacteria forman un cuerpo para-esporal o proteínas de cristal. Los cristales de Bt tienen diversas formas durante la esporulación y son de naturaleza proteica (De la Rosa *et al.*, 2005). Bt tiene la capacidad de sintetizar una cantidad de proteínas tóxicas como la δ -endotoxina denominada como *Cry* y *Cyt*. Estas proteínas resultan tóxicas al ser ingeridas por insectos susceptibles, en los que se incluyen importantes plagas agrícolas. Las toxinas forman un complejo espora-cristal que posee propiedades insecticidas efectivos para el control de larvas de lepidópteros (*Spodoptera frugiperda*), dípteros (*Neobellieria bullata*) y coleópteros (*Anthonomus grandis*) (Baró *et al.*, 2009). Al ingerirse el cristal, la proteína *cry* se disuelve en el mesenterón del insecto creando poros en la membrana intestinal, lo que conlleva a que este cese la ingesta y eventualmente su muerte por septicemia. Esta bacteria la hace ideal como insecticida debido a que las proteínas *cry* mantienen una forma de control sostenible; ya que no afecta a los insectos benéficos como los depredadores y parasitoides (Hernández, 2002).

Por otro lado, *Bacillus pumilus* (Bp) al igual que *Bacillus thuringiensis* es una bacteria del tipo bacilo gram positivo formadora de esporas del tipo elipsoidal localizada en la parte central de la célula y se encuentra mayormente en el suelo. Bp es una bacteria con actividad anti-fúngica específica solo con ciertos patógenos (Sayeed y Siddiqui, 2006). Esta se caracteriza por la producción de fungicidas tales como bacilomicin D y fengicin (Ramarathnam *et al.*, 2007). Muy poco se conoce de la toxicidad de Bp en insectos. Molina *et al.* (2010), demostraron la actividad tóxica, la cual relacionaron al proceso de esporulación y a las bajas temperaturas, de Bp en adultos y larvas de *Ceratitis capitata*. Por lo que, Bp al igual que Bt, tienen potencial como posibles bio-controladores de insectos plaga. En el 2009 y 2011, Vázquez y Zapata, a través de un estudio determinó el efecto de distintas cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones *in vitro*, donde las bacterias Bt 3971 y Bp 4185 indujeron la mayor mortalidad. También se determinó que Bp 4185 fue significativa en la reducción del movimiento del insecto.

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración letal de las cepas *B. thuringiensis* (Bt) 3971 y *B. pumilus* (Bp) 4185 seleccionadas previamente con potencial de control biológico de la broca de café mediante bioensayos realizados y financiados bajo el proyecto FIDA 3 de la EEA-UPR.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colección de insectos:

Se establecieron trampas para brocas en una finca en Las Marías, P.R. Se colectaron hembras de la broca del café entre 24 a 48 horas y se llevaron al laboratorio donde se procedió inmediatamente al establecimiento de los bioensayos. Utilizando un pincel, las hembras se colocaron en viales de cristal en grupo de 11 insectos.

2.2.2 Determinación de la concentración letal:

Las cepas Bt 3971 y Bp 4185 se incubaron a 28°C en tubos con 20ml de caldo nutritivo (NB) por 24 horas en un agitador marca L.E.D. Orbit a 150rpm. Luego, se prepararon suspensiones bacterianas estandarizadas a 0.6, 0.8 y 1.0 de absorbancia a 590nm (Figura: 2.1a). Se depositó 20µl de las suspensiones bacterianas en un círculo dentro de cada placa petri (Figura: 2.1b). Utilizando un pincel de celdas finas se colocó el insecto en la suspensión bacteriana de la placa petri por 15 minutos (Figura: 2.1c). Estas fueron colocadas (1insecto inoculado/placa) en envases de cristal y se cubrieron con tela tipo gaza (Figura: 2.1d y 2.1e). Se utilizó un diseño de bloques completo al azar (DBCA) con un control con agua esterilizada y las tres suspensiones bacterianas estandarizadas con 11 replicados. Se evaluó la mortalidad del insecto cada 24 horas después de la inoculación. En la evaluación de la mortandad se utilizaron los siguientes valores: 1 para insectos muertos y 2 para insectos vivos y corregidos con la formula de Abbott (1925). La eficacia de un agente de control= $[100*(Ta-Ca)/100-Ca]$ con: Ta= mortalidad de la población en el tratamiento y Ca= mortalidad de la población en el control.

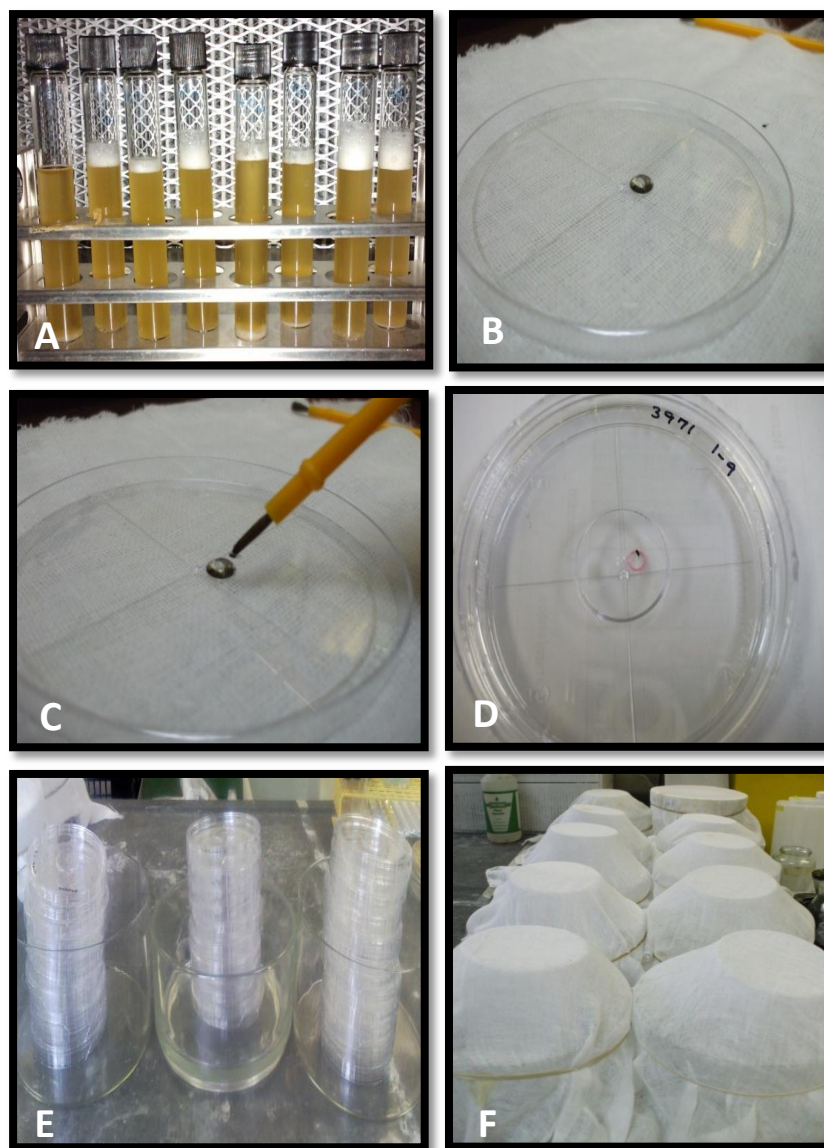


Figura 2.1: a) Suspensiones bacterianas estandarizada a 0.6A, 0.8A y 1.0A, b) Suspensión bacteriana depositada en el círculo, c) Colocación del insecto en la suspensión bacteriana, d) Insecto tratado donde se removió la suspensión bacteriana, e) Bloques con 11 repeticiones por tratamiento, f) Bloques dentro del contenedor de cristal cubierto con tela.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la mortalidad fue provocado por diferentes concentraciones bacterianas de 0.6A, 0.8A y 1.0A para determinar la concentración letal de las cepas bacterianas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* en diferentes intervalos de tiempo presentado en el cuadro 2.1.

Bacillus thuringiensis (Bt 3971) mostró una mortalidad de 18.2% a las 48h de la inoculación y 81.8% a las 96h con 0.6A. Con 0.8A se obtuvo una mortalidad de 9.1% a las 24h y 90.9% a las 96h después de la inoculación. Con 1.0A la mortalidad fue de 36.4% a partir de las 48h después de la inoculación y 100% después de las 96h (Cuadro 2.1). La mortalidad obtenida con la cepa de Bt 3971 fue similar a los resultados observados por Méndez *et al.*, (2003) y De la Rosa *et al.*, (2005) con diferentes variedades de *B. thuringiensis* para el control de broca del café en etapas de crecimiento de larva y adulto a través de bioensayos con complejos espora-cristal. Méndez *et al.*, (2003) determinaron que *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* es altamente tóxica a la broca del café durante su etapa larval. En su estudio utilizaron complejos espora-cristal de cepas de Bt a distintas concentraciones (1000-10.1ng cm⁻²) en una dieta artificial mediante bioensayos utilizando larvas de primer instar de la broca. La mortalidad fue obtenida después de 6 días de incubación. Usaron 170 cepas de Bt, donde 32 cepas resultaron con una toxicidad significativa y con una mortalidad de larvas entre 90% a 100%. La mortalidad reportada por Méndez *et al.* en el 2003 fue similar a la obtenida en nuestro estudio con la cepa bacteriana Bt 3971 mediante bioensayos utilizando suspensiones bacterianas con presencia de esporas con la diferencias que utilizamos adultos. Por otro lado, De la Rosa *et al.*, (2005) realizaron una selección de cepas nativas en México de *Bacillus thuringiensis* activa contra la broca del café bajo condiciones de laboratorio. En éste estudio realizaron bioensayos utilizando diferentes estados de crecimiento de la broca del café como: huevos, larvas y hembras adultas. Utilizaron complejos espora-cristal de 61 cepas de *Bacillus thuringiensis* mezcladas en una dieta artificial a diferentes concentraciones (0, 1, 10 y 100 µg/g complejos espora-cristal). Las 61 cepas evaluadas mostraron diferentes grados de toxicidad en larvas de *H. hampei*, con rangos de mortalidad desde 8.3 a 83% similar a lo observado en este estudio con la cepa bacteriana Bt 3971.

Bacillus pumilus (Bp 4185) con 0.6A mostró una mortandad de 9.1% a las 48h y 36.4% a las 96h después de la inoculación. Con 0.8A la mortalidad observada fue de 9.1% a partir de las 24h y 45.5% en las 96h después de la inoculación. Con 1.0A la mortalidad fue de 9.1% a las 24h y 100% a las 96h después de la inoculación (Cuadro 2.1). En el caso de *B. pumilus* los resultados

fueron similares a los reportados por *Molina et al.*, (2010) en larvas de la mosca frutera, *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae). En éste estudio realizaron bioensayos utilizando larvas y adultos de *C. capitata* en una dieta artificial mezclada con suspensiones de 115 cepas bacterianas. La bacteria 15.1 perteneciente a *Bacillus pumilus* (Bp) fue la que mayor toxicidad mostró, causando una mortalidad entre 68 a 94% después de 15 días de inoculadas en larvas de primer instar parecido a lo observado en este estudio. En otro estudio realizado por Yaman et al. (2010) realizaron ensayos de infección usando una cepa de *B. pumilus* en larvas como adultos de *Dendroctonus micans* (Coleóptero: Scolytinae). Los resultados mostraron que la bacteria BP causó 69% y 40% de mortalidad en larvas y adultos, respectivamente. En nuestro estudio Bp presentó una mortalidad de 54.5 a 100% entre 72h y 96h después de la inoculación siendo la mortalidad superior y con menor tiempo de inoculación a lo obtenido por *Molina et al.*; *Yaman et al.*, 2010.

Cuadro 2.1 Evaluación de la mortalidad provocada en la broca por diferentes concentraciones de *B. thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) en periodos de 24 a 96h horas.

Especies	Cepas	n	Tiempo ¹	Mortalidad (%) ²		
			(horas)	0.6 ³	0.8	1.0
<i>B. thuringiensis</i>	3971	11	24	0.0	9	0.00
		11	48	18	55	36
		11	72	36	82	73
		11	96	82	91	100
<i>B. pumilus</i>	4185	11	24	0	9	9
		11	48	9	9	36
		11	72	18	9	55
		11	96	36	46	100

¹Horas después de la inoculación con las diferentes concentraciones bacterianas.

²Mortalidad corregida con formula de Abbott (1925).

³Absorbancia de las suspensiones bacterianas.

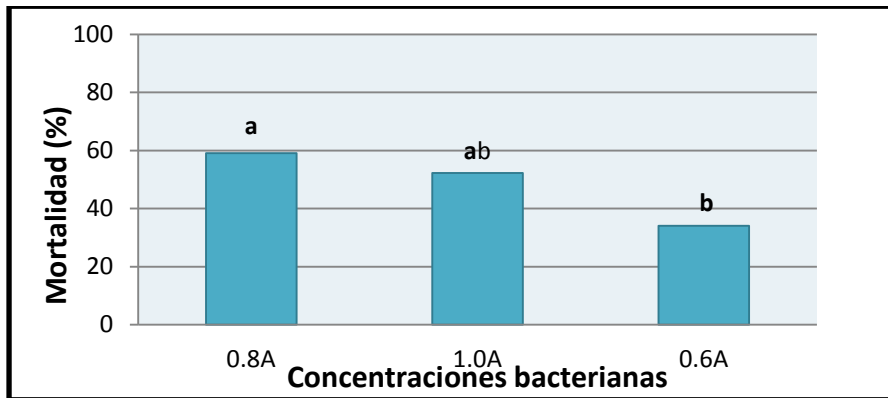
Mediante el análisis estadístico para la cepa bacteriana *B. thuringiensis* 3971 se detectaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las concentraciones bacterianas utilizadas en los diferentes bioensayos (Anexo 1.2). Con 0.8A se obtuvo 59% de mortandad, con 1.0A se obtuvo 52% y con 0.6 se obtuvo 34% de mortandad (Cuadro 2.2). Siendo las concentraciones de 0.8A y 1.0A donde hubo mayor mortalidad y a 0.6A la menor (Figura 2.2).

Cuadro 2.2. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre las concentraciones de *B. thuringiensis*.

Concentración	Media	n	E.E.	
0.8A	59.07	44	0.17	A
1.0A	52.27	44	0.17	A B
0.6A	34.10	44	0.17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.2. Porcentaje de mortalidad de la broca vs. diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis*.



DMS, $P=0.05$.

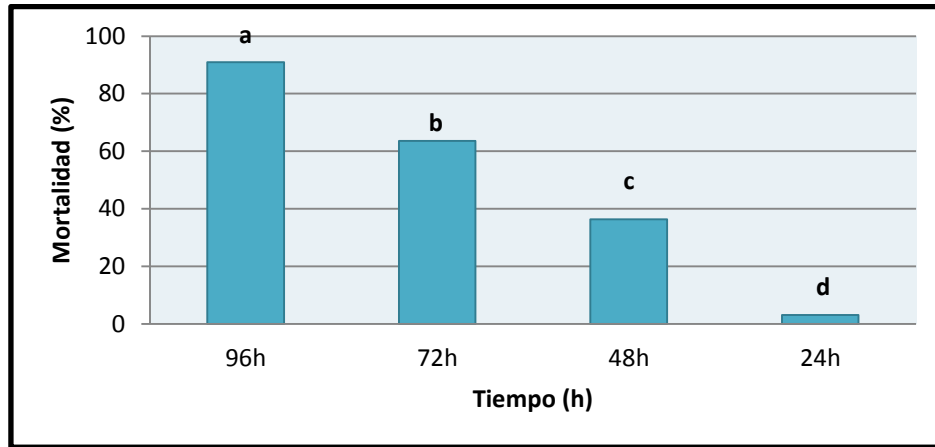
En el análisis de ANOVA mediante los intervalos de tiempo hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los periodos de tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación con la cepa *B. thuringiensis* (Cuadro 2.3). A las 96h fue donde ocurrió la mayor mortalidad con 90% mientras que los periodos de 72h fue de 63%, en la de 48h fue de 36% y el de 24h fue de 3% (Figura 2.3). Los periodos de 96h y 72h superaron la mortandad de más de 50%.

Cuadro 2.3. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. thuringiensis*.

Tiempo (h)	Media	
96	90.90	A
72	63.63	B
48	36.37	C
24	3.03	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.3. Porcentaje de mortalidad de la broca vs. tiempo de aplicación de *Bacillus thuringiensis*.



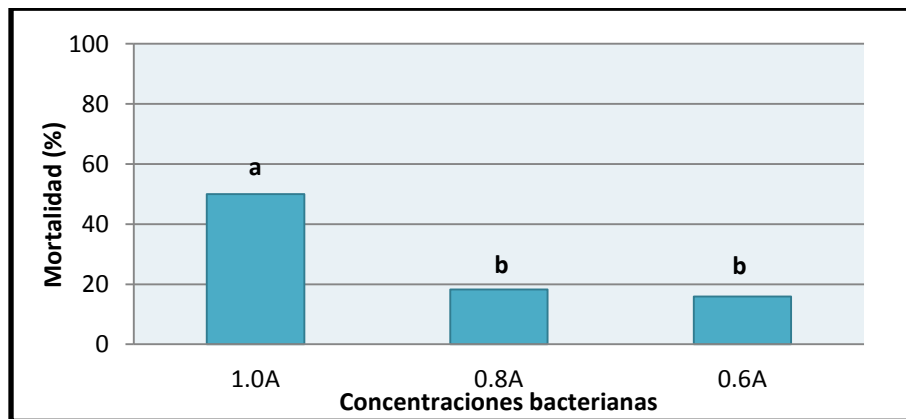
En la cepa bacteriana *B. pumilus* hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.5$) entre las diferentes concentraciones de 0.6A, 0.8A y 1.0A (Cuadro 2.4). Se detectaron diferencias mínimas significativas (DMS) en las concentraciones de 0.6A con 16% de mortandad, 0.8A con 18% y 1.0A con 50%, siendo esta donde hubo mayor mortandad (Figura 2.4).

Cuadro 2.4. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre las concentraciones de *B. pumilus*.

Concentración	Media	
1.0A	50.00	A
0.8A	18.20	B
0.6A	15.92	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.4. Porcentaje de mortalidad de la broca vs. diferentes concentraciones de *Bacillus pumilus*.



DMS, $P=0.05$.

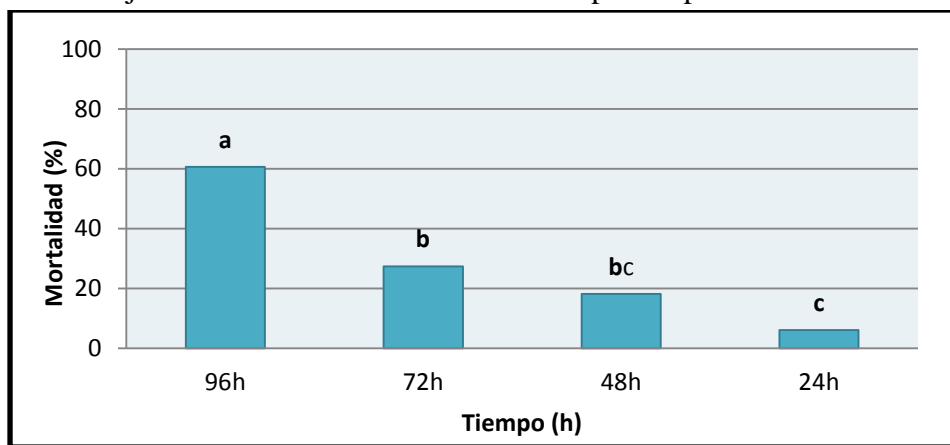
En el análisis de ANOVA para los intervalos de tiempo hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación con la cepa *B. pumilus* (Cuadro 2.5). A las 96h fue donde ocurrió la mayor mortalidad con 60% mientras que a 72h fue de 27%, en 48h fue de 18% y 24h fue 6% (Figura 2.5).

Cuadro 2.5. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. pumilus*.

Tiempo (h)	Media			
96	60.63	A		
72	27.30	B		
48	18.20	B	C	
24	6.07	C		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.5. Porcentaje de mortandad de la broca vs. tiempo de aplicación de *Bacillus pumilus*.



DMS, $P=0.05$.

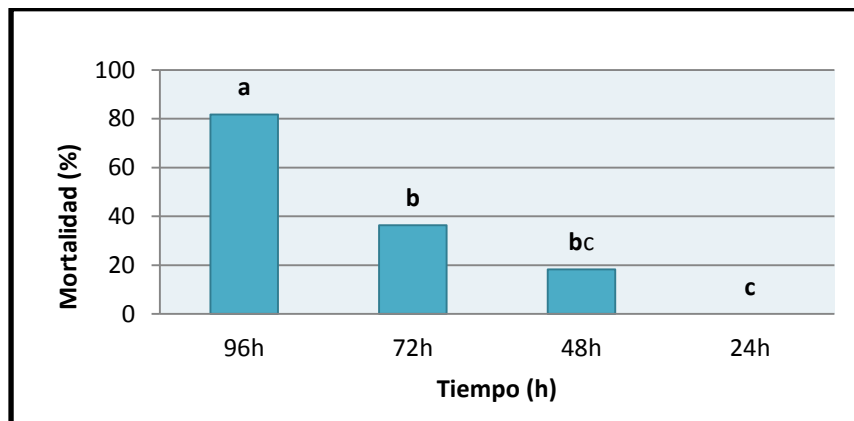
Se realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas por concentración bacteriana para cada especie estudiada (Anexo 1.3). En el análisis de la concentración bacteriana de 0.6A de Bt se detectaron diferencias mínimas significativas ($P < 0.05$) entre los periodos de 24, 48, 72 y 96 horas siendo éste último donde ocurrió la mayor mortalidad con 81% (Figura 2.6).

Cuadro 2.6. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. thuringiensis* con la concentración bacteriana de 0.6A.

Tiempo (h)	Media	n	E.E.			
96	81.80	11	0.34	A		
72	36.40	11	0.34	B		
48	18.20	11	0.34	B	C	
24	0.00	11	0.34	C		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.6. Mortalidad (%) de la broca inducido por *Bacillus thuringiensis* con la concentración de 0.6A.



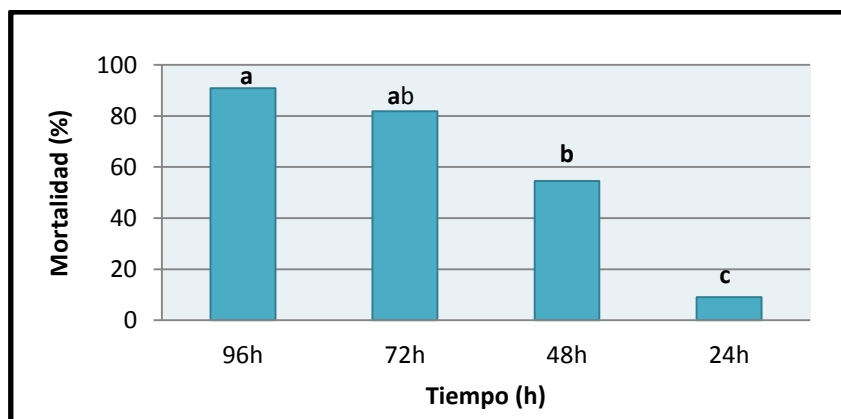
En el análisis de ANOVA de la concentración bacteriana de 0.8 de absorbancia de Bt hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los periodos de tiempo (Anexo 1.3). Los periodos de las 72h y 96h no mostraron diferencias significativas entre si y fue donde se obtuvo mayor mortalidad con 81% y 90% versus 48h y 24h que resultaron significativamente menores (Cuadro 2.7) (Figura 2.7).

Cuadro 2.7. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. thuringiensis* con la concentración bacteriana de 0.8A.

Tiempo (h)	Media	n	E.E.		
96	90.90	11	0.35	A	
72	81.80	11	0.35	A	B
48	54.5	11	0.35		B
24	9.10	11	0.35		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.7. Mortalidad (%) de la broca inducido por *Bacillus thuringiensis* con la concentración de 0.8A.



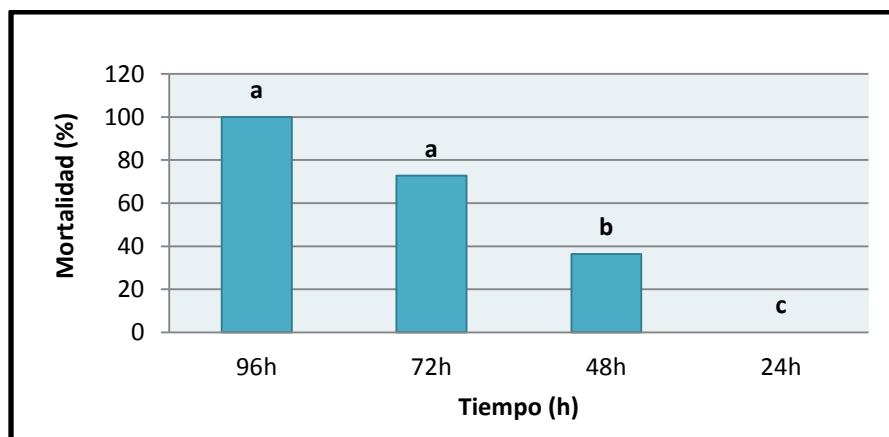
Para la concentración 1.0A de Bt hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes periodos de tiempo (Anexo 1.3). En los periodos de 72 y 96h fue donde ocurrió la mayor mortalidad con 72 y 100% no hubo diferencias pero si resultaron significativamente menores con los periodos de 48h y 24h (Cuadro 2.8) (Figura 2.8).

Cuadro 2.8. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. thuringiensis* con la concentración de 1.0A.

Tiempo (h)	Media	n	E.E.	
96	100.00	11	0.25	A
72	72.70	11	0.25	A
48	36.37	11	0.25	B
24	0.00	11	0.25	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.8. Mortalidad (%) de la broca inducido por *Bacillus thuringiensis* con la concentración de 1.0A.



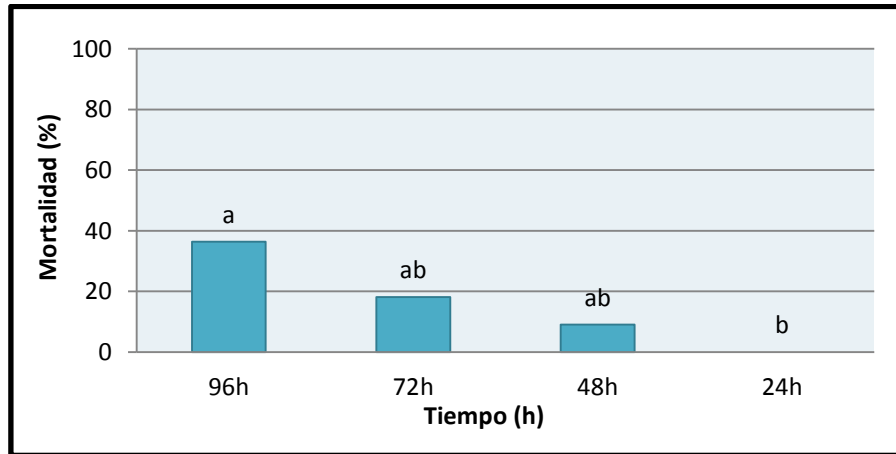
Se realizaron análisis estadísticos para determinar diferencias significativas en *B. pumilus* dentro de cada concentración bacteriana. En la concentración de 0.6A no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los periodos de 96h, 72h y 48h pero si entre 96h y 24h (Cuadro 2.9) (Figura 2.9).

Cuadro 2.9. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. pumilus* con la concentración de 0.6A.

Tiempo (h)	Media	n	E.E.	
96	36.40	11	0.32	A
72	18.20	11	0.32	A B
48	9.10	11	0.32	A B
24	0.00	11	0.32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.9. Mortalidad (%) de la broca inducido por *Bacillus pumilus* con la concentración de 0.6A.



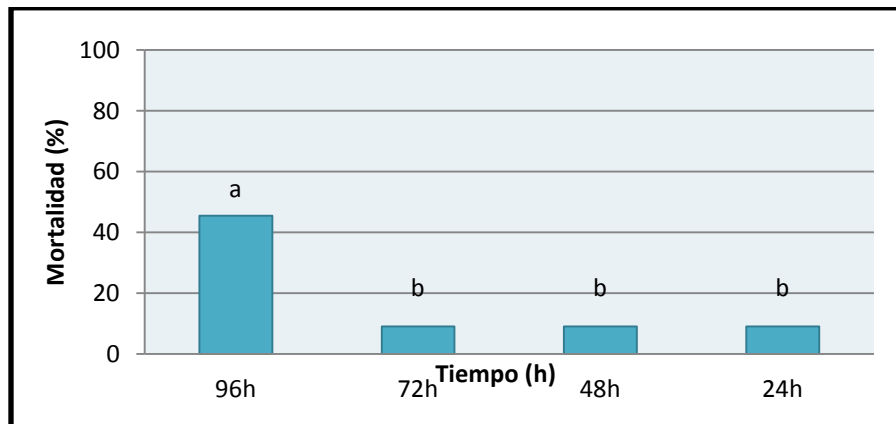
En el análisis de la concentración de 0.8A no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) (Anexo 1.3), entre el periodo de 96h versus 72h, 48h y 24h (Cuadro 2.10) (Figura 2.10).

Cuadro 2.10. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. pumilus* con la concentración de 0.8A.

Tiempo	Media	n	E.E.	
96	45.50	11	0.33	A
72	9.09	11	0.33	B
48	9.10	11	0.33	B
24	9.10	11	0.33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.10. Mortalidad (%) de la broca inducido por *Bacillus pumilus* con la concentración de 0.8A.



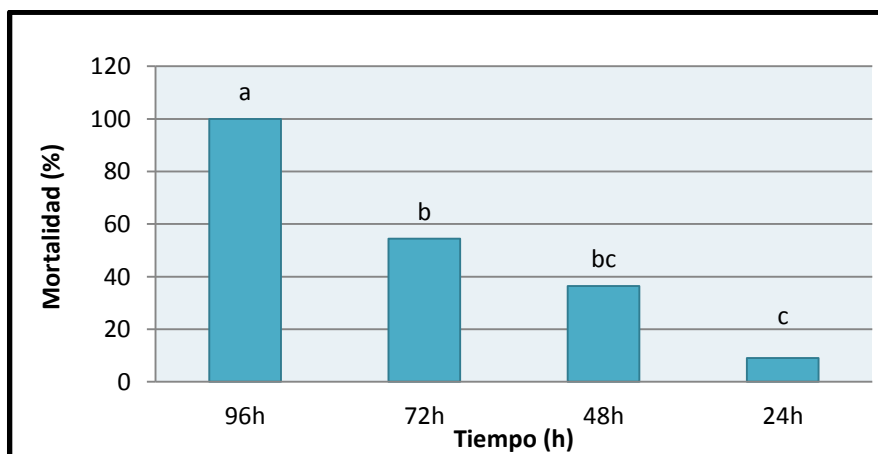
Para la concentración bacteriana de 1.0A hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los periodos de tiempo (Anexo 1.3). A las 24h la mortalidad fue de 9%, mientras que a las 48h fue de 36% y a las 72h fue de 54%. En las 96h fue donde ocurrió la mayor mortalidad con 100% con diferencias significativas con los otros periodos (Cuadro 2.11) (Figura 2.11).

Cuadro 2.11. Análisis para la detección de diferencias mínimas significativas (DMS) entre los periodos de tiempo de *B. pumilus* con la concentración de 1.0A.

Tiempo (h)	Media	n	E.E.	
96	100.00	11	0.36	A
72	54.50	11	0.36	B
48	36.40	11	0.36	B C
24	9.10	11	0.36	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 2.11. Mortalidad (%) de la broca inducido por *Bacillus pumilus* con la concentración de 1.0A.



La relación de dosis-mortalidad del insecto a la bacteria es típicamente expresada como el valor de la concentración letal, en el cual es la concentración requerida para matar el 50% de la población en periodo de tiempo específico (Jyoti y Brewer, 1999).

En los distintos periodos de tiempo a partir de las 48h, 72h, y 96h en *B. thuringiensis* y *B. pumilus* fue que a medida que se aumenta la concentración bacteriana la mortalidad obtenida fue mayor. Esto sucede debido a que se utiliza una suspensión bacteriana más concentrada en la cual hay mayor efecto de toxicidad de la bacteria hacia la broca (Jyoti y Brewer, 1999). Además, la mortalidad está relacionada ya que a mayor tiempo de inoculación la población de insectos vivos es menor. Algo similar fue reportado por Gómez *et al.*, (2006) utilizando *B. thuringiensis* en

larvas de *Anthonomus grandis* (Coleóptero: Curculionidae) donde observaron que a medida que aumentaba la concentración letal la mortalidad de los insectos disminuía debido a un exceso de enzimas causando un efecto inhibitorio de la actividad tóxica de la bacteria.

2.4 CONCLUSIONES

1. En *Bacillus thuringiensis* las concentraciones que causaron mayor mortandad fueron 0.8A y 1.0A.
2. El periodo de tiempo más corto para causar el 50% de mortandad en una población de insectos tratados con Bt fue a las 48h (55%) y a las 72h (82%) a 0.8A.
3. En *Bacillus pumilus* la concentración que causó mayor mortandad fue 1.0A siendo esta significativa.
4. Para Bp el periodo de tiempo más corto para causar el 50% de mortandad fue a las 72h (55%) a 1.0A y las 96h (46%) a 0.8A.
5. Estos resultados establecen las concentraciones necesarias de Bt y Bp para obtener un efecto significativo en la mortandad del insecto y confirman que ambas especies bacterianas son virulentas y tienen el potencial de control biológico para la broca del café.

2.5 Literatura citada:

- Abbot, W. S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Barrera, J. F., 2007. Coffee Pest and their Management: Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México. 961p.
- Baró Robaina, Y., D. M. Fontana y R. D. Santos, 2009. Caracterización de cepas *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y *Anticarsia Gemmatalis* Hübner (Lepidóptera: Noctuidae). *Fitosanidad.* 13 (3): 187-192.
- Bustillo, A. E., R. Cárdenas y F.J. Posada, 2002. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. *Neotropical Entomology.* 31(4): 635-639.
- Carrera, B., D. Rodríguez y F. Piedra, 2009. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de *Heliothis virescens* Fabricius en el cultivo del tabaco en Cuba. *Fitosanidad;* 13(4): 277-280.
- De la Rosa, W., M. Figueroa y J. E. Ibarra, 2005. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains native to Mexico active against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Vedalia* 12 (1): 3-9.
- Franqui Rivera, R. A. y S. Medina Gaud, 2003. Identificación de Insectos de Posible Introducción a Puerto Rico. Depto. de Protección de Cultivos, Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto Universitario de Mayagüez, Univ. de P.R. EEA. Jardín Botánico, Sur 1193 Calle Guayacán, San Juan, PR 00926-1118. 6-7p.
- Gallardo, F., E. Hernández y J. Pagán, 2009. Presencia natural del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en Puerto Rico. SOPCA Reunión Científica Anual, Ponce, P.R. (Presentación oral).
- Gómez, S., G. Díaz y V. M. Núñez, 2006. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre el picudo del algodónero *Anthonomus grandis* Boheman. *Agro. Colombiana,* 24(2): 296-301.
- Hernández Soto, A., 2002. Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari). M.S. Tesis. Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular, Univ. Costa Rica, CR. 10p.
- Jyoiti, J.L. and G.J. Brewer, 1999. Median lethal concentration and efficacy of *Bacillus thuringiensis* against banded sunflower moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 92(6): 1289-91.
- Méndez, I., R. Basurto and J.E. Ibarra, 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiology Letters.* 226: 73-77.
- Molina, C.A., J. F. Caña Roca, A. Osuna, and S. Vilchez, 2010. Selection of *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) Larvae. *Applied and Environ. Microbiology.* 76 (5): 1320-27.
- Monroig, M. F., 2007. Manejo Integrado de la Broca del Café: Control Biológico. <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id34.htm>

- Puerto Rico's Department of Agriculture, 2008. Agricultural Annual Gross Income, revised data 2007-2008 and preliminary data 2008-2009. Puerto Rico's Commonwealth, San Juan, PR.
- Ramarathnam, R., S. Bo, Y. Chen, W.G. Fernando, G. Xuewen and T. de Kievit, 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus spp.*, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can J. Microbiology*. 53(7): 901-11.
- Sayed Akhtar, M. and Z. A. Siddiqui, 2006. *Glomus intradaradices*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 53–60.
- Vázquez, D. y M. Zapata, 2009. Resultados preliminares sobre el control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) con bacterias del tipo *Bacillus spp.* Investigación sub-graduada. Univ. de Puerto Rico, Mayagüez, PR. (*unpublished*).
- Vázquez, D. y M. Zapata, 2011. Efecto de cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones in vitro. SOPCA Reunión Científica Anual, Ponce, P.R. (Resumen).
- Yaman, M., 2010. Isolation of some pathogenic bacteria from the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* and its specific predator, *Rhizophagus grandis*. *Folia Microbiol.* 55(1): 35-38.

CAPÍTULO III.

SOBREVIVENCIA DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS DEL TIPO *BACILLUS* APLICADOS EN ÁRBOLES DE CAFETO BAJO CONDICIONES DE CAMPO.

CAPÍTULO III.

SOBREVIVENCIA DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS DEL TIPO *BACILLUS* APLICADOS EN ÁRBOLES DE CAFETO BAJO CONDICIONES DE CAMPO.

RESUMEN

El cultivo del café (*Coffea arabica* L.) es uno de los cultivos más importante en Puerto Rico. En la actualidad, el problema principal del café se conoce como broca causada por el insecto *Hypothenemus hampei* (Ferrari). La plaga se alimenta y reproduce dentro del fruto del café, reduciendo su peso y calidad, y a su vez causando pérdidas de hasta un 50% en la cosecha. El grupo *Bacillus spp.* es uno de los posibles enemigos naturales que se ha evaluado como alternativa para el control de la broca del café debido a que contiene especies bacterianas con propiedades insecticidas. Durante el 2010 y 2011 se realizaron inoculaciones en árboles de café con dos especies de *Bacillus*: *B. thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) en Adjuntas, Puerto Rico, para determinar la capacidad de sobrevivencia bajo condiciones de campo. Se realizaron monitoreos de muestras de tejidos de la corteza y de los frutos de los árboles de café. Se obtuvieron 9 colecciones de bacterias de diferente pigmentación, Gram negativas y positivas y formadoras de esporas tipo *Bacillus*. Se analizaron las poblaciones estadísticamente en un DBCA y DMS para contrastar las diferencias entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus*. En el 2010, la sobrevivencia para ambas especies fue positiva después de seis meses de inoculación. Hubo una reducción significativa en las poblaciones totales de bacterias de frutos tratadas con *B. thuringiensis* de 24h de crecimiento. En el 2011, se encontraron diferencias significativas en los tratamientos de 96h y el Mix del segundo monitoreo del predio de Bt, y en el predio de Bp con el tratamiento de 36h observándose un aumento de las poblaciones bacterianas después de la inoculación de marzo-abril. En el mes de julio, se detectaron diferencias significativas en el tratamiento de 96h observándose un aumento de las poblaciones bacterianas en el predio de Bt. En septiembre se realizó un quinto monitoreo para los predios de Bt y Bp. Ambos predios fueron positivos para la presencia de Bt y Bp. Por medio de los resultados obtenidos durante los años 2010 y 2011 se determinó la sobrevivencia de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* hasta un máximo de seis meses después de la inoculación bajo condiciones de campo.

ABSTRACT

Coffee (*Coffea arabica* L.) is one of the most important crops in Puerto Rico. Currently, the main problem in coffee is the coffee borer caused by the insect *Hypothenemus hampei*. The pest feeds and reproduces inside of the coffee berry, reducing its weight and quality, causing losses of up to 50% of the harvest. The *Bacillus spp.* group is one of the potential natural enemies that have been evaluated for the control of the coffee berry borer because it contains species with insecticidal properties. During 2010 and 2011 in Adjuntas, Puerto Rico, field inoculations on coffee trees were performed with two *Bacillus* species: *B. thuringiensis* and *B. pumilus* to establish their ability to survival under field conditions. Tissue samples from the bark and fruits of coffee trees were monitored. Nine bacterial collections were obtained containing strains with different pigmentation, gram positive and negative bacteria and spore-forming *Bacillus* types.

Populations were analyzed statistically in a RCB design and LSD was used to contrast the differences between total bacteria and *Bacillus* type. In 2010, survival of both species was positive six months after inoculation. A significant reduction of the total populations from fruits was detected when treated with *B. thuringiensis* of 24 hours growth. In 2011, significant differences were detected in treatments of 96hours and the Mix in the second monitoring of Bt, and Bp in treatment of 36hours with an increase of bacterial populations after the inoculation from March to April. In July, significant differences were detected in treatment of 96hours with an increase of bacterial populations of Bt. In September, a fifth monitoring was performed to Bt and Bp. The presence of Bt and Bp was positive. Results obtained during the years 2010 and 2011 established that the survival time of *B. thuringiensis* and *B. pumilus* is at least six months after inoculation under field conditions.

3.1 INTRODUCCIÓN

La producción mundial del café (*Coffea spp.*) se está afectando por la presencia de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae). Este insecto es considerado una de las plagas más serias en la industria cafetalera. Se origina en África. En América se encuentra desde México hasta Brasil, incluyendo algunos de los países de la Región del Caribe como Cuba, Jamaica, República Dominicana, y Puerto Rico (Barrera, 2007). La plaga se alimenta y reproduce dentro del fruto del café, reduciendo su peso y calidad, y a su vez causando pérdidas de hasta un 50% en la cosecha si no se realizan las prácticas culturales correctas (De la Rosa et al, 2005).

En Puerto Rico, el café es el cultivo agrícola de mayor importancia social, económica y ecológica de la zona montañosa de la isla. La zona cafetalera está localizada en la parte oeste central, incluyendo 21 municipios, siendo el municipio de Adjuntas líder en producción de café (Rullan, 2006). La producción de café para el año 2007-08 fue de 178,000 quintales para un valor de la cosecha de \$40.8 millones (OEADA, 2008).

En el 2007, el Prof. Miguel F. Monroig, especialista del SEA de la Universidad de P.R., descubrió en su finca en San Sebastián la presencia de la broca del café. Se ha sugerido un plan de manejo integrado de la broca del fruto del cafeto, mediante diferentes métodos de control tal como el uso de parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* Betrem, *Prorops nasuta* Waterston, y el hongo *Beauveria bassiana* (Monroig, 2007; De la Rosa et al, 2005). La broca es un insecto que ataca exclusivamente al fruto de café. La hembra perfora los granos y pone sus huevos que al eclosionar salen larvas que se alimentan del fruto. Este es el estado donde más daño causa

(Rodrigo *et al.*, 2009). Los niveles poblacionales de este insecto son tan elevados que si no se aplica alguna práctica de control puede infectar todos los frutos del cafetal.

Recientemente, se han encontrado otros enemigos naturales de la broca del café como protozoarios, hongos y bacterias que podrían tener una aplicación potencial como control biológico (Hernández. 2002). En los protozoarios se encontró el microsporidio *Mattesia spp.* mientras se examinaban los intestinos del adulto de la broca de una población de insectos criados en el laboratorio, en Colombia. Los individuos afectados son relativamente inactivos, y su reproducción se reduce o muestran incapacidad para reproducirse (Bustillo, 2002). En los hongos hay 5 especies que infectan el adulto de la broca siendo el más frecuente, *B. bassiana*. El proceso de infección de éste hongo se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios los cuales se inician en la cutícula del insecto con la germinación de los conidios y la producción de hifas invasoras, las cuales se ramifican, colonizan, y llegan hasta la cavidad hemocélica donde se produce un masa micelial por el crecimiento del hongo liberando toxinas y causando la muerte del insecto (Peteira *et al.* 2011). Otras especies encontradas que infectan a la broca han sido *Hirsutella eleutheratorum*. Este hongo caracterizado por la formación de estromas filamentosos de color marrón emergiendo del cuerpo del insecto, pero su nivel de infección es bajo. *Metarhizium anisopliae*, es otro hongo que ha sido registrado afectando los adultos de *H. hampei*. La infección sucede cuando las conidias del hongo entran en contacto con el insecto y las hifas penetran la cutícula de este causando la muerte (Freimoser *et al.*, 2003). Las infecciones causadas por *Fusarium oxysporum* se han observado frecuentemente en la broca. Este hongo aparece en el cuerpo de la broca como un micelio blanco polvoriento con ligeros tonos rosa o amarillo, sin embargo no causa alta mortalidad bajo condiciones de laboratorio y campo. *Paecilomyces lilacinus* fue aislado de granos de café infectados con *H. hampei* colectados del suelo. Fue encontrado en adultos de la broca de café, que salen de los granos caídos en el suelo (Barrera, 2007; Bustillo, 1999). También se han encontrado infecciones causadas por las bacterias *Bacillus spp.* y *Serratia spp.* Su presencia se caracteriza por un color oscuro en los tegumentos del insecto de la broca y por septicemia (Bustillo, 2002) La bacteria entomopatógena *Bacillus spp.* es uno de los posibles enemigos naturales que se ha estado evaluando como posible control de la broca del café.

Bacillus thuringiensis (Bt) pertenece a la familia Bacillaceae. Es un género de bacterias con forma de bastón, gram positivo con presencia de esporas y aerobia. Las endoesporas son de

forma elipsoidales y se encuentran en la parte central de la célula. Estas endoesporas de resistencia pueden permanecer activas por largos periodos de tiempo. Además de las endoesporas, las células de la bacteria forman un cuerpo para-esporal o proteínas de cristal. Los cristales de Bt tienen diversas formas durante la esporulación y son de naturaleza proteica (De la Rosa *et al.* 2005). Bt tiene la capacidad de sintetizar una cantidad de proteínas tóxicas como la δ -endotoxina denominada como *Cry* y *Cyt*. Estas proteínas resultan tóxicas al ser ingeridas por insectos susceptibles, en los que se incluyen importantes plagas agrícolas. Las toxinas forman un complejo spora-cristal que posee propiedades insecticidas efectivos para el control de Lepidópteros, Díptera y Coleópteros (Baró *et al.*, 2009). Al ingerirse el cristal, la proteína *cry* se disuelve en el mesenterón del insecto creando poros en la membrana intestinal, lo que conlleva a que este cese la ingesta y eventualmente muere por septicemia. Esta bacteria es ideal como insecticida debido a que las proteínas *Cry* mantienen una forma de control sostenible; ya que no afecta a los insectos benéficos como los depredadores y parasitoides (Hernández, 2002).

Por otro lado, *Bacillus pumilus* (Bp) al igual que Bt es una bacteria del tipo bacilo formadora de esporas del tipo elipsoidal localizada en la parte central de la célula, mayormente se encuentra en el suelo. Bp es una bacteria con actividad anti-fúngica solo en ciertos patógenos específicos (Sayeed y Siddiqui, 2006). Esta se caracteriza por la producción de fungicidas tales como bacilomicin D y fengicin (Ramarathnam *et al.*, 2007). Esto hace que su género y sus habilidades sintetizadoras resultan de interés para experimentos en la investigación de posibles bio-controladores fitopatogénicos. En el 2010, Molina *et al.*, a través de un estudio demostraron la actividad tóxica de Bp en adultos y larvas de *Ceratitis capitata*, donde determinaron que la toxicidad de la bacteria está relacionada al proceso de esporulación y a las bajas temperaturas. En general, ambas especies de *Bacillus* tienen potencial como posibles bio-controladores entomopatógenas.

El objetivo de este estudio fue determinar la sobrevivencia de los cultivos bacterianos de tipo *Bacillus* aplicados en árboles de café bajo condiciones de campo mediante monitoreo de tejidos de la corteza y frutos de café tratados durante los años 2010 y 2011.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Ubicación del experimento

Los estudios de campo se desarrollaron en la Estación Experimental de Adjuntas, Puerto Rico (N.18° 10.310'; W 066° 47.612'), durante los años 2010 y 2011. Se realizaron varias aplicaciones de inóculos en distintas etapas de crecimiento de las especies de *Bacillus thuringiensis* 3971 y *pumilus* 4185 en arboles de cafeto.

3.2.2 Preparación y aplicación de inóculos bacterianos en campo

Las bacterias se crecieron en nephelos con 80ml con medio de caldo nutritivo a una absorbancia inicial de 0.05. Se utilizaron 24 nephelos por cada tratamiento bacteriano de los cuales 4 nephelos de 80ml (320ml de inoc./trat.) se usaron para cada tratamiento para un total de 12 (Bt: 4 nephelos para el tratamiento de 24h, 4 para 48h y 4 para 96h) (Bp: 4 nephelos para el tratamiento de 9h, 4 para 18h y 4 para 36h). De los 12 nephelos restantes 9 se utilizaron para el Mix y 3 se guardaron para realizar diluciones en series del inoculo. Luego, los inóculos bacterianos se crecieron a distintos intervalos de horas y se mezclaron en botellas de Polipropileno (Nalgenes®) de una capacidad de 2 galones con 6 Lts de caldo nutritivo diluido (10^{-1}) (6Lts de agua destilada con 6g de caldo nutritivo). Adicional, se prepararon matraces con 1Lt de caldo nutritivo diluido para completar los 7 Lts. Por cada tratamiento bacteriano se prepararon 4 galones (2 nalgenes/trat.) para un total de 14 Lts. A cada botellón de 2 galones se le añadió 160ml de inoculo bacteriano (2 nephelo/botellón). En el Mix se le añadió 240ml de inoculo bacteriano (3 nephelos: 1 de 24h, 1 de 48h y 1 de 96h/botellón).

Durante la inoculación del año 2010, se utilizó un control positivo que consistió de caldo nutritivo diluido. Para este tratamiento se prepararon 4 galones (2 nalgenes/trat.) para un total de 14 Lts. En la inoculación del año 2011, se utilizó un control negativo, donde no se aplicó nada.

En la tercera inoculación del 2011, se aumentó la cantidad del inoculo bacteriano de 320ml a 400ml por cada tratamiento bacteriano, o sea que se usó 100ml por nephelos ya que la altura de los árboles aumentó (De 14 Lts a 16 Lts) (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Fechas de las inoculaciones realizadas por año y el volumen aplicado de cada especie bacteriana.

Año	Especie	Primera Inoculación	Vol. aplicado	Segunda Inoculación	Vol. aplicado	Tercera Inoculación	Vol. aplicado
2010	Bt 3971	Marzo 13	14 Lts	Marzo 23	14 Lts	-	
	Bp4185	Marzo 19	14 Lts	Mayo 3	14 Lts	-	
2011	Bt3971	Marzo 16	14 Lts	Abril 6	14 Lts	Junio 8*	16 Lts
	Bp4185	Marzo 30	14 Lts	Abril 13	14 Lts	Junio 15*	16 Lts

* Se prepararon botellas de polipropileno (Nalgenes®) con capacidad de 2 galones con 8 Lts (1Lt de Buffer PO₄, pH 7.0 y 7 Lts de agua destilada y caldo nutritivo).

En la aplicación se utilizó un equipo de CO₂ a una presión constante de 30 PSI. Los inóculos bacterianos se colocaron en tanques de acero inoxidable de 5 galones. Para asperjar se utilizó una lanza con una boquilla de bronce marca Tee Jet del tipo cónica sólida (TG-2) (Figura 3.1: A y B). Se seleccionaron 9 árboles por tratamiento/replicado donde se aplicó 259.25ml/árbol por 14 segundos cubriendo todo la superficie del árbol.

Por cada bacteria se utilizó un diseño de bloques al azar con 5 tratamientos y 6 replicados. Los tratamientos con Bt utilizados fue el #1 Bt 3971 de 96h, #2 Bt 3971 48h, #3 Bt 3971 24h, #4 Bt Mix, #5 Control. Los tratamientos con Bp utilizados fue el #6 Bp 4185 9h, #7 Bp 18h, #8 Bp 36h, #9 Bp Mix, y #10 Control.

3.2.3 Sobrevivencia de bacterias en tejidos de corteza y frutos de árboles de cafeto

Durante los años 2010 y 2011, se realizaron colectas de tejidos de la corteza (12 muestras al azar) para determinar la sobrevivencia de los cultivos bajo condiciones de campo. Se determinaron las poblaciones bacterianas presentes antes (Monitoreo 1) y después de la inoculación. Se hizo un corte de 1pulgada en la rama del árbol a 3 pies de altura sobre el suelo utilizando un bisturí estéril. Se colocaron en bolsas plásticas y se llevaron al laboratorio. Los tejidos se cortaron en pedazos de aproximadamente 0.4cm de diámetro y se colocaron en tubos de 9ml con caldo nutritivo (NB) para realizar diluciones. Las diluciones en serie se hicieron hasta la 10⁻¹⁰. Luego, se transfirió 0.1ml (100µl) a placas con NA con 2% de ciclohexamida donde se

realizaron conteos de colonias bacterianas presentes y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/mL).

Después de la primera inoculación se realizó un monitoreo de tejidos de corteza a los 14 días para determinar la sobrevivencia de las bacterias inoculadas (Figura 3.2: A). Se utilizaron 2 réplicas de cada especie bacteriana (*B. thuringiensis* y *B. pumilus*) cada una con sus cinco tratamientos. Se tomó por cada parcela un total de 8 tejidos (un tejido por árbol) de aproximadamente 1 pulgada. Se procedió igual al método descrito anteriormente para diluciones y conteo. Por cada muestra se realizaron 3 repeticiones, incluyendo un control de laboratorio y un control interior de Bt y Bp. Los resultados obtenidos del cálculo de UFC/ml fueron elevados a Logaritmo en base 10 para realizar los análisis estadísticos de ANOVA en un DBCA y DMS para contrastar las bacterias de diferente pigmentación y las bacterias con potencial a *Bacillus*. Se realizó un segundo monitoreo de tejidos de la corteza luego de la segunda inoculación de las cepas bacterianas. Luego de la tercera inoculación se realizaron dos monitores adicionales, (en el año 2011) con los frutos de los cafetos utilizando el mismo procedimiento de tejidos de corteza (Figura 3.2: B).

Una vez las colonias bacterianas emergieron, se purificaron y clasificaron por tamaño, morfología, configuración, margen, elevación y color (Figura 3.2: C-D). También, se realizaron pruebas bioquímicas de KOH y tinción diferencial a todas las colonias de color blanca y cremosa con potencial de ser *Bacillus* (Figura 3.2: E). Se aisló cada colonia bacteriana diferente y se colocaron en viales con 2.5 de NA sólido y en viales con 1ml de salicífica para preservarlas en refrigeración hasta el momento de iniciar los trabajos de identificación.



Figura 3.1. A y B) Aplicación de las bacterias Bt 3971 y Bp 4185 mediante bomba con CO₂ en árboles de café en Adjuntas, Puerto Rico.

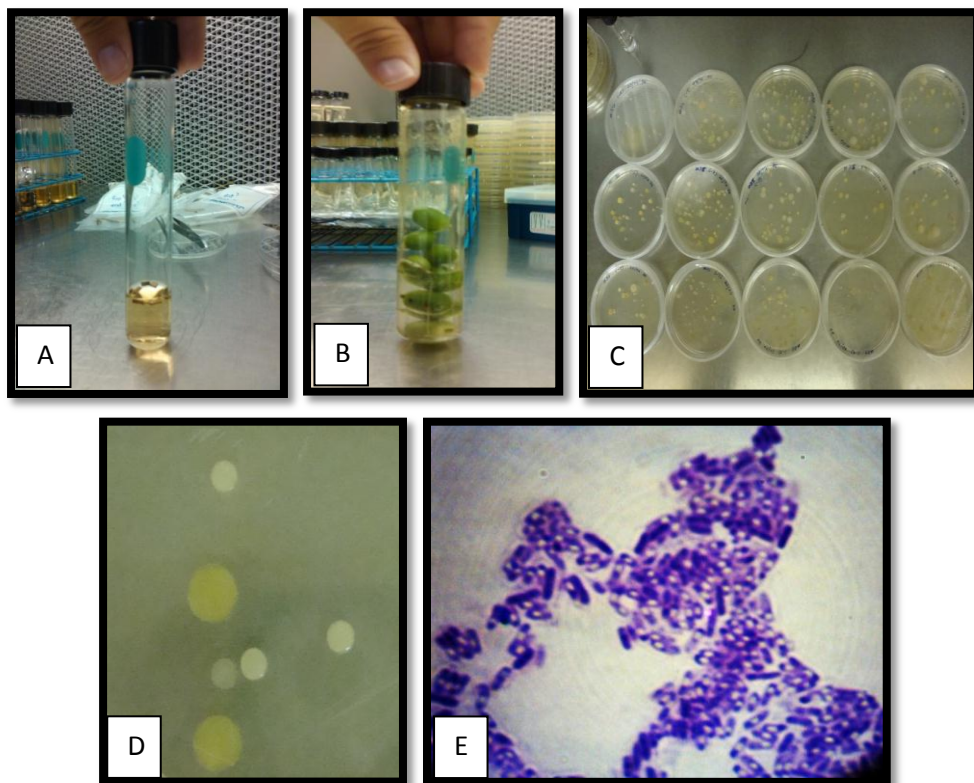


Figura 3.2. A) Tejidos de corteza en caldo nutritivo de árboles de café; B) Frutos de café en caldo nutritivo; C-D) Crecimiento de colonias de diferente pigmentación; E) Bacteria Gram positiva con esporas.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sobrevivencia bacteriana de las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus pumilus* aplicadas en árboles de cafeto bajo condiciones de campo se determinó durante los años 2010 y 2011.

MONITOREOS: 2010

Monitoreo 1 (Corteza, 2010, marzo 10): Se realizaron dos monitoreos de tejidos de la corteza y dos monitoreos de los frutos de árboles de cafetos. El monitoreo 1 (corteza; 2010, marzo 10) se realizó para determinar las poblaciones normales presentes en árboles de cafeto antes de inocular las cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus*. Se muestrearon 12 muestras de tejido de la corteza de los 2 predios experimentales (6 replicados para Bt y 6 replicados para Bp) como se muestra en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2: Muestras de tejido de la corteza de árboles de cafetos seleccionadas para determinar las población bacteriana presente en los predio.

Especie a usar	Replicado	No. Tratamiento a ser aplicado
Bt	1	2
Bt	2	5
Bt	3	3
Bt	4	2
Bt	5	3
Bt	6	4
Bp	1	6
Bp	2	7
Bp	3	9
Bp	4	7
Bp	5	9
Bp	6	10

A las muestras colectadas se les calculó el número de UFC por ml mediante un conteo de colonias de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} para determinar el índice poblacional de las bacterias presentes en los predios. El índice poblacional obtenido de las UFC/ml de las bacterias de diferente pigmentación fue de logaritmo 10.60 en el predio de Bt. En el predio de Bp las

poblaciones bacterianas fue de logaritmo 10.74 (Cuadro 3.3). Mediante la observación de los logaritmos en el Cuadro 3.3 es indicativo de que las poblaciones bacterianas totales antes de la inoculación eran relativamente altas. En el monitoreo 1 (corteza, 2010, marzo 10) se obtuvo un total de 72 colonias de diferente pigmentación y diferentes características morfológicas.

Cuadro 3.3: Monitoreo 1: Corteza; 2010, marzo 10. Población bacteriana total presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de marzo antes de la primera inoculación.

Bacterias a inocular	Rep. Campo	Dilución	UFC/ml	Log10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bt	2	10 ⁻⁹	4.96E+12	12.695	
Bt	3	10 ⁻⁸	5.00E+09	9.699	
Bt	4	10 ⁻⁸	1.80E+10	10.255	10.60
Bt	5	10 ⁻⁷	1.00E+09	9.000	
Bt	6	10 ⁻⁹	3.00E+10	10.477	
Bp	1	10 ⁻⁹	3.00E+10	10.477	
Bp	2	10 ⁻¹⁰	7.70E+12	12.886	
Bp	3	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.602	10.74
Bp	4	10 ⁻⁶	1.00E+07	7.000	
Bp	5	10 ⁻⁹	3.00E+10	10.477	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	1.00E+12	12.000	

Dentro del grupo de colonias de diferente pigmentación se aislaron colonias de pigmentación blanca tipo *Bacillus*. El índice poblacional de bacterias con pigmentación blanca del predio de Bt fue logaritmo de 8.52. En el predio de Bp las poblaciones fueron de logaritmo 9.62 (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4: Monitoreo 1: Corteza; 2010, marzo 10. Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de marzo antes de la primera inoculación.

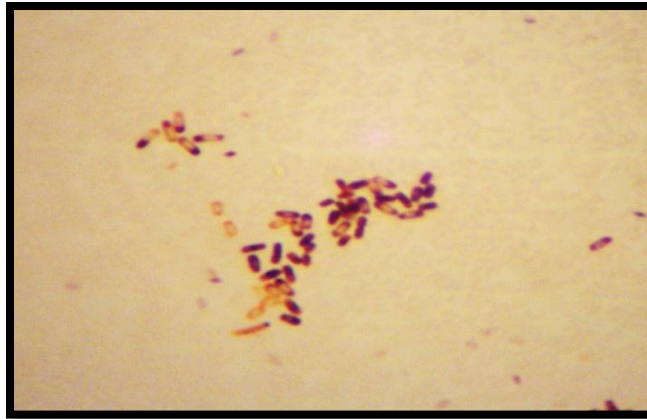
Bacterias a inocular	Rep. Campo	Dilución	UFC/ml	LOG10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻⁶	3.00E+07	7.477	
Bt	2	10 ⁻⁹	4.96E+12	12.695	
Bt	3	10 ⁻⁸	5.00E+09	9.698	
Bt	4	10 ⁻⁸	1.80E+10	10.255	8.52
Bt	5	10 ⁻¹⁰	1.00E+11	11.000	
Bt	6	10 ⁻⁶	0.00E+00	0.000	
Bp	1	10 ⁻⁹	2.00E+10	10.301	
Bp	2	10 ⁻⁶	2.14E+09	9.330	
Bp	3	10 ⁻⁹	3.00E+10	10.477	9.62
Bp	4	10 ⁻⁹	2.00E+10	10.301	
Bp	5	10 ⁻⁶	7.00E+07	7.845	
Bp	6	10 ⁻⁸	3.00E+09	9.477	

En el Cuadro 3.5 un total de 16 bacterias aisladas de tejido de corteza fueron bacilo gram positivas y 13 tenían presencia de esporas concéntricas dentro de las células (Figura 3.3).

Cuadro 3.5: Monitoreo 1: Corteza; 2010, marzo 10. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos en el monitoreo 1 antes de la primera inoculación realizado en el mes de marzo 2010.

No. Registro	Rep. Campo	Trat. Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6511	1	2	10 ⁻⁸	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6524	2	5	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6527	2	5	10 ⁻⁶	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6526	2	5	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6525	2	5	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6517	2	7	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6528	2	7	10 ⁻⁹	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6530	3	3	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6543	3	3	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6531	3	9	10 ⁻⁶	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6536	4	2	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6547	4	2	10 ⁻⁸	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6535	4	7	10 ⁻⁹	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6518	5	3	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6537	5	3	10 ⁻⁹	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6540	5	9	10 ⁻⁶	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo

Figura 3.3: Microscopía de luz de células con morfología tipo bacilo gram positiva y presencia de esporas concéntricas.



Monitoreo 2 (Corteza; 2010, abril 21): En el monitoreo 2 de tejidos de la corteza realizado después de la primera inoculación con las cepas *B. thuringiensis* y *B. pumilus*. Se determinó el UFC/ml de las poblaciones bacterianas presentes después de la aplicación. La población bacteriana para el predio de Bt, tuvo media logarítmica de 11.74 y en el predio de Bp la media logarítmica fue 11.69 (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6. Monitoreo 2: Corteza; 2010, abril 21. Población bacteriana total presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de abril después de la primera inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. Campo	Dilución	UFC/ml	LOG10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.602	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	6.00E+11	11.778	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	6.00E+11	11.778	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	9.00E+11	11.954	11.74
Bt	3	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.602	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	5.00E+11	11.698	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	3.10E+12	12.491	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	9.00E+11	11.954	11.69
Bp	8	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.602	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	5.00E+11	11.698	
Bp	7	10 ⁻⁹	8.00E+10	10.903	

Al contrastarse las poblaciones las medias logarítmicas del monitoreo 1(corteza; 2010, marzo 10) con las del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) se muestra un aumento en las

poblaciones bacterianas presentes después de la primera inoculación. Las poblaciones de diferente pigmentación fueron aisladas y caracterizadas según la morfología de la colonia bacteriana. Se aisló un total de 54 bacterias. La media logarítmica de las poblaciones tipo *Bacillus* fue de 11.04 para el predio de Bt. En el predio de Bp la media logarítmica fue de 11.03 (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7. Monitoreo 2: Corteza; 2010, abril 21. Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de abril después de la primera inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. Campo	Dilución	UFC/ml	Log10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bt	4	10 ⁻⁷	1.30E+09	9.113	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	6.00E+11	11.778	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	7.00E+11	11.845	11.04
Bt	3	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.602	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	3.00E+10	10.477	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	1.10E+12	12.041	
Bp	7	10 ⁻⁹	5.00E+10	10.698	
Bp	10	10 ⁻⁹	4.00E+10	10.602	11.03
Bp	8	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bp	7	10 ⁻⁸	8.00E+09	9.903	

En el monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) de las 54 bacterias aisladas de diferente pigmentación 16 bacterias resultaron ser bacilo gram positivas, KOH negativa y mostraron presencia de esporas (Cuadro 3.8).

Cuadro 3.8: Monitoreo 2: Corteza; 2010, abril 21. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos en el monitoreo 2 después de la primera inoculación realizado en abril, 2010.

No. Registro	Rep. Campo	Trat. Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6548	1	1	10 ⁻⁷	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6549	1	1	10 ⁻¹⁰	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6558	2	4	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6563	2	7	10 ⁻⁸	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6564	3	2	10 ⁻⁹	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6565	3	10	10 ⁻⁶	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6567	4	4	10 ⁻¹⁰	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6570	4	8	10 ⁻⁶	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6571	5	3	10 ⁻⁸	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6573	5	3	10 ⁻⁷	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6575	5	3	10 ⁻⁹	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6576	5	6	10 ⁻⁶	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6577	6	3	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6578	6	3	10 ⁻⁸	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6579	6	3	10 ⁻⁷	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6580	6	3	10 ⁻⁶	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo

Al contrastarse las poblaciones bacterianas del monitoreo 1 con el monitoreo 2 del predio de *B. thuringiensis* se observa un aumento en las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus* después de la inoculación, lo cual resulta un efecto esperado debido a la inoculación de las bacterias.

En las poblaciones bacterianas del predio de Bp en su mayoría aumentaron después de la primera inoculación.

Monitoreo 3 (Frutos; 2010, junio 3): Durante el mes de junio después de la segunda inoculación se realizó un tercer monitoreo colectando frutos de árboles de cafeto. Luego, se determinó el UFC por ml de las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, y 10⁻¹⁰ de las poblaciones bacterianas presentes. La media logarítmica para el predio de Bt fue de 12.38 y 12.23 para el predio de Bp (Cuadro 3.9). Esto es indicativo de que las poblaciones bacterianas en los predios de experimentación aumentaron después de la segunda inoculación de las cepas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus*. Se aislaron y caracterizaron morfológicamente un total de 174 colonias de diferente pigmentación.

Cuadro 3.9: Monitoreo 3: Frutos; 2010, junio 3. Población bacteriana total presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de junio después de la segunda inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. Campo	Dilución	UFC/ml	LOG10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.24E+13	13.09	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	4.10E+12	12.61	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	3.90E+12	12.59	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	1.20E+13	13.08	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	3.17E+12	12.50	
Bt	1	10 ⁻¹⁰	3.43E+12	12.54	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	3.57E+12	12.55	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	5.47E+12	12.74	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	1.53E+12	12.18	12.38
Bt	5	10 ⁻¹⁰	1.33E+12	12.12	
Bt	1	10 ⁻¹⁰	2.43E+12	12.39	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	1.13E+12	12.05	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	3.30E+11	11.52	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	1.53E+12	12.18	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	4.30E+11	11.63	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	1.77E+12	12.25	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	2.03E+12	12.31	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	2.77E+12	12.44	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	2.60E+12	12.41	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.77E+12	12.25	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	2.03E+12	12.31	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	4.90E+12	12.69	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	2.10E+12	12.32	12.23
Bp	9	10 ⁻¹⁰	1.67E+12	12.22	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.80E+12	12.26	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	4.43E+12	12.65	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.60	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	7.00E+11	11.85	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	9.00E+11	11.95	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	7.70E+11	11.89	

Para el monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) la media logarítmica de las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus* para el predio de Bt fue de 11.82 y para el predio de Bp fue de 10.52 (Cuadro 3.10).

Cuadro 3.10: Monitoreo 3: Frutos; 2010, junio 3. Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de junio después de la segunda inoculación.

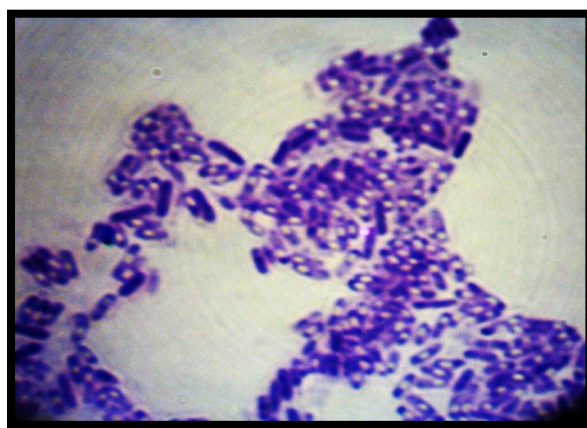
Bacterias inoculadas	Trat. Campo	Dilución	UFC/ml	LOG10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.13E+13	13.05	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	5.13E+12	12.71	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	8.37E+11	11.92	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	2.62E+12	12.41	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	4.85E+10	10.68	11.82
Bt	1	10 ⁻¹⁰	4.30E+11	11.63	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	3.74E+10	10.57	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	2.13E+13	13.32	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	3.40E+11	11.53	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	2.43E+11	11.38	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	7.00E+10	10.84	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	7.03E+10	10.84	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	1.05E+12	12.02	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	2.90E+10	10.46	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	6.02E+09	9.77	10.52
Bp	6	10 ⁻¹⁰	3.43E+10	10.53	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	2.63E+12	12.41	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	5.70E+09	9.75	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	2.07E+10	10.31	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	2.33E+08	8.36	

Dentro del grupo de bacterias de diferente pigmentación (174 aislados) se aislaron un total de 71 bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*. Las 71 bacterias aisladas fueron caracterizadas mediante tinción diferencial, morfología celular y tinción de esporas. Un total de 22 bacterias fueron bacilo gram positivo, KOH negativo y tinción de esporas positivas (Cuadro 3.11). Las esporas se observaron dentro y fuera de las células (Figura 3.4).

Cuadro 3.11: Monitoreo 3: Frutos; 2010, junio 3. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de cafetos en el monitoreo 3 realizado en el mes de junio 2010.

No. de registro	Rep. Campo	Trat. Campo	Dilución	Pigmentación	Gram	KOH	Morfología	Esporas
6582	1	1	10 ⁻⁹	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6583	1	1	10 ⁻⁸	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6587	1	1	10 ⁻⁵	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6614	1	1	10 ⁻¹⁰	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6595	1	3	10 ⁻¹⁰	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6596	1	4	10 ⁻⁷	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6640	1	4	10 ⁻⁸	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6613	1	5	10 ⁻⁷	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6663	3	9	10 ⁻¹⁰	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6674	3	9	10 ⁻⁸	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6676	3	9	10 ⁻¹⁰	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6677	3	10	10 ⁻⁵	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6686	5	4	10 ⁻⁹	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6688	5	4	10 ⁻¹⁰	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6689	5	5	10 ⁻⁷	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6664	5	1	10 ⁻⁹	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6680	4	10	10 ⁻⁷	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6665	6	2	10 ⁻⁷	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6582	1	1	10 ⁻⁹	Crema	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6583	1	1	10 ⁻⁸	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6587	1	1	10 ⁻⁵	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo
6614	1	1	10 ⁻¹⁰	Blanco	Positivo	Negativo	Bacilo	Positivo

Figura 3.4: Células con morfología tipo bacilo gram positiva y presencia de esporas del monitoreo 3 después de la segunda inoculación detectados con microscopía de luz.



Monitoreo 4 (Frutos; 2010, septiembre 2): Se realizó un cuarto monitoreo durante el mes de septiembre 2010 para determinar las poblaciones bacterianas presentes en frutos de café. La media para las poblaciones bacterianas de diferente pigmentación fue de logaritmo 10.48 para el predio de Bt y para el predio de Bp fue de logaritmo 10.68 (Cuadro 3.12).

Cuadro 3.12: Monitoreo 4: Frutos; 2010, septiembre 2. Población bacteriana total presentes en frutos de arboles de cafetos realizado en el mes de septiembre después de la segunda inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. Campo	Dilución	UFC/ml	LOG10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻⁸	7.90E+10	10.90	
Bt	2	10 ⁻⁸	1.25E+10	10.10	
Bt	3	10 ⁻⁸	5.50E+09	9.74	
Bt	4	10 ⁻⁸	4.35E+10	10.64	
Bt	5	10 ⁻⁸	1.85E+10	10.27	10.48
Bt	1	10 ⁻⁸	2.65E+10	10.42	
Bt	2	10 ⁻⁸	7.85E+10	10.89	
Bt	3	10 ⁻⁸	5.30E+10	10.72	
Bt	4	10 ⁻⁸	4.10E+10	10.61	
Bt	5	10 ⁻⁸	3.25E+10	10.51	
Bp	6	10 ⁻⁸	1.00E+11	11.00	
Bp	7	10 ⁻⁸	5.15E+10	10.71	
Bp	8	10 ⁻⁸	3.00E+09	9.48	
Bp	9	10 ⁻⁸	4.90E+10	10.69	
Bp	10	10 ⁻⁸	6.65E+10	10.82	10.68
Bp	6	10 ⁻⁸	8.75E+10	10.94	
Bp	7	10 ⁻⁸	5.55E+10	10.74	
Bp	8	10 ⁻⁸	1.07E+11	11.03	
Bp	9	10 ⁻⁸	4.15E+10	10.62	
Bp	10	10 ⁻⁸	6.25E+10	10.80	

En el caso de las poblaciones bacterianas con pigmentación tipo *Bacillus* la media logarítmica para el predio de Bt fue de 8.67 y para el predio de Bp fue de 10.19. O sea, se observó una disminución en las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus* luego de 6 meses de haberse aplicado las bacterias a los cafetos (Cuadro 3.13).

Cuadro 3.13: Monitoreo 4: Frutos; 2010, septiembre 2. Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en frutos de árboles de cafetos realizado en el mes de septiembre después de la segunda inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. Campo	Dilución	UFC/ml	LOG10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻⁸	3.35E+09	9.53	
Bt	2	10 ⁻⁸	3.04E+09	9.48	
Bt	3	10 ⁻⁸	0.00E+00	0.00	
Bt	4	10 ⁻⁸	1.15E+10	10.06	
Bt	5	10 ⁻⁸	2.75E+09	9.44	8.67
Bt	1	10 ⁻⁸	1.00E+08	8.00	
Bt	2	10 ⁻⁸	2.52E+10	10.40	
Bt	3	10 ⁻⁸	1.48E+10	10.17	
Bt	4	10 ⁻⁸	8.30E+09	9.92	
Bt	5	10 ⁻⁸	5.50E+09	9.74	
Bp	6	10 ⁻⁸	6.75E+10	10.83	
Bp	7	10 ⁻⁸	4.60E+10	10.66	
Bp	8	10 ⁻⁸	1.25E+09	9.10	
Bp	9	10 ⁻⁸	8.50E+09	9.93	
Bp	10	10 ⁻⁸	3.20E+10	10.51	10.19
Bp	6	10 ⁻⁸	1.15E+10	10.06	
Bp	7	10 ⁻⁸	8.90E+10	10.95	
Bp	8	10 ⁻⁸	1.22E+10	10.08	
Bp	9	10 ⁻⁸	6.50E+09	9.81	
Bp	10	10 ⁻⁸	9.50E+09	9.98	

En el monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) se aislaron un total de 75 bacterias de diferente pigmentación. Estas se caracterizaron y se preservaron. Dentro del grupo de las 75 bacterias se aislaron bacterias con pigmentación blanca y cremas tipo *Bacillus*. Estas se caracterizaron según su morfología celular, tinción diferencial y por presencia de esporas. Se identificaron un total de 23 bacterias de las cuales 8 fueron bacilo gram positiva y presentaron formación de esporas (Cuadro 3.14).

Cuadro 3.14: Monitoreo 4: Frutos; 2010, septiembre 2. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de cafetos en el monitoreo 4 realizados en el mes de junio 2010.

No. de registro	Rep. Campo	Trat. Campo	Dilución	Pigmentación	Gram	KOH	Morfología	Esporas
6720	2	4	10 ⁻⁵	Blanca	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6735	2	5	10 ⁻⁵	Crema	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6715	2	5	10 ⁻⁸	Crema	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6758	5	7	10 ⁻⁵	Blanca	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6759	5	7	10 ⁻⁷	Blanca	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6739	5	9	10 ⁻⁷	Blanca	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6721	5	9	10 ⁻⁷	Blanca	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo
6722	2	2	10 ⁻⁷	Blanca	Positiva	Negativa	Bacilo	Positivo

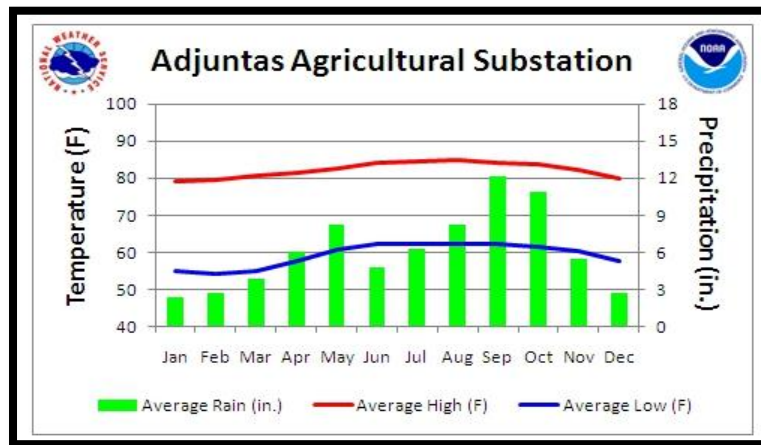
Al compararse las medias de los monitoreos 3 (frutos; 2010, junio 3) y 4 (frutos; 2010, septiembre 2) para contrastar las poblaciones después de la segunda inoculación y después de 5 meses en el predio de Bt estas reflejaron un aumento en las poblaciones bacterianas tanto en las bacterias de diferente pigmentación y las de tipo *Bacillus* durante el mes de junio. En el monitoreo 4, efectuado en septiembre hubo una reducción en las poblaciones bacterianas. Esto es indicativo de que las poblaciones bacterianas disminuyeron a partir del mes de junio cuando se realizó el monitoreo 3. Este hecho se relaciona a un aumento observado en la precipitación (Figura 3.5).

Mediante este dato se puede interpretar que la sobrevivencia de las bacterias Bt y Bp fue positiva durante los meses de abril a junio y que estas sobreviven aún en época de lluvia.

En el predio de Bp al igual que el de Bt se observó un aumento en las poblaciones bacterianas de diferente pigmentación en el mes de junio 2010. En septiembre, hay una leve reducción en las poblaciones bacterianas caracterizándose por niveles similares de bacterias totales y de tipo *Bacillus*.

En general, las reducciones observadas desde el monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) hasta el monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) podría estar relacionado a las continuas lluvias que hubo entre los meses de julio a septiembre. En la figura 3.15 se observa que durante el mes de septiembre fue donde mayor precipitación fue registrada por el servicio nacional de meteorología.

Figura 3.5. Precipitación (pulg.) y temperatura (°F) registrada durante el año 2010 en Adjuntas, Puerto Rico.



Análisis Estadísticos: 2010

Se realizaron análisis comparativos para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de los siguientes monitoreos: monitoreo 2 (tejidos de corteza); los monitoreos 3 y 4 (frutos de cafeto).

En el análisis estadístico del monitoreo 2 de Bt hubo diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos aplicados después de la primera inoculación. Se observaron diferencias significativas en los tratamientos de 96h y el Mix (Cuadro 3.15).

Cuadro 3.15: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias			
96h	11.60	A		
24h	11.65	A	B	
48h	11.78		B	C
Mix	11.87			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0.05)
Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.13744
Error: 0.0050 gl: 8

En el análisis de las bacterias tipo *Bacillus* no hubo diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 3.16).

Cuadro 3.16: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias	
Mix	10.48	A
24h	11.04	A
96h	11.48	A
48h	11.78	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.02559

Error: 1.0912 gl: 8

No se detectaron diferencias significativas entre las diferencias de las poblaciones bacterianas de las bacterias totales y las del tipo *Bacillus* (Cuadro 3.17).

Cuadro 3.17: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2010 abril 21) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
48h	0.00	A
96h	0.13	A
24h	0.61	A
<u>Mix</u>	<u>1.39</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p <= 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.94201

Error: 1.0030 gl: 8

En el análisis de varianza de las bacterias totales no hubo diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 3.18).

Cuadro 3.18: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
36h	11.60	A
18h	11.62	A
9h	11.70	A
<u>Control</u>	<u>11.95</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p <= 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.14291

Error: 0.3233 gl: 8

En el análisis de varianza del monitoreo 2 de las bacterias tipo *Bacillus* no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 3.19).

Cuadro 3.19: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	10.60	A
18h	10.88	A
36h	11.48	A
<u>9h</u>	<u>11.48</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p <= 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.53598

Error: 0.5839 gl: 8

En el análisis estadístico hubo diferencias significativas entre las diferencias de las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del predio de Bp. Se detectaron diferencias en los tratamientos de 36h, 18h y el control de campo (Cuadro 3.20).

Cuadro 3.20: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2010, abril 21) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>		
36h	0.13	A	
9h	0.22	A	
18h	0.74		B
Control	1.35		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.39338

Error: 0.0383 gl: 8

Al igual que los otros monitoreos se realizó un análisis comparativo de ANOVA y DMS para el monitoreo 3. Este se compararon las poblaciones bacterianas de dos replicados de cada cepa bacteriana inoculada utilizando los frutos de los arboles de cafetos. No hubo diferencias entre los replicados y tratamientos (Cuadro 3.21). En el análisis de DMS de las poblaciones bacterianas de diferente pigmentación no se observó diferencias mínimas significativas entre los tratamientos de *B. thuringiensis* de 24h, 48h, 96h, Mix, y el Control de campo.

Cuadro 3.21: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	12.31	A
48h	12.58	A
Mix	12.63	A
24h	12.67	A
96h	12.82	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.80796

Error: 0.0847 gl: 4

En el análisis de las cepas tipo *Bacillus* no se detectó diferencias entre los tratamientos (Cuadro 3.22). No se detectó ninguna diferencia entre las poblaciones tipo *Bacillus* con los tratamientos de Bt de 24h, 48h, 96, Mix y el control de campo (Cuadro 3.22).

Cuadro 3.22: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	11.04	A
48h	11.64	A
Mix	11.97	A
96h	12.34	A
<u>24h</u>	<u>12.63</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.90196
Error: 1.0925 gl: 4

Se compararon las diferencias entre las poblaciones las bacterias totales versus las bacterias tipo *Bacillus*. En el análisis se determinó que no hubo diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas (Cuadro 3.23).

Cuadro 3.23: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
96h	0.48	A
24h	0.63	A
Mix	0.66	A
24h	1.04	A
<u>Control</u>	<u>1.27</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.18726
Error: 0.6206 gl: 4

En el análisis de ANOVA del monitoreo 3 del predio Bp no se detectó diferencias entre los tratamientos (Cuadro 3.24).

Cuadro 3.24: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	12.26	A
9h	12.28	A
Mix	12.32	A
36h	12.38	A
<u>18h</u>	<u>12.50</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.43312
Error: 0.0243 gl: 4

En el análisis de ANOVA de las bacterias tipo *Bacillus* no fue significativo para Bp (Cuadro 3.25).

Cuadro 3.25: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	9.07	A
Mix	10.39	A
9h	10.69	A
36h	10.89	A
18h	11.63	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.84677

Error: 1.0513 gl: 4

Para el análisis comparativo de las diferencias entre las poblaciones de las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del predio de Bp no se detectaron diferencias (Cuadro 3.26).

Cuadro 3.26: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (frutos; 2010, junio 3) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
18h	0.87	A
36h	1.49	A
9h	1.59	A
Mix	1.93	A
Control	3.18	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.54168

Error: 0.8380 gl: 4

En el monitoreo 4 se realizaron análisis estadísticos para comparar las poblaciones bacterianas totales. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.27). El tratamiento de 24h de *B. thuringiensis* fue significativamente menor en el número de bacterias totales versus los tratamientos de 48h, 96h, Mix, y el Control de campo.

Cuadro 3.27: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
24h	9.61	A
48h	10.41	B
Control	10.55	B
Mix	10.67	B
96h	10.95	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.71746

Error: 0.0668 gl: 4

La comparación de las cepas bacterianas tipo *Bacillus* no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.28).

Cuadro 3.28: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias	
24h	5.09	A
96h	8.77	A
Control	9.59	A
48h	9.94	A
Mix	9.99	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=9.19953

Error: 10.9788 gl: 4

En el análisis de las diferencias entre las poblaciones de las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* no hubo diferencias significativas (Cuadro 3.29).

Cuadro 3.29: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias	
48h	0.47	A
Mix	0.68	A
Control	0.96	A
96h	2.19	A
24h	5.22	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=8.45137

Error: 9.2657 gl: 4

En el análisis de las bacterias totales del monitoreo 4 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.30).

Cuadro 3.30: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias	
36h	10.26	A
Mix	10.66	A
18h	10.73	A
Control	10.81	A
9h	10.97	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.38937

Error: 0.2504 gl: 4

Al compararse las poblaciones de bacterias tipo *Bacillus* por tratamientos no hubo diferencias significativas entre estos (Cuadro 3.31).

Cuadro 3.31: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias	
36h	9.59	A
Mix	9.87	A
Control	10.25	A
9h	10.45	A
18h	10.81	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)
Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.36308
Error: 0.2410 gl: 4

Para el análisis estadístico utilizando las diferencias entre las poblaciones de las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* se detectaron diferencias significativas (Cuadro 3.32). Se detectaron diferencias entre los tratamientos de 18h y el Mix; siendo el tratamiento de 18h con menor diferencia entre las poblaciones totales y las del tipo *Bacillus*.

Cuadro 3.32: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2010, septiembre 2) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias		
18h	0.13	A	
9h	0.53	A	B
Control	0.57	A	B
36h	0.67	A	B
Mix	0.79		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0.05)
Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.55285
Error: 0.0396 gl: 4

MONITOREOS: 2011

Durante el año 2011 se realizaron tres inoculaciones con las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus pumilus*. Para este año se realizaron tres monitoreos de tejidos de corteza y dos de frutos de árboles de café.

Monitoreo 1 (Corteza; 2011, marzo 15): El monitoreo 1 (M1) se realizó para determinar las poblaciones normales presentes en árboles de café antes de inocular las cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus*. Se muestrearon 12 muestras de tejido de la corteza de los 2 predios experimentales (6 replicados para Bt y 6 replicados para Bp) como se muestra en el Cuadro 3.33.

Cuadro 3.33: Monitoreo 1. Muestras de tejido de la corteza de árboles de cafetos seleccionadas para determinar la población bacteriana presente en los predios.

Especie a usar	Replicado muestreado	No. de tratamiento a ser aplicado
Bt	1	3
Bt	2	5
Bt	3	4
Bt	4	1
Bt	5	2
Bt	6	3
Bp	1	6
Bp	2	9
Bp	3	8
Bp	4	7
Bp	5	8
Bp	6	10

A las muestras colectadas se les calculó el número de UFC por ml mediante un conteo de colonias de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} para determinar el índice poblacional de las bacterias presentes en los predios. El índice poblacional obtenido de las UFC/ml de las bacterias totales fue la media logarítmica de 10.14 para el predio de Bt. En el predio de Bp las poblaciones bacterianas fueron de 11.43. Mediante la observación de los logaritmos en el Cuadro 3.34 es indicativo de que las poblaciones bacterianas de diferente pigmentación antes de la inoculación eran relativamente altas probablemente a la presencia de las bacterias inoculadas en el 2010.

Cuadro 3.34: Monitoreo 1: Corteza; 2011, marzo 15. Población bacteriana total presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de marzo antes de la primera inoculación.

Bacterias a Inocular	Rep. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10^{-6}	6.50E+06	6.813	
Bt	2	10^{-6}	8.00E+06	6.903	
Bt	3	10^{-10}	3.00E+11	11.477	10.14
Bt	4	10^{-10}	4.50E+11	11.653	
Bt	5	10^{-10}	1.30E+12	12.114	
Bt	6	10^{-10}	8.00E+11	11.903	
Bp	1	10^{-7}	2.00E+08	8.301	
Bp	2	10^{-10}	3.50E+11	11.544	
Bp	3	10^{-10}	1.15E+12	12.061	11.43
Bp	4	10^{-10}	8.40E+12	12.924	
Bp	5	10^{-10}	6.50E+11	11.813	
Bp	6	10^{-10}	9.00E+11	11.954	

En el monitoreo 1 de tejido de corteza se obtuvo un total de 81 colonias de diferente pigmentación y características morfológicas. Se aislaron colonias de pigmentación blanca tipo

Bacillus. El índice poblacional de bacterias tipo *Bacillus* del predio de Bt fue de la media logarítmica de 9.83. En el predio de Bp las poblaciones se fueron de 7.45 (Cuadro 3.35).

Cuadro 3.35: Monitoreo 1: Corteza; 2011, marzo 15). Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos antes de la primera inoculación.

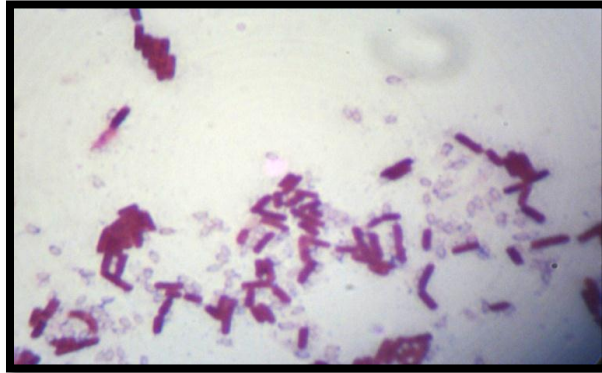
Bacterias a inocular	Rep. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	1	10 ⁻⁶	1.00E+06	6.000	
Bt	2	10 ⁻⁶	1.50E+07	7.176	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	1.50E+11	11.176	9.83
Bt	4	10 ⁻⁶	1.50E+07	7.176	
Bt	5	10 ⁻⁶	1.50E+07	7.176	
Bt	6	10 ⁻⁹	5.00E+09	9.699	
Bp	1	10 ⁻⁸	5.00E+08	8.699	
Bp	2	10 ⁻⁷	1.50E+08	8.176	
Bp	3	10 ⁻⁶	2.50E+07	7.398	7.45
Bp	4	10 ⁻⁶	5.00E+06	6.699	
Bp	5	10 ⁻⁷	5.00E+06	6.699	
Bp	6	10 ⁻⁶	1.00E+07	7.000	

En el Cuadro 3.36 un total de 12 bacterias fueron bacilo gram positivas y 8 de las 12 se observaron esporas dentro de las células (Figura 3.6).

Cuadro 3.36: Monitoreo 1: Corteza; 2011, marzo 15. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos antes de la primera inoculación realizado en el mes de marzo 2011.

No. Registro	Rep. de Campo	Trat. de Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6778	1	3	10 ⁻⁸	Blanca cremoso	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6784	2	5	10 ⁻⁹	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6768	2	5	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6788	3	4	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6787	3	4	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6789	3	8	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6791	4	1	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6773	4	1	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6769	5	2	10 ⁻¹⁰	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6795	6	3	10 ⁻⁹	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6792	6	10	10 ⁻⁶	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6774	6	10	10 ⁻⁶	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo

Figura 3.6: Microscopía de luz de células con morfología tipo bacilo gram positiva y presencia de esporas dentro y fuera de las células.



Monitoreo 2 (Corteza; 2011, marzo 24 (Bt) y abril 11 (Bp): En el monitoreo 2 (M2) de tejidos de la corteza fue realizado después de la primera inoculación de las cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* para determinar la sobrevivencia bacteriana de estas cepas bajo condiciones de campo. La media logarítmica de la población de bacterias totales en el predio de Bt fue de 12.42 (Cuadro 3.37) y en el predio de Bp la media logarítmica fue de 10.44 (Cuadro 3.37). En este caso se refleja un aumento de las poblaciones bacterianas en el predio de Bt al contrastarse la media logarítmica del monitoreo 1 del predio de Bt.

Cuadro 3.37: Monitoreo 2: Corteza; 2011, marzo 24 (Bt) y abril 11 (Bp). Población bacteriana total presente en tejidos de la corteza de árboles de cafetos entre los meses de marzo-abril después de la primera inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	4	10 ⁻¹⁰	3.10E+11	11.49	
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.87E+13	13.27	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	2.23E+12	12.34	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	1.80E+12	12.25	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	2.10E+12	12.32	12.42
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.01E+13	13.00	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	5.50E+12	12.74	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	2.10E+12	12.32	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	3.23E+12	12.50	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	8.00E+11	11.90	
Bp	6	10 ⁻⁵	4.30E+07	7.63	
Bp	7	10 ⁻⁵	3.00E+07	7.47	
Bp	8	10 ⁻⁷	3.00E+08	8.47	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	3.70E+11	11.56	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.17E+12	12.06	10.44
Bp	6	10 ⁻¹⁰	4.70E+11	11.67	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	4.00E+11	11.60	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	3.70E+11	11.56	
Bp	9	10 ⁻⁹	3.70E+10	10.56	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	6.70E+11	11.82	

Las poblaciones de diferente pigmentación fueron aisladas y caracterizadas según la morfología de la colonia bacteriana. Se aisló un total de 53 bacterias entre los predios de Bt y Bp. La media de las bacterias con pigmentación blanca y crema tipo *Bacillus* fue de logaritmo 8.53 para el predio de Bt (Cuadro 3.38). En el predio de Bp la media fue de logaritmo 6.26 (Cuadro 3.38). Al contrastarse las medias logarítmicas del monitoreo 1 con las medias logarítmicas del monitoreo 2 se observó un aumento en las poblaciones bacterianas del predio de Bt mientras que en el predio de Bp se observa una reducción de las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus* con los tratamientos de 9h, 18h y 36 h.

Cuadro 3.38: Monitoreo 2: Corteza; 2011, marzo 24 (Bt) y abril 11 (Bp). Población bacteriana de tipo *Bacillus* presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos entre los meses de marzo-abril después de la primera inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	4	10 ⁻¹⁰	5.30E+11	11.724	
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.53E+12	12.185	
Bt	2	10 ⁻⁸	3.30E+09	9.519	
Bt	5	10 ⁻⁵	0.00E+00	0.000	
Bt	3	10 ⁻⁹	2.63E+11	11.420	8.53
Bt	1	10 ⁻⁹	4.70E+10	10.672	
Bt	2	10 ⁻⁵	3.00E+05	5.477	
Bt	3	10 ⁻⁵	1.30E+06	6.114	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bt	5	10 ⁻⁵	5.30E+06	6.724	
Bp	6	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	
Bp	7	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	
Bp	8	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	
Bp	9	10 ⁻⁵	2.00E+06	6.301	
Bp	10	10 ⁻⁷	3.70E+08	8.568	6.26
Bp	6	10 ⁻⁵	2.00E+06	6.301	
Bp	7	10 ⁻⁵	3.00E+06	6.477	
Bp	8	10 ⁻⁵	0.00E+00	0.000	
Bp	9	10 ⁻⁵	2.70E+06	6.431	
Bp	10	10 ⁻⁹	3.70E+10	10.568	

En el monitoreo 2 (corteza, 2011) de las 54 bacterias aisladas 7 bacterias resultaron ser bacilo gram positivas, KOH negativa y mostraron presencia de esporas (Cuadro 3.39).

Cuadro 3.39: Monitoreo 2: Corteza; 2011, marzo 24 (Bt) y abril 11 (Bp). Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos realizado después de la primera inoculación entre los meses de marzo-abril.

No. Registro	Rep. de Campo	Trat. de Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6796	3	4	10 ⁻¹⁰	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6805	3	1	10 ⁻¹⁰	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6806	3	2	10 ⁻⁵	Blanco	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6815	3	3	10 ⁻¹⁰	Blanco Cremoso	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6817	4	1	10 ⁻¹⁰	Blanco Cremoso	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6816	4	5	10 ⁻⁹	Blanco Cremoso	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6820	3	7	10 ⁻⁷	Blanco Cremoso	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6798	3	10	10 ⁻⁵	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo

Monitoreo 3 (Corteza; 2011 mayo 4 (Bt) y 11 (Bp)): Durante el mes de mayo 2011 se realizó un tercer monitoreo (M3) de tejidos de corteza de árboles de cafeto después de la 2da inoculación. La media logarítmica de las bacterias totales para el predio de Bt fue de 12.46 y para Bp fue de 12.28 observándose un aumento de las poblaciones bacterianas (Cuadro 3.40).

Cuadro 3.40: Monitoreo 3: Corteza; 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp). Población bacteriana total presente en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de mayo después de la segunda inoculación.

Bacterias inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media logarítmica
Bt	4	10 ⁻¹⁰	4.40E+12	12.643	
Bt	1	10 ⁻¹⁰	5.00E+12	12.699	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	4.07E+12	12.610	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	1.50E+12	12.176	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	4.70E+11	11.672	12.46
Bt	1	10 ⁻¹⁰	7.40E+12	12.869	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	1.93E+12	12.286	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	8.70E+11	11.940	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	5.07E+12	12.705	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	9.80E+12	12.991	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	7.00E+11	11.845	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	1.13E+12	12.053	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	2.97E+12	12.473	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	2.73E+12	12.436	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.10E+12	12.041	12.28
Bp	6	10 ⁻¹⁰	1.00E+12	12.000	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	2.70E+12	12.431	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	2.63E+12	12.420	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	2.10E+12	12.322	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	5.37E+12	12.730	

En las bacterias tipo *Bacillus* se observó un aumento en las poblaciones bacterianas con una media logarítmica 9.58 en el predio de Bt y 10.21 en el predio de Bp (Cuadro 3.41). Esto es indicativo de que las poblaciones bacterianas en ambos predios aumentaron luego de la 2da inoculación.

Cuadro 3.41: Monitoreo 3: Corteza; 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp). Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en tejido de la corteza de árboles de cafetos en el mes de mayo después de la segunda inoculación.

Bacterias Inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media Logarítmica
Bt	1	10 ⁻⁸	3.00E+09	9.477	
Bt	2	10 ⁻⁸	3.70E+09	9.568	
Bt	3	10 ⁻⁸	2.70E+09	9.431	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bt	5	10 ⁻⁸	7.00E+08	8.845	9.58
Bt	1	10 ⁻⁸	2.00E+09	9.301	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	4.30E+11	11.633	
Bt	3	10 ⁻⁹	4.30E+10	10.633	
Bt	4	10 ⁻⁸	2.30E+09	9.362	
Bt	5	10 ⁻⁵	1.30E+06	6.114	
Bp	6	10 ⁻⁸	1.30E+09	9.114	
Bp	7	10 ⁻⁵	1.70E+06	6.230	
Bp	8	10 ⁻⁹	2.30E+10	10.362	
Bp	9	10 ⁻⁹	4.70E+10	10.672	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.70E+11	11.230	10.21
Bp	6	10 ⁻¹⁰	1.00E+11	11.000	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	1.70E+11	11.230	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	3.30E+11	11.519	
Bp	9	10 ⁻⁷	1.20E+09	9.079	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	4.70E+11	11.672	

En el monitoreo 3 (corteza, 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp)) se aislaron un total de 80 bacterias de tejido de corteza 46 de los aislados tenían pigmentación blanca, blanca cremosa y crema. De estas un total de 25 bacterias fueron KOH negativo y tinción gram positiva y solo dos bacterias mostraron presencia de esporas (Cuadro 3.42).

Cuadro 3.42: Monitoreo 3; Corteza; 2011, mayo 4 (Bt) y 11 (Bp). Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en tejidos de la corteza de árboles de cafetos realizados después de la segunda inoculación en el mes de mayo 2011.

No. Colonia Aislada	Rep. de Campo	Trat. de Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6826	2	3	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6836	2	4	10 ⁻¹⁰	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6827	2	4	10 ⁻⁹	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6837	2	5	10 ⁻¹⁰	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6838	4	1	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6839	4	1	10 ⁻⁵	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6828	4	1	10 ⁻⁹	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6840	4	2	10 ⁻¹⁰	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6841	4	2	10 ⁻¹⁰	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6842	4	4	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6880	2	6	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6881	2	6	10 ⁻⁷	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6873	2	7	10 ⁻⁹	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6883	2	7	10 ⁻⁹	Blanco cremoso	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6844	2	8	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6885	2	9	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6830	2	9	10 ⁻⁷	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6831	2	10	10 ⁻⁵	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6832	5	6	10 ⁻⁵	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6884	5	8	10 ⁻⁹	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6834	5	8	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6845	5	8	10 ⁻⁹	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6846	5	10	10 ⁻¹⁰	Crema	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6887	5	10	10 ⁻⁹	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6867	5	10	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo

Monitoreo 4 (Frutos; 2011, junio 20): El monitoreo 4 (M4) fue realizado después de la 3era inoculación durante el mes de junio 2011 en la cual se muestrearon frutos de árboles de cafeto y se determinó el UFC de las poblaciones bacterianas presentes. La media logarítmica de las poblaciones de bacterias totales para el predio de Bt fue de 12.24 y para el predio de Bp fue de 13.08 (Cuadro 3.43). En este caso se refleja un aumento de las poblaciones bacterianas en el predio de Bp al contrastarse la media logarítmica del monitoreo 3 (M3) del predio de Bp.

Cuadro 3.43: Monitoreo 4: Frutos; 2011, junio 20. Población bacteriana total presente en frutos de árboles de cafetos en el mes de junio después de la tercera inoculación.

Bacterias Inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media Logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	6.50E+12	12.813	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	3.40E+12	12.531	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	6.50E+12	12.813	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	2.40E+12	12.380	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	4.50E+11	11.653	12.24
Bt	1	10 ⁻¹⁰	2.90E+12	12.462	
Bt	2	10 ⁻¹⁰	2.30E+12	12.362	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	3.50E+11	11.544	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	6.50E+11	11.813	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	1.05E+12	12.021	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	1.33E+13	13.122	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	2.78E+13	13.444	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	2.96E+13	13.471	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	3.74E+13	13.573	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	7.55E+12	12.878	13.08
Bp	6	10 ⁻¹⁰	5.55E+12	12.744	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	3.67E+12	12.565	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	7.13E+12	12.853	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	1.19E+13	13.074	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.24E+13	13.093	

Mientras que en las poblaciones tipo *Bacillus* para el predio de Bt se observó una media logarítmica de 8.89 y para Bp de 13.07 (Cuadro 3.44).

Cuadro 3.44: Monitoreo 4: Frutos; 2011, junio 20. Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en frutos de árboles de cafetos en el mes de junio después de la tercera inoculación.

Bacterias Inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media Logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.05E+12	12.021	
Bt	2	10 ⁻⁹	4.50E+10	10.653	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	4.35E+12	12.638	
Bt	4	10 ⁻⁸	3.50E+09	9.544	
Bt	5	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	8.89
Bt	1	10 ⁻¹⁰	5.00E+11	11.699	
Bt	2	10 ⁻⁵	1.50E+06	6.176	
Bt	3	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	
Bt	4	10 ⁻⁷	1.50E+08	8.176	
Bt	5	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	1.33E+13	13.122	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	2.34E+13	13.369	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	2.48E+13	13.394	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	3.32E+13	13.521	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	5.55E+12	12.744	13.07
Bp	6	10 ⁻¹⁰	4.70E+12	12.672	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	5.20E+12	12.716	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	7.95E+12	12.900	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	1.26E+13	13.100	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.66E+13	13.220	

Las medias del monitoreo 4 de frutos de arboles de cafeto (2011, junio 20) fueron comparadas con las del monitoreo 3 de tejidos de la corteza (2011, mayo 4 (Bt) y 11(Bp)); y se observó una reducción en las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus* después de la 3era inoculación en el predio de *B. thuringiensis* (Bt). Sin embargo, esta reducción se refleja en el control de campo y no en los tratamientos inoculados con Bt. Aunque en el replicado 2 del monitoreo 4 (M4) de Bt se observa una reducción en los tratamientos de 3 (24h) y 2 (48h). Mientras que en el predio de *B. pumilus* las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus* aumentaron.

De las muestras de frutos de arboles de cafeto del monitoreo 4 (Frutos; 2011, junio 20) se aislaron un total de 73 bacterias de diferente pigmentación. De los 80 aislados 23 presentaban pigmentación blanca, blanca cremosa y crema. A estas bacterias se les caracterizó morfológicamente y se les realizaron las pruebas de KOH y Tinción diferencial. De las 23 bacterias 3 de ellas fueron KOH negativo y gram positiva (Cuadro 3.45).

Cuadro 3.45: Monitoreo 4: Frutos; 2011, junio 20. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de árboles de cafetos realizados después de la tercera inoculación en el mes de junio 2011.

No. Colonia Aislada	Rep. de Campo	Trat. de Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6914	1	2	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6921	2	5	10 ⁻¹⁰	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6924	1	7	10 ⁻⁵	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo

Monitoreo 5 (Frutos; 2011, septiembre 6): El monitoreo 5 (M5) fue realizado después de la tercera inoculación durante el mes de septiembre 2011 en la cual se muestrearon frutos de cafeto y se determinó el UFC de las poblaciones bacterianas presentes. La media logarítmica de las bacterias totales para el predio de Bt fue de 11.87 y para el predio de Bp fue de 11.13 (Cuadro 3.46). En este caso se refleja una reducción de las poblaciones bacterianas en los predios de Bt y Bp al contrastarse las medias logarítmicas del monitoreo 4 (M4).

Cuadro 3.46: Monitoreo 5: Frutos; 2011, septiembre 6. Población bacteriana total presente en frutos de árboles de cafetos en el mes de septiembre después de la tercera inoculación.

Bacterias Inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media Logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.75E+12	12.243	
Bt	2	10 ⁻⁹	7.50E+10	10.875	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	2.90E+12	12.462	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	2.95E+12	12.470	
Bt	5	10 ⁻⁹	3.50E+10	10.544	
Bt	1	10 ⁻⁹	2.90E+11	11.462	11.87
Bt	2	10 ⁻¹⁰	2.00E+12	12.301	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	1.35E+12	12.130	
Bt	4	10 ⁻¹⁰	1.40E+12	12.146	
Bt	5	10 ⁻¹⁰	1.70E+12	12.230	
Bp	6	10 ⁻¹⁰	5.65E+12	12.752	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	3.10E+12	12.491	
Bp	8	10 ⁻⁷	2.00E+09	9.301	
Bp	9	10 ⁻⁵	3.20E+07	7.505	
Bp	10	10 ⁻⁹	1.55E+11	11.190	
Bp	6	10 ⁻⁸	3.40E+10	10.531	11.13
Bp	7	10 ⁻¹⁰	9.50E+11	11.978	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	1.35E+12	12.130	
Bp	9	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	8.50E+11	11.929	

Mientras que en las poblaciones tipo *Bacillus* para el predio de Bt la media logarítmica fue de 9.97 y para Bp de 8.78 (Cuadro 3.47). Al compararse con las medias del monitoreo 4 se observa un aumento en las poblaciones de bacterianas del predio de Bt. En el predio de Bp se observa una reducción en la media de las poblaciones bacterianas tipo *Bacillus*.

Cuadro 3.47: Monitoreo 5: Frutos; 2011, septiembre 6. Población bacteriana tipo *Bacillus* presentes en frutos de árboles de cafetos en el mes de septiembre después de la tercera inoculación.

Bacterias Inoculadas	Trat. de Campo	Dilución	UFC/ml	Log 10 (UFC/ml)	Media Logarítmica
Bt	1	10 ⁻¹⁰	1.20E+12	10.176	
Bt	2	10 ⁻⁹	3.50E+10	7.550	
Bt	3	10 ⁻¹⁰	1.70E+12	12.230	
Bt	4	10 ⁻⁸	7.50E+09	7.079	
Bt	5	10 ⁻⁷	4.55E+09	9.658	
Bt	1	10 ⁻¹⁰	5.80E+12	9.966	9.97
Bt	2	10 ⁻⁵	5.00E+10	10.699	
Bt	3	10 ⁻⁹	8.00E+10	10.217	
Bt	4	10 ⁻⁵	5.00E+05	5.699	
Bt	5	10 ⁻⁷	1.00E+08	5.699	
Bp	6	10 ⁻⁵	2.35E+07	7.371	
Bp	7	10 ⁻¹⁰	3.00E+11	11.477	
Bp	8	10 ⁻¹⁰	4.85E+12	12.686	
Bp	9	10 ⁻⁸	4.15E+10	10.618	
Bp	10	10 ⁻¹⁰	1.80E+12	12.255	8.78
Bp	6	10 ⁻⁷	7.00E+08	8.845	
Bp	7	10 ⁻⁵	5.00E+06	6.699	
Bp	8	10 ⁻⁵	5.00E+05	5.699	
Bp	9	10 ⁻⁵	1.50E+06	6.176	
Bp	10	10 ⁻⁵	1.00E+06	6.000	

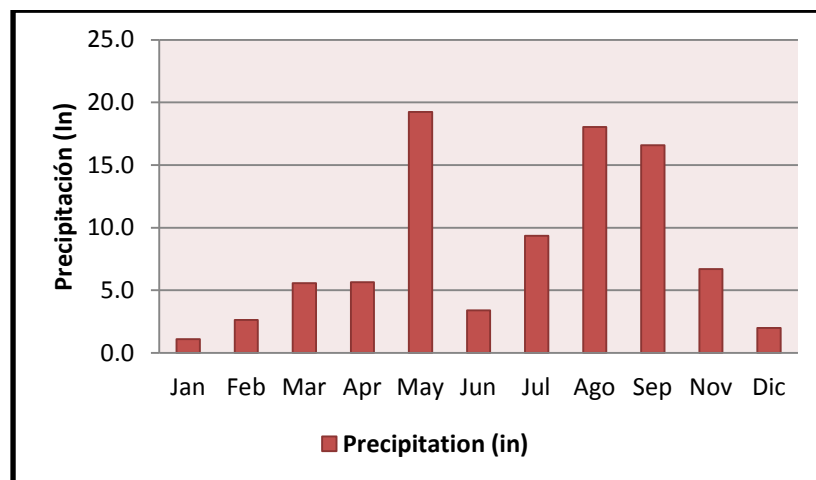
De las 20 muestras se aislaron un total de 73 bacterias a las cuales se les realizó la prueba KOH y tinción diferencial aquellas que presentaban pigmentación blanca, blanca cremosa y crema. De los 73 aislados 26 bacterias poseían pigmentación blanca, blanco cremoso y crema. De estas 26 bacterias 5 fueron KOH negativo y Gram positivas (Cuadro 3.48).

Cuadro 3.48: Monitoreo 5: Frutos; 2011, septiembre 6. Caracterización de bacterias con pigmentación tipo *Bacillus*: tinción diferencial, morfología celular y presencia de esporas detectadas en frutos de árboles de cafetos realizados después de la tercera inoculación en el mes de septiembre 2011.

No. Colonia Aislada	Rep. de Campo	Trat. de Campo	Dilución	Pigmentación	KOH	Gram	Morfología	Esporas
6941	1	1	10 ⁻⁸	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6944	1	2	10 ⁻¹⁰	Blanca	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6935	2	5	10 ⁻¹⁰	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo
6962	1	7	10 ⁻¹⁰	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Positivo
6963	1	8	10 ⁻⁵	Blanca cremosa	Negativo	Positivo	Bacilo	Negativo

Durante el monitoreo realizado de frutos de cafeto en el mes de septiembre 2011 se observó una reducción en las poblaciones totales en los predio de Bt y Bp. Sin embargo, las poblaciones de *Bacillus* fueron mayores a las totales. Esta reducción de las poblaciones totales de ambos predios probablemente esté relacionada a la alta precipitación registrada por la EEA-Adjuntas en el 2011 durante los meses de agosto y septiembre (Figura 3.7).

Figura 3.7. Gráfica de precipitación en la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas, Puerto Rico durante el año 2011.



Análisis Estadísticos: 2011

Se realizaron análisis comparativos para determinar diferencias significativas entre los tratamientos para los siguientes monitoreos: monitoreos 2 y 3 de tejidos de corteza; y los monitoreos 4 y 5 de frutos de cafetos.

En los análisis comparativos del monitoreo 2 se observó diferencias entre las medias de los tratamientos bacterianos después de la primera inoculación. En el análisis comparativo de la diferencia mínima significativa (DMS) refleja diferencias entre las medias de los tratamientos de Mix y 96h después de la 1era inoculación (Cuadro 3.49).

Cuadro 3.49: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2011, marzo 24) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>		
Mix	12.00	A	
Control	12.08	A	B
24h	12.32	A	B
48h	12.54	A	B
96h	13.14		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.10189
Error: 0.1575 gl: 4

En el análisis estadístico de las bacterias tipo *Bacillus* M2 no se reflejaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos después de la primera inoculación (Cuadro 3.50).

Cuadro 3.50: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2011, marzo 24) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	3.36	A
48h	7.50	A
24h	8.77	A
96h	11.43	A
<u>Mix</u>	<u>11.60</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=9.21940
Error: 11.0262 gl: 4

Se realizó un análisis comparativo de las diferencias reflejadas entre las bacterias totales M2 y las bacterias tipo *Bacillus* para observar diferencias significativas. Sin embargo, no se observó diferencias significativas entre las medias de los tratamientos después de la primera inoculación (Cuadro 3.51).

Cuadro 3.51: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2011, marzo 24) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	
Mix	0.63	A
96h	1.71	A
24h	3.56	A
48h	5.05	A
<u>Control</u>	<u>8.72</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=9.60350
Error: 11.9641 gl: 4

Para el análisis de ANOVA de los tratamientos con *B. pumilus* no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.52).

Cuadro 3.52: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 2 (corteza; 2011, abril 11) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
18h	9.54	A
9h	9.65	A
36h	10.02	A
Mix	11.07	A
<u>Control</u>	<u>11.95</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05).
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.79791
Error: 2.9862 gl: 4

En el análisis de ANOVA para las bacterias tipo *Bacillus* del M2 hubo diferencias significativas entre los tratamientos de Bp de 36h versus el control (Cuadro 3.53).

Cuadro 3.53: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2011, abril 11) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>		
36h	3.00	A	
9h	6.15	A	B
18h	6.24	A	B
Mix	6.37	A	B
<u>Control</u>	<u>9.57</u>	<u>A</u>	<u>B</u>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.08470
Error: 4.8029 gl: 4

Para el análisis de ANOVA de las diferencias entre las poblaciones bacterianas totales y las bacterias tipo *Bacillus* del M2 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 3.54).

Cuadro 3.54: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 2 (corteza; 2011, abril 11) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias	
Control	2.38	A
18h	3.30	A
9h	3.50	A
Mix	4.71	A
36h	7.03	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=8.88016
Error: 10.2297 gl: 4

Para el monitoreo 3, en el análisis de ANOVA para los tratamientos de las poblaciones totales de predio de Bt no se reflejó diferencias entre los tratamientos de Bt después de la segunda inoculación (Cuadro 3.55). En este caso, no hubo diferencias entre los tratamientos después de la segunda inoculación pero si se observa un aumento de las medias al compararse con las medias del monitoreo 2 de las poblaciones totales de Bt (Cuadro 3.49).

Cuadro 3.55: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 4) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias	
24h	12.28	A
Control	12.33	A
Mix	12.44	A
48h	12.49	A
96h	12.76	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.55013
Error: 0.3117 gl: 4

En el análisis de las cepas tipo *Bacillus* no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.56).

Cuadro 3.56: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 4) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias	
Control	7.48	A
96h	9.39	A
24h	10.03	A
Mix	10.42	A
48h	10.60	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.05394
Error: 2.1319 gl: 4

Se compararon las diferencias entre las poblaciones de bacterias de diferente pigmentación versus las bacterias tipo *Bacillus*. No hubo diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas entre los tratamientos (Cuadro 3.57).

Cuadro 3.57: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 4) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

Tratamientos	Medias	
48h	1.90	A
Mix	2.03	A
24h	2.25	A
96h	3.37	A
Control	4.85	A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.52909
Error: 3.9658 gl: 4

En el análisis de ANOVA del monitoreo 3 del predio Bp no se detectaron diferencias entre los tratamientos bacterianos (Cuadro 3.58).

Cuadro 3.58: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 11) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias	
9h	11.92	A
18h	12.24	A
Mix	12.38	A
Control	12.39	A
36h	12.45	A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.64730
Error: 0.0544 gl: 4

En el análisis de ANOVA de las bacterias tipo *Bacillus* no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.59).

Cuadro 3.59: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 11) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias	n	
48h	8.73	2	A
Mix	9.88	2	A
9h	10.06	2	A
36h	10.94	2	A
Control	11.45	2	A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.72085
Error: 2.8911 gl: 4

Para el análisis comparativo de las diferencias entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* del predio de Bp no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.60).

Cuadro 3.60: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 3 (corteza; 2011, mayo 11) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	0.94	A
36h	1.51	A
9h	1.87	A
Mix	2.51	A
18h	3.51	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.52132
Error: 2.6519 gl: 4

Para el Monitoreo 4 se realizó un análisis comparativo para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos de las bacterias totales del predio de Bt. Mediante el ANOVA se observa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.61).

Cuadro 3.61: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	11.84	A
Mix	12.10	A
24h	12.18	A
48h	12.45	A
96h	12.64	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.17328
Error: 0.1786 gl: 4

En el análisis de ANOVA de las bacterias tipo *Bacillus* del predio de Bt, hubo diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos para las poblaciones de *Bacillus* (Cuadro 3.62). En este caso, los tratamientos bacterianos de 96h muestran unas poblaciones mayores de bacterias *Bacillus* versus el control.

Cuadro 3.62: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	6.00	A
48h	8.41	A B
Mix	8.86	A B
24h	9.32	A B
96h	11.86	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.66355
Error: 4.1610 gl: 4

Mediante las diferencias de las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* se realizó un análisis comparativo para determinar las diferencias entre ambas poblaciones. No se detectaron diferencias significativas en los diferentes tratamientos bacterianos (Cuadro 3.63).

Cuadro 3.63: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
24h	2.86	A
Mix	3.24	A
96h	3.54	A
48h	4.03	A
<u>Control</u>	<u>5.84</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.90413
 Error: 3.1199 gl: 4

En monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio de Bp se realizó un análisis comparativo de las poblaciones bacterianas totales. No hubo diferencias significativas en los tratamientos bacterianos (Cuadro 3.64).

Cuadro 3.64: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
9h	12.93	A
Control	12.99	A
18h	13.00	A
36h	13.16	A
<u>Mix</u>	<u>13.32</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.79773
 Error: 0.0826 gl: 4

En las poblaciones tipo *Bacillus* recuperadas en el monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio de Bp en el análisis estadístico no se detectaron diferencias significativas (Cuadro 3.65).

Cuadro 3.65: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
9h	12.90	A
Control	12.98	A
18h	13.04	A
36h	13.15	A
<u>Mix</u>	<u>13.31</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.87865
 Error: 0.1002 gl: 4

Se realizó un análisis comparativo para determinar las diferencias entre las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus*. No se detectaron diferencias significativas en los diferentes tratamientos bacterianos (Cuadro 3.66).

Cuadro 3.66: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 4 (frutos; 2011, junio 20) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
9h	0.04	A
Mix	0.04	A
36h	0.07	A
18h	0.11	A
<u>Control</u>	<u>0.14</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.10333
Error: 0.0014 gl: 4

En el monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) de Bt no se detectaron diferencias mínimas significativas entre las medias de los tratamientos de Bt (Cuadro 3.67).

Cuadro 3.67: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Control	11.39	A
48h	11.59	A
96h	11.85	A
24h	12.30	A
<u>Mix</u>	<u>12.31</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.22551
Error: 0.6425 gl: 4

En el análisis de ANOVA de las bacterias *Bacillus* no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.68).

Cuadro 3.68: Evaluación de las bacterias *Bacillus* del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Mix	6.39	A
Control	7.68	A
48h	9.12	A
96h	10.07	A
<u>24h</u>	<u>11.22</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.16594
Error: 3.4620 gl: 4

En el análisis de ANOVA para las bacterias totales versus las bacterias tipo *Bacillus* no hubo diferencias significativas entre ambas poblaciones (Cuadro 3.69).

Cuadro 3.69: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias *Bacillus* del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con *B. thuringiensis*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
96h	1.78	A
48h	2.47	A
24h	3.33	A
Control	3.71	A
<u>Mix</u>	<u>5.92</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=7.09825
Error: 6.5362 gl: 4

Se realizó una análisis de ANOVA para el predio de Bp del monitoreo 5 de las bacteriales totales. No hubo diferencias significativas (Cuadro 3.70).

Cuadro 3.70: Evaluación de las bacterias totales del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con *B. pumilus*.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
Mix	9.49	A
36h	10.72	A
Control	11.56	A
9h	11.64	A
<u>18h</u>	<u>12.23</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.89854
Error: 3.1128 gl: 4

En el análisis de ANOVA no hubo diferencias significativas entre las poblaciones de *Bacillus* encontradas en los distintos tratamientos bacterianos del predio de Bp (Cuadro 3.71).

Cuadro 3.71: Evaluación de las bacterias tipo *Bacillus* del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio de Bp.

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	
9h	8.11	A
Mix	8.40	A
48h	9.09	A
Control	9.13	A
<u>36h</u>	<u>9.19</u>	<u>A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.55392
Error: 5.5722 gl: 4

En el análisis de ANOVA no hubo diferencias significativas entre las poblaciones de bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* (Cuadro 3.72).

Cuadro 3.72: Evaluación de las diferencias en población (UFC) entre las bacterias totales y bacterias *Bacillus* del monitoreo 5 (frutos; 2011, septiembre 6) del predio inoculado con *B. pumilus*.

Tratamientos	Medias	
18h	3.15	A
Control	3.50	A
9h	3.53	A
Mix	4.21	A
36h	4.91	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

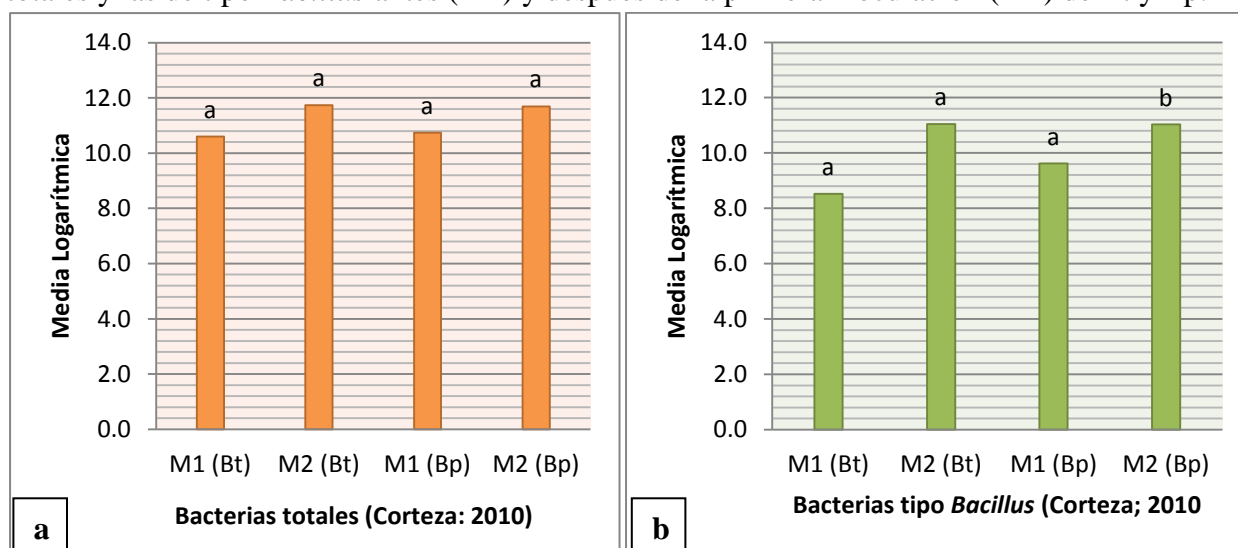
Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.71913

Error: 5.8566 gl: 4

Comparación entre monitoreos:

Se utilizaron las medias logarítmicas de las bacterias totales y las bacterias tipo *Bacillus* de tejidos de corteza y frutos para contrastar los niveles poblacionales antes y después de cada inoculación. En el año 2010, en la figura 3.8a se contrastan las poblaciones de bacterias totales de Bt y Bp; y en la figura 3.8b las poblaciones de las bacterias tipo *Bacillus* de Bt y Bp antes (M1; 2010, marzo 15) y después de la 1era inoculación (M2; 2010, marzo 13 (Bt) y 19 (Bp)). En ambas gráficas reflejan un aumento en las poblaciones bacterianas totales y las de tipo *Bacillus* después de la primera inoculación.

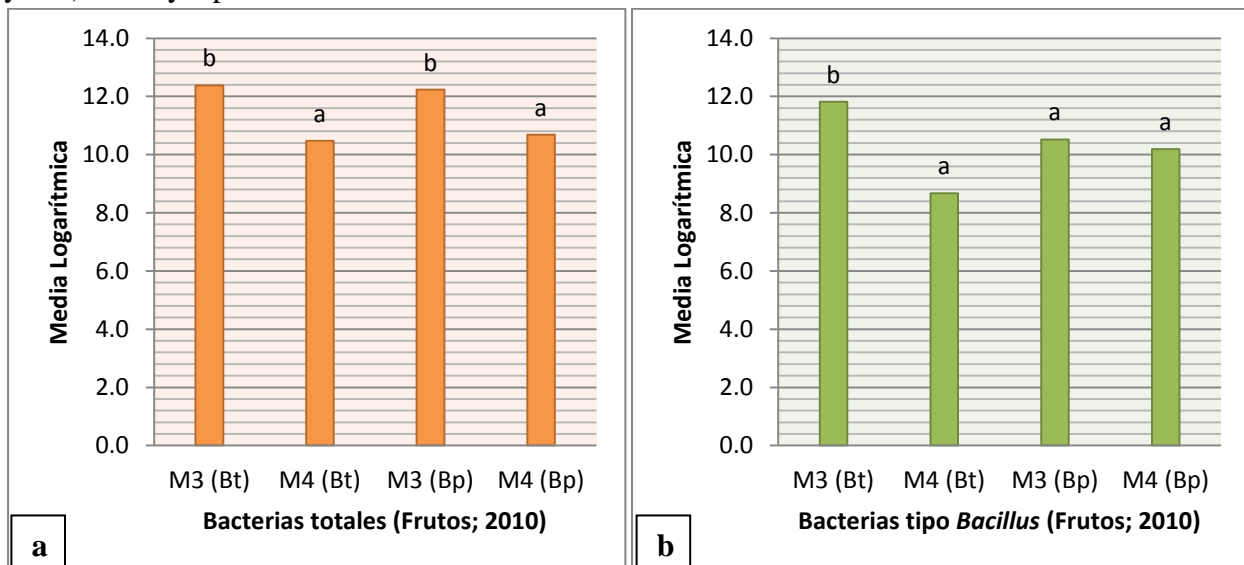
Figura 3.8: Monitoreo 1 y 2 (Corteza; 2010): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo *Bacillus* antes (M1) y después de la primera inoculación (M2) de Bt y Bp.



En la figura 3.9 se contrastaron las poblaciones bacterianas totales y las de tipo *Bacillus* después de la segunda inoculación (marzo 23 (Bt) y mayo 3 (Bp), 2010) en frutos de arboles de café. Después de la segunda inoculación se refleja un aumento en las poblaciones totales y las

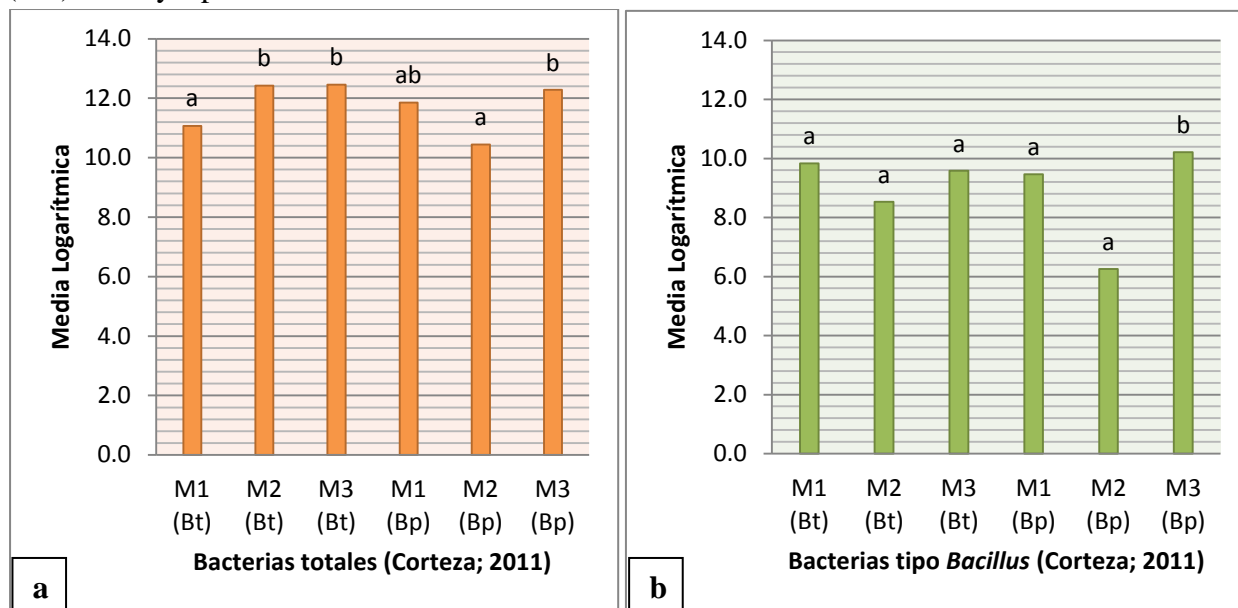
de tipo *Bacillus* en el monitoreo 3 (Frutos; 2010; junio 3) (Figura 3. 9: a y b). Luego de 5 meses después (M4; 2010, septiembre 2), las poblaciones bacterianas totales y las de tipo *Bacillus* reflejan una reducción probablemente asociado a la alta precipitación registrada en el mes de septiembre (Figura 3.9: a y b).

Figura 3.9: Monitoreo 3 y 4 (Frutos; 2010, junio 3 (M3) y septiembre 2 (M4)): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo *Bacillus* después de la segunda inoculación (M3 y M4) de Bt y Bp.



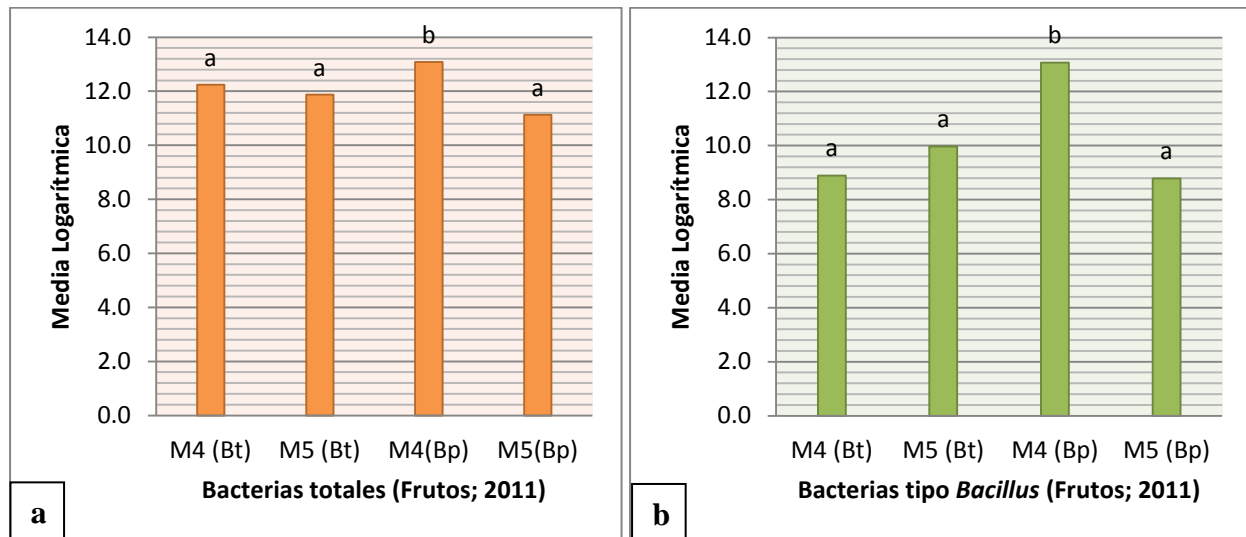
En el año 2011, en la figura 3.10a refleja un aumento en las poblaciones de bacterias totales después de la primera (M2; 2011, marzo 16 (Bt) y 30 (Bp)) y segunda inoculación (M3; 2011; abril 6 (Bt) y 13 (Bp)). En la figura 3.10b se refleja una reducción de las poblaciones de las bacterias tipo *Bacillus* después de la primera inoculación (M2); y luego de la segunda inoculación (M3) estas aumentaron. Esta reducción podría haber sido causada por lluvias observadas después de la inoculación.

Figura 3.10: Monitoreo 1, 2 y 3 (Corteza; 2011): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo *Bacillus* antes (M1) y después de la primera (M2) y segunda inoculación (M3) de Bt y Bp.



En la figura 3.11 se contrastan las poblaciones de bacterias totales y tipo *Bacillus* procedentes de frutos de arboles de cafeto. En la figura 3.11a las poblaciones de bacterias aumentaron después de la tercera inoculación (M4) realizada el 8 (Bt) y 15 (Bp) de junio, 2011. Luego, se observa una pequeña reducción del monitoreo 5 (M5) realizado 3 meses después (septiembre 6, 2011). En la figura 3.11b refleja una reducción de las poblaciones de bacterias tipo *Bacillus* en el monitoreo 4 de Bt y un aumento en el de Bp. Sin embargo, en el monitoreo 5 se observa una reducción en las poblaciones de Bp. Mediante estos datos se puede establecer la capacidad de sobrevivencia de las bacterias Bt3971 y Bp4185 por más de 6 meses bajo condiciones de campo.

Figura 3.11: Monitoreo 4 y 5 (Frutos; 2011): Comparación de las poblaciones de bacterias totales y las de tipo *Bacillus* después de la tercera inoculación (M4 y M5) de Bt y Bp.



En los muestreos realizados durante los meses de marzo a septiembre en el 2010, se determinó la sobrevivencia de Bt y Bp con un máximo de 6 meses bajo condiciones de campo en Adjuntas, P.R. En el 2011, mediante los análisis obtenidos de los monitoreos de tejidos de corteza y frutos de los árboles de cafeto se pudo establecer la capacidad de sobrevivencia de las cepas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* inoculadas en los arboles de cafeto. La sobrevivencia de las bacterias Bt 3971 y Bp 4185 se determinó mediante un aumento significativo en las poblaciones totales y las bacterias tipo *Bacillus* después de la segunda y tercera inoculación. También, según las medias reflejadas en los monitoreos realizados entre los meses de marzo a septiembre 2011 se pudo inferir que las bacterias de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* se encontraban presentes en el predio experimental después de seis meses de la inoculación. Según Sánchez *et al.*, (2000) existe poca información sobre la ecología de Bt, en relación a las células vegetativas y esporas en las hojas de las plantas, específicamente en la persistencia de las esporas y la estabilidad del cristal en la naturaleza. Esto es debido a que la viabilidad de las esporas como de los cristales son afectados por la acción germicida de la luz visible y UV. Sin embargo, Smith y Couche (1991), reportaron en hojas de pino que las esporas de Bt persisten más de siete meses en ambientes bajo sombra. Basándonos en lo reportado por Smith y Couche (1991); y en lo obtenido en nuestro estudio tanto las células vegetativas como las esporas de *B. thuringiensis* y *B. pumilus* persisten bajo condiciones de campo en arboles de cafeto.

3.4 CONCLUSIONES

1. En los monitoreos realizados durante los meses de marzo a septiembre en el 2010, se determinó la sobrevivencia de Bt y Bp en 6 meses bajo condiciones de campo en Adjuntas, P.R.
2. En los monitoreos realizados durante los meses de marzo a septiembre en el 2011, se reconfirmó la sobrevivencia de las cepas de Bt y Bp inoculadas en los arboles de cafeto hasta 6 meses bajo condiciones de campo en Adjuntas, P.R.
3. La identificación de bacterias con potencial de control de la broca del café con buen potencial de sobrevivencia en el campo representa una excelente contribución a la industria del café.

3.5 Literatura citada:

- Barrera, J. F., 2007. Coffee Pest and their Management: Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México. 961p.
- Barrera, J. F., y J. I. López-Arroyo. 2007. Control biológico de insectos plaga en el sureste de México, pp. 201-233. En: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.), Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Baró Robaina, Y., D.M. Fontana, y R.D. Santos, 2009. Caracterización de cepas *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y *Anticarsia Gemmatalis* Hübner (Lepidóptera: Noctuidae). Fitosanidad. 13 (3): 187-192.
- Bustillo, A.E., M.G. Bernal, P. Benavides and B. Chaves, 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Fla. Entomol.82: 491-498.
- Bustillo, A.E., R. Cárdenas, and F.J. Posada, 2002. Natural Enemies and Competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleopteran: Scolytidae) in Colombia. Neotropical Entmology, 31(4): 635-639.
- De la Rosa, W., M. Figueroa, and J. E. Ibarra, 2005, Selection of *Bacillus thuringiensis* strains native to Mexico active against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Vedalia 12 (1): 3-9.
- Franqui Rivera, R. A. y S. Medina Gaud, 2003. Identificación de Insectos de Posible Introducción a Puerto Rico. Depto. de Protección de Cultivos, Colegio de Ciencias

- Agrícolas, Recinto Universitario de Mayagüez, Univ. de P.R.. Estación Experimental Agrícola. Jardín Botánico, Sur 1193 Calle Guayacán, San Juan, PR 00926-1118. 6-7p.
- Freimoser, F. M., S. Screen, S. Bagga, G. Hu and R. J. St Leger, 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect host. *Microbiology* 149: 239-247p.
- Hernández Soto, A., 2002. Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari). M.S. Tesis. Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular, Univ. Costa Rica, CR. 10p.
- Molina, C.A., J. F. Caña Roca, A. Osuna, and S. Vilchez, 2010. Selection of *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) Larvae. *Applied and Environ. Microbiology*. 76 (5): 1320-27.
- Monroig, M. F., 2007. Manejo Integrado de la Broca del Café: Control Biológico. <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id34.htm>
- Peteira, B., I. González, Y. Arias, A. Fernández, I. Miranda y B. Martínez, 2011. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beaveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Rev. Protección Veg.* 26 (1): 16-22p.
- Puerto Rico's Department of Agriculture, 2008. Agricultural Annual Gross Income, revised data 2007-2008 and preliminary data 2008-2009. Puerto Rico's Commonwealth, San Juan, PR.
- Ramarathnam, R., S. Bo, Y. Chen, W.G. Fernando, G. Xuewen and T. de Kievit , 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus spp.*, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can J Microbiol*; 53(7):901-11.
- Rodrigo, A., A. Morales, E. Sánchez, S. Caballero, y J. Muñoz, 2009. Inventario de hongos asociados a la muerte de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei* Ferr.) en Renacimiento, Panamá. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Año 13: N°4: 0257-7127.
- Rullan Bayron, C.I., 2006. Industria del Café, Importancia para la Zona Montañosa. Asociación de Agricultores de Puerto Rico. Conferencia Estación Experimental Agrícola. <http://cfcs.eea.uprm.edu/Presentations/Farmers%20Forum/Industrial%20del%20Cafe%20-%20Importancia%20para%20la%20zona%20montanosa.pdf>
- Sánchez, J.M. y J.J. Peña, 2000. Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz, de frijol y en el suelo. *Terra Latinoamericana*; 18(04):325-331.
- Sayeed Akhtar, M., and Z. A. Siddiqui, 2006. *Glomus intradaradices*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Gen Plant Pathol*. 74:53-60.
- Smith, R. and G. Couche, 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology*; 57(1): 311-315.

CAPÍTULO IV.

PRESENCIA DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS DE TIPO *BACILLUS*

CAPÍTULO IV.

PRESENCIA DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS DE TIPO *BACILLUS*

RESUMEN

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal cerrado, circular, covalente de tamaños variables presentes en muchas especies bacterianas. *Bacillus thuringiensis* (Bt) posee plásmidos donde contienen los genes *cry*, cuyos productos tienen propiedades tóxicas a insectos. *Bacillus pumilus* (Bp) es una bacteria con propiedades antifúngicas con ciertos patógenos. Recientemente se ha evaluado como entomopatógena a insectos. El objetivo de este estudio fue aislar y determinar la presencia de plásmidos en bacterias del tipo *Bacillus* con potencial letal a la broca del café. Los cultivos bacterianos se crecieron en medio líquido LB con ampicilina hasta alcanzar 1.7 a 2.0A. Se utilizaron los protocolos de los siguientes kits de extracción de plásmidos: Pure Yield™ Plasmid Miniprep System de Promega®, Rapid Concert Mini preparation de Life Technologies y High Isolation de IBI. Se corrieron en electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Las cepas Bt3971, Bp4185, y las subespecies *kurstaki* 4D-1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10 y 4D-20, *aizawai/pacificus* 4J-2 y 4J-5, y los clones de *E.coli* de Bt 6088, 6092 y 6096 fueron resistentes al antibiótico ampicilina. Se observaron bandas de ADN $\geq 12,000$ pb con todas las cepas. La presencia de plásmidos se pudo confirmar en algunas cepas por diferentes métodos de extracción.

ABSTRACT

Plasmids are extra-chromosomal DNA molecules closed, circular, covalent, of varying sizes present in many bacterial species. *Bacillus thuringiensis* (Bt) has plasmid which contain *cry* genes whose products have toxic properties to insects. *Bacillus pumilus* (Bp) is a bacterial species with antifungal properties to some pathogens. Recently, it has been evaluated as entomopathogenic to insects. The objective for this study was to isolate and determine the presence of plasmids in *Bacillus* strains with lethal or antagonistic potential to the coffee berry borer. Bacterial cultures were grown in LB liquid medium with ampicillin. The protocols used for the plasmid extraction were from the following kits: Pure Yield™ Plasmid Miniprep System from Promega®, Rapid Concert Mini preparation from Life Technologies and High Isolation from IBI. Samples were run by electrophoresis with 1% agarose gel. The strains Bt3971, Bp4185, the subspecies *kurstaki* 4D-1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10 y 4D-20, *aizawai/pacificus* 4J-2 y 4J-5, and *E.coli* of *B. thuringiensis* clones 6088, 6092 y 6096 were resistant to ampicillin. Bands of $\geq 12,000$ pb were observed in all the strains. The presence of plasmids was confirmed in some strains by different extractions methods.

4.1 Introducción

Los plásmidos son moléculas de ADN extra cromosómicos circular o lineales, de tamaños variables que van desde 1 a 250kb. Estos están presentes en muchas especies bacterianas y se replican y transmiten de manera independiente del ADN cromosómico (Snustad y Simmons, 2006). La presencia de estos tiene influencia en la biología de las bacterias que los contienen ya que juegan un papel significativo en la adaptación y evolución de estos organismos. Comúnmente, los plásmidos circulares adoptan un tipo de doble hélice igual al ADN cromosómico. Además, algunas bacterias contienen plásmidos tipo lineales. Algunas bacterias gram positivas comúnmente tienen cadena sencilla de ADN o de una sola hebra de ADN debido a la replicación del círculo rodante (Snyder y Campness, 2007).

En la organización de los plásmidos ocurren tres procesos para sexuales de la transferencia de genes que envuelven la transformación que es la absorción de moléculas de ADN libres de una bacteria a otra. La conjugación que envuelve la transferencia directa de ADN de una célula a otra. Por último la transducción que ocurre cuando los genes bacterianos son llevados de una célula donante a una célula receptora por bacteriófago (Snustad y Simmons, 2006). Estos procesos ocurren muy pocas veces, la transformación ocurre en todas las bacterias, pero la transducción y la conjugación solo ocurre en cierto tipo de bacterias. Dentro de la estructura de los plásmidos se conocen tres mecanismos principales de replicación: a) mecanismo tipo *theta* (θ) utilizado por plásmidos de diferentes tamaños (desde plásmidos pequeños hasta megaplásmidos); b) mecanismo de desplazamiento de la cadena, utilizado por algunos plásmidos de tamaño pequeño y grande; y c) mecanismo asimétrico del círculo rodante (plásmidos RC) el cual es utilizado por plásmidos pequeños de un tamaño menor de 1.3 a 15Kb (Loeza, 2005).

La mayoría de los plásmidos no son necesarios para la supervivencia de la célula en la que residen. Sin embargo, en ciertas condiciones ambientales donde está presente un antibiótico, pueden ser esenciales si cargan con el gen de resistencia a ese antibiótico. Entre los fenotipos conferidos por diferentes plásmidos son: resistencia a antibióticos, producción de antibióticos, degradación de compuestos orgánicos complejos, producción de enterotoxinas, y la producción de enzimas de restricción y modificación (Maniatis *et al.*, 1982). Los plásmidos pueden aportar características de sexo, producción de bacteriocina, uso de sustancias raras, hemólisis, resistencia a fagos, a luz UV y patogénesis. Algunos plásmidos tienen la capacidad para transformarse en

plásmidos conjugativos o no conjugativos. Los plásmidos conjugativos tienen la capacidad de transferir ADN de una célula recipiente a otra célula. Mientras que los no conjugativos requieren la presencia de los otros para poder transferirse (Snustad y Simmons, 2006).

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria con forma de bastón, gram positivo con presencia de esporas y aerobia. Las endoesporas son de forma elipsoidales y se encuentran en la parte central de la célula. Estas endoesporas de resistencia pueden permanecer activas por largos periodos de tiempo. Además de las endoesporas, las células vegetativas de la bacteria forman proteínas de cristal conocidas como Cry las cuales poseen propiedades bioinsecticidas (Baró *et al.*, 2009). En el caso de *Bacillus thuringiensis* las proteínas cristalíferas (genes *cry* o *cyt*), están codificadas en plásmidos y se producen durante la esporulación. Bt contiene varios plásmidos cuyo tamaño varía entre 2 a más de 200 kilobases (kb). Los genes *cry* se encuentran en plásmidos de gran tamaño (>40kb) (Bravo *et al.*, 2004). Estos plásmidos pueden ser transferidos de una cepa Bt a otra cepa con la finalidad de reunir en una determinada cepa la combinación de genes *cry* deseada. Mediante la conjugación de plásmidos se ha podido manipular genéticamente las cepas de Bt como: Bt (EG2424) que se obtuvo mediante la unión de los plásmidos nativos y la transferencia por conjugación de un plásmido que porta un gen *cry3A* que controla a coleópteros (Jacas *et al.*, 2005). Los genes que codifican estas proteínas insecticidas se encuentran en plásmidos conjugativos de tamaño superior a 30kb (Loeza, 2005).

Por otro lado, *Bacillus pumilus* (Bp) al igual que *Bacillus thuringiensis* es una bacteria del tipo bacilo gram positivo formadora de esporas del tipo elipsoidal localizada en la parte central de la célula y se encuentra mayormente en el suelo. Bp es una bacteria con actividad anti-fúngica específica solo con ciertos patógenos (Sayeed y Siddiqui, 2006). Esta se caracteriza por la producción de fungicidas tales como bacilomicin D y fengicin (Ramarathnam *et al.*, 2007). Muy poco se conoce de la toxicidad de Bp en insectos. En el 2010, Molina *et al.*, a través de un estudio demostraron la actividad tóxica de Bp en adultos y larvas de *Ceratitis capitata*, donde determinaron que la toxicidad de la bacteria está relacionada al proceso de esporulación y a las bajas temperaturas.

Las especies de *Bacillus*: *B. thuringiensis* y *B. pumilus* tienen potencial como posibles bio-controladores entomopatógenos de la broca del café. La broca es considerada una de las plagas más dañinas en el cultivo de café ya que se alimenta y reproduce dentro del fruto,

reduciendo la calidad y causando pérdidas en la producción (De la Rosa *et al.*, 2005). En el 2009 y 2011, Vázquez y Zapata, a través de un estudio se determinó el efecto de distintas cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones *in vitro*, donde las bacterias Bt 3971 y Bp 4185 indujeron la mayor mortalidad. También se determinó que Bp 4185 fue significativa en la reducción del movimiento del insecto.

Plásmidos con genes *cry* de proteínas que son tóxicas para el control de algunos insectos dañinos en la agricultura se han informado importantes en el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera) y *Anthonomus grandis* (Coleóptero) entre otros (Baró *et al.*, 2009).

Este estudio se condujo con el objetivo de determinar la presencia de plásmidos que puedan relacionarse a los genes *cry* (productos o proteínas tóxicas a insectos) en las bacterias *Bacillus* (Bt3971 y Bp4185) utilizadas en este estudio con potencial letal o antagónico a la broca del café.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1. Cultivos bacterianos

Para la extracción de plásmidos se utilizaron cultivos de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a *Bacillus* Genetics Stock Center (BGSC) y las bacterias nativas *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) perteneciente a la colección de la Dra. Mildred Zapata, del Depto. de Cultivos y Ciencias Agro-ambientales UPR-RUM (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Descripción de cepas de *Bacillus* utilizadas para aislamientos de plásmidos.

Cepas	Origen	Subespecie	Genes
4D-1	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cryIAa, cryIAb, cry IAc, cry 2 A</i>
4D-6	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry3a, 3b, 3c</i>
4D-7	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cryI</i>
4D-8	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry6</i>
4D-9	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry7</i>
4D-10	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry8</i>
4D-20	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry3a, 3b, 3c</i>
4J-2	BGSC	<i>aizawai/pacificus</i>	<i>cryIAa, cryIB, cryIC, cryID</i>
4J-5	BGSC	<i>aizawai/pacificus</i>	<i>cryIAa, cryIB, cryIC, cryID</i>
ECE53(6088)	BGSC	<i>E.coli clones of Bt</i>	<i>cryIAc</i>
ECE127(6092)	BGSC	<i>E.coli clones of Bt</i>	<i>cryIEa</i>
ECE131(6096)	BGSC	<i>E.coli clones of Bt</i>	<i>cry3Aa</i>
Bt3971	PR	<i>thuringiensis</i>	desconocido
Bp4185	PR	<i>pumilus</i>	desconocido

4.2.2. Obtención y Purificación de plásmidos

Los cultivos bacterianos se crecieron en placas con medio sólido de agar nutritivo (NA) con Ampicilina (10mg/ml) por 24h. Luego, se inocularon en 22ml de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (10mg/ml) en frascos tipo nephelos a 0.1A. Se crecieron durante la noche en un agitador marca L.E.D. Orbit a 150rpm hasta alcanzar 1.7 a 2.0A. Se utilizaron los protocolos de los siguientes kits de extracción de plásmidos: Pure Yield™ Plasmid Miniprep System de Promega® Corporation, Rapid Concert mini preparation de Life Technologies, High isolation de IBI. Estos proveen un sistema simple y un método confiable para el aislamiento de plásmidos de ADN.

Se realizó electroforesis utilizando la cámara Horizon 58 de Life Technologies para determinar la presencia de plásmidos en los productos extraídos de las bacterias del Cuadro 4.1. Se colocó 7µl de muestra (5µl del producto purificado y 2µl de loading buffer). Se utilizó un gel de agarosa al 1% con 3µl de bromuro de etidio incorporado al gel en un buffer de cámara de 0.5XTBE a 75V por 2h y visualizado en luz ultra violeta (UV). El marcador para la electroforesis utilizado fue de “1kb DNA ladder” de Invitrogen colocando 4µl con 3µl de loading buffer. Mediante la calidad de concentración de ADN plasmídico recuperada se compararon y se seleccionó el producto con mejores resultados para realizar la digestión de los plásmidos con enzimas de restricción.

4.3 Resultados y Discusión

Las bacterias *B. thuringiensis* 3971, *B. pumilus* 4185, y las subespecies *kurstaki* (4D-1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10 y 4D-20), *aizawai/pacificus* (4J-2 y 4J-5) y los clones de *E.coli* de *B. thuringiensis* [ECE-53 (6088), ECE127 (6092) y ECE131 (6096)] fueron resistentes al antibiótico ampicilina. Al poseer esta resistencia significa que todas las bacterias poseen el gen resistencia conocido como RK2 identificado en la bacteria *Klebsiella aerogenes* (Snyder y Champness, 2007).

La concentración de los productos de ADN plasmídico se obtuvieron utilizando un Nanofotómetro P360 y se midieron productos de extracción de Promega, Life technologies y IBI entre un rango de pureza de A260/280. Esto significa que las preparaciones de ADNds puro se esperan que estén entre los rango de pureza de ≥ 1.8 y ≥ 2.0 de absorbancia (Cuadro 4.2).

Al compararse las distintas concentraciones de las extracciones de plásmido obtenidas observamos que las extracciones obtenidas con los kits de las compañías de IBI y Promega resultaron con las concentraciones ADNds (ng/ml) más altas y consistentes entre los rangos de pureza de ≥ 1.8 y ≥ 2.0 de absorbancia, siendo el de IBI el superior (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Lectura de las concentraciones de ADN plasmídico utilizando el sistema de nanodrop (nanophotometer) con diferentes productos de extracción de plásmidos.

Muestras	Promega		Life Technologies		IBI ¹	
	ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280
1. 4D20	173.0	1.92	52.5	2.03	320	1.97
2. Bt3971	117.0	1.94	82.7	1.92	216	1.97
3. 4D-9	56.4	1.96	46	2.16	213	1.96
4. 4J-2	162.0	1.92	75.7	2.04	232	1.98
5. 4D-7	65.3	1.97	32.2	2.09		
6. 4D-8	88.1	1.95	54.5	2.03		
7. 6092	51.5	2.00	48.0	2.1		
8. 4D-6	101.0	1.95	58.4	1.97		
9. 4D-10	46.0	2.02	49.0	2.2		
10. 4D-1	103.0	1.93	52.0	2.19		
11. 6096	20.8	2.21	37.1	1.97		
12. 4J-5	60.4	1.93	67.3	2.15		
13. 6088	101.0	1.97	18.3	2.64		
14. Bp4185	56.4	2.00	36.1	1.97		

¹ IBI solo fue posible analizar cuatro muestras.

En las extracciones de plásmidos obtenidas con el kit de Life technologies mediante la electroforesis de agarosa al 1% de las distintas cepas bacterianas se observaron la presencia de plásmidos (Figura 4.1). Se observó una banda de 12,000pb en el carril 2 con la bacteria Bt 3971. En el carril 3 perteneciente a la bacteria Bp 4185 se observó una banda leve de 12,000pb. En los carriles 4 con la bacteria 4J-2 perteneciente a la subespecie *aizawai/pacificus* no se observó la presencia de bandas. En el carril 5 se observó una banda de 12,000pb con la bacteria 4J-5 perteneciente a la subespecie *aizawai/pacificus*. En el carril 6 con la bacteria 4D-20 perteneciente a *kurstaki* no se observó la presencia de bandas. En el carril 7 perteneciente a la bacteria 4D-10 de la subespecie *kurstaki* se observó la presencia de una banda de 12,000pb. En los carriles 8 (4D-9), 9 (4D-6), 10 (4D-8) y 11 (4D-1) se observó una banda $\geq 12,000$ pb pertenecientes a la subespecie *kurstaki*. En el carril 12 con la bacteria 4D-7 perteneciente a *kurstaki* no hubo presencia de bandas. En los carriles 13 y 14 con las bacterias 6092 y 6096 pertenecientes a *E. coli* de *B. thutirmgiensis*, con la muestra 6092 se observa un manchón indicativo de que hubo presencia de ADN y con la muestra 6096 no hubo presencia de ADN. Estos resultados confirman la presencia de plásmidos en los productos de extracción obtenidos con life

technologies de las bacterias *Bacillus*. Las muestras donde no se observaron la presencia de bandas probablemente se deban a que la concentración de los productos de ADN extraídos fueron bajos (Cuadro 4.2).

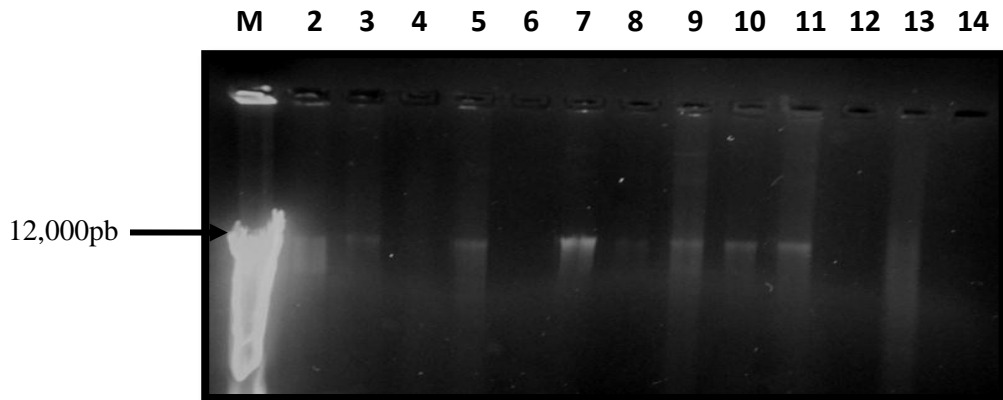


Figura 4.1: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de Life Technologies. 1) Marcador de ADN 1kb, 2) 3971, 3) 4185, 4) 4J-2, 5) 4J-5, 6) 4D-20, 7) 4D-10, 8) 4D-9, 9) 4D-6, 10) 4D-8, 11) 4D-1, 12) 4D-7, 13) 6092, 14) 6096.

Se realizó un segundo análisis de electroforesis con los productos de extracción de plásmidos del kit de Life Technologies (Figura 4.2). Se observaron la presencia de bandas de 12,000pb en los siguientes carriles: 4) 4J-2, y 5) 4J-5 pertenecientes a la subespecie *aizawai/pacificus*. En los carriles 6) 4D-1, 8) 4D-10, 10) 4D-20, 11) 4D-9 y 13) 4D-8 pertenecientes a la subespecie *kurstaki* se observó una banda de 12,000pb. En el carril 9) Bt3971 perteneciente a *Bacillus thuringiensis* se observó una banda fuerte de 12,000pb. Los carriles 2, 3, 12 correspondientes a las cepas 4D-6, 4D-7 y 6092, las bandas observadas fueron leves en los 12,000pb. Esto se debe a que la concentración de los productos de ADN extraídos fueron bajos (Cuadro 4.2). En los carriles 7 y 14 correspondientes a las cepas 6096 y 6088 no se observaron bandas probablemente por que el producto extraído de ADN fue bajo (Cuadro 4.2).

En este segundo análisis las bacterias 4J-2 y 4D-20 se observaron bandas de 12,000pb confirmado la presencia de plásmidos.

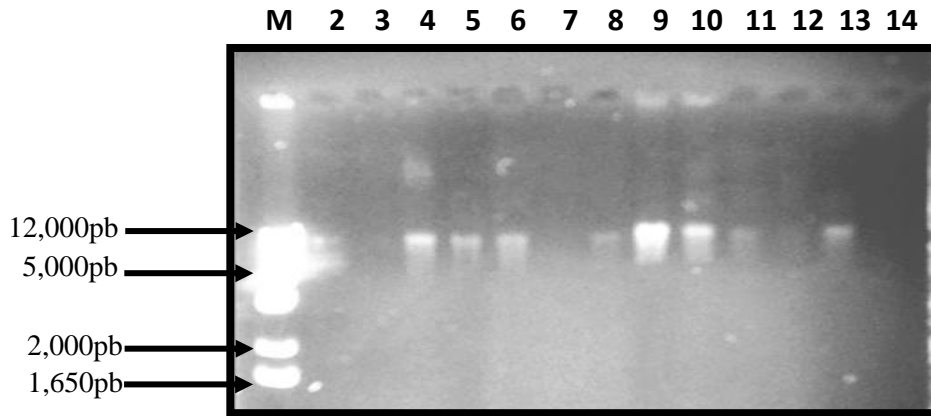


Figura 4.2: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de Life Technologies. 1) Marcador de ADN 1kb, 2) 4D-6, 3) 4D-7, 4) 4J-2, 5) 4J-5, 6) 4D-1, 7) 6096, 8) 4D-10, 9) 3971, 10) 4D-20, 11) 4D-9, 12) 6092, 13) 4D-8 y 14) 6088.

En las extracciones de plásmidos usando el kit de Promega se observó la presencia de plásmidos de las distintas cepas bacterianas después de la electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%. En la figura 4.3 se observan plásmidos $\geq 12,000\text{pb}$ en los siguientes carriles: 2) 4D-6, 3) 4D-20, 4) 4D-10, 6) 4D-1, 10) 4D-8, 11) 4D-9 pertenecientes a las subespecies *kurstaki* presenta bandas fuertes. En los carriles: 5) 6092, 7) 6096 pertenecientes a los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* se observan bandas leves de 12,000pb. En el carril: 8) Bt3971 perteneciente a *B. thuringiensis* se observó la presencia de una banda de 12,000pb. En los carriles: 9) 4J-2 y 12) 4J-5 pertenecientes a *aizawai/pacificus* se observa dos bandas $\geq 12,000\text{pb}$. En carril: 14) Bp4185 perteneciente a *Bacillus pumilus* se observa una banda de 12,000pb. En carril: 14) 6088 perteneciente a los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* no se observó la presencia de bandas.

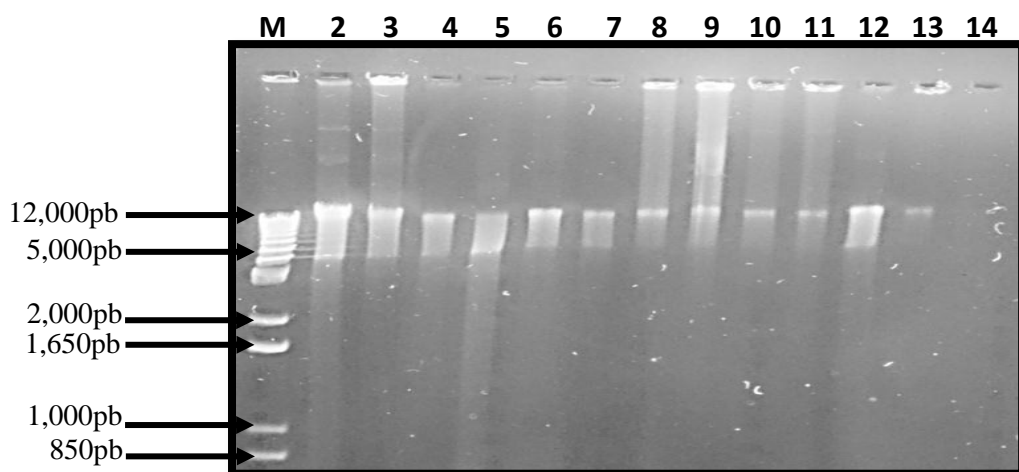


Figura 4.3: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de Promega. 1) Marcador de ADN 1kb, 2) 4D-6, 3) 4D-20, 4) 4D-10, 5) 6092, 6) 4D-1, 7) 6096, 8) Bt3971, 9) 4J-2, 10) 4D-8, 11) 4D-9, 12) 4J-5, 13) 4185, 14) 6088.

En las extracciones de plásmidos realizadas con el kit de IBI se observaron bandas $\geq 12,000\text{pb}$ (Figura 4.4). En el carril 2 se observa una banda de 12,000pb perteneciente a la especie *B. thuringiensis* 3971. En el carril 3 con la bacteria 4D-9 se observan 2 bandas $\geq 12,000\text{pb}$ perteneciente a la subespecie *kurstaki*. En el carril 4 con la bacteria 4J-2 se observa la presencia de una banda de 12,000pb perteneciente a la subespecie *aizawai/pacificus*. En el carril 5 con la bacteria 4D-20 se observan 2 bandas $\geq 12,000\text{pb}$ perteneciente a la subespecie *kurstaki*.

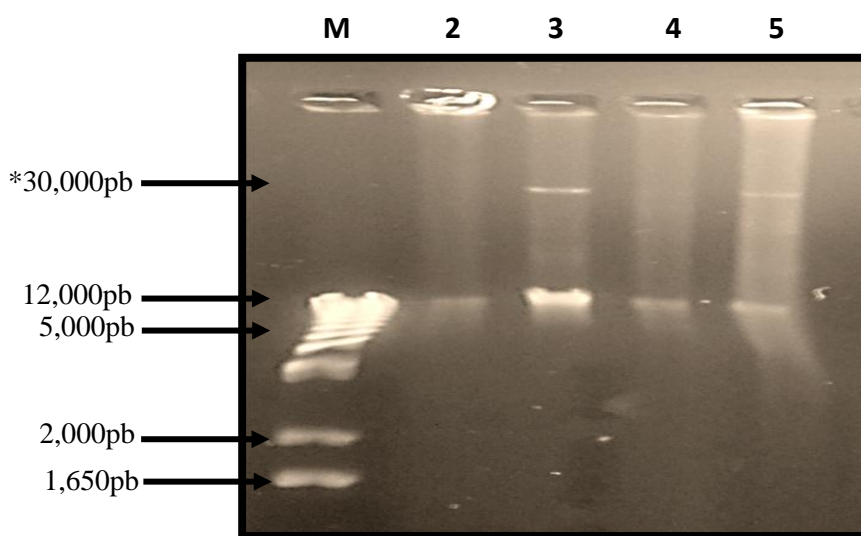


Figura 4.4: Electroforesis de agarosa 1% de las Extracciones de plásmidos mediante el Kit de IBI. 1) Marcador de ADN 1kb, 2) 3971, 3) 4D-9, 4) 4J-2, 5) 4D-20.

Los plásmidos son moléculas de ADN extra cromosómicos de varios tamaños presentes en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del ADN cromosómico. Dependiendo de su tamaño pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas. Comúnmente muestran una masa entre 1-250kb (Snustad y Simmons, 2006). Los productos de los genes que codifican generalmente proveen una ventaja a las bacterias bajo ciertas condiciones. Estos comúnmente portan características fenotípicas codificadas por plásmidos que proveen resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y kanamicina; nodulación de raíces leguminosas; y la producción de antibióticos como la bacteriocina activa contra otras bacterias (Loeza *et al.*, 2004). En este estudio las bacterias de Bt3971, Bp4184, 4D-1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10, 4D-20, 4J-2, 4J-5, 6088, 6092 y 6096 poseen resistencia a los antibióticos de ampicilina. Esta característica está asociada al gen RK2 identificado en la bacteria *Klebsiella aerogenes* el cual provee resistencia a ampicilina, tetraciclina y kanamicina (Snyder y Champness, 2007).

La bacteria gram positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) durante su esporulación produce proteínas delta endotoxinas que codifican para los genes *cry* que son tóxicos a insectos. Esta posee varios plásmidos cuyo tamaño varía entre 2 a más de 200 kilobases (kb) dependiendo de la cepa. Los genes *cry* se encuentran en plásmidos conjugativos (transferencia de genes de una célula a otra) de gran tamaño (>40kb) (Bravo *et al.*, 2004). Los cristales parasporales son ampliamente utilizados para la elaboración de bioinsecticidas lo cual ha permitido establecer más de 200 proteínas (Loeza, 2005). Mediante los resultados obtenidos en éste estudio las bandas obtenidas fueron mayor de los 12,000pb (1kb) con las muestras de Bt3971 y las muestras de *B. thuringiensis* de las subespecies *kurstaki*, *aizawai/pacificus* y los clones *E. coli* de *B. thuringiensis*, los cuales han sido caracterizados e identificados por tener genes *cry* tóxicos a coleópteros. Por lo que, se confirma la presencia de plásmidos en los cultivos bacterianos estudiados. Los plásmidos obtenidos en este estudio no fueron de gran tamaño a los plásmidos asociados a los genes *cry* los cuales suelen ser mayores a los 40Kb. Sin embargo, los controles utilizados poseían estos genes *cry*.

En cuanto a *Bacillus pumilus* (Bp), es una bacteria del tipo bacilo gram positivo formadora de esporas del tipo elipsoidal localizada en la parte central de la célula y se encuentra mayormente en el suelo. Bp es una bacteria con actividad anti-fúngica específica solo con ciertos

patógenos (Sayeed y Siddiqui, 2006). Esta se caracteriza por la producción de fungicidas tales como bacilomicin D y fengicin (Ramarathnam *et al.*, 2007). Muy poco se conoce de la toxicidad de Bp en insectos. En el 2010, Molina *et al.*, a través de un estudio demostraron la actividad tóxica de Bp en adultos y larvas de *Ceratitis capitata*, donde determinaron que la toxicidad de la bacteria está relacionada al proceso de esporulación y a las bajas temperaturas. Además, estudios realizados por Vázquez y Zapata, 2009 y 2011, se determinó el efecto de distintas cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones *in vitro*, donde las bacterias *Bacillus thuringiensis* 3971 y *Bacillus pumilus* 4185 indujeron la mayor mortalidad. También se determinó que *B. pumilus* 4185 fue significativa en la reducción del movimiento del insecto. Mediante el estudio realizado para la identificación de plásmidos se detectó en la bacteria *B. pumilus* 4185 la presencia de una plásmido de 12,000pb.

Mediante las identificación de plásmidos que codifican para los genes *cry* se podría establecer un perfil proteico de las bacterias del tipo *Bacillus* utilizadas en este estudio con el fin de comparar el perfil de ADN con posible relación a los genes *cry* en las cepas Bt 3971 y Bp 4185 las cuales representan un potencial letal o antagónico a la broca del café.

4.4 Conclusiones

1. Mediante éste estudio se pudo identificar la presencia de plásmidos de varias bacterias del grupo *Bacillus* pertenecientes a las especies *thuringiensis* y *pumilus*.
2. Dentro del grupo de *B. thuringiensis* las subespecies *kurstaki*, *aizawai/pacificus* y los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* se detectaron plásmidos mayores e igual a los 12,000pb.
3. Además se determinó la presencia plásmidos de las bacterias Bt3971 y Bp4185 con un peso molecular aproximado a los 12,000pb, además de bandas mayores a los 12Kb.

4.5 Literatura citada

- Baró Robaina, Y., D. M. Fontana y R. D. Santos, 2009. Caracterización de cepas *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y *Anticarsia Gemmatalis* Hübner (Lepidóptera: Noctuidae). Fitosanidad. 13 (3): 187-192.
- Ben-Dov, E., R. Manasherob, A. Zaritsky, Z. Barak and Y. Margalith, 2001. PCR analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by five conserved blocks of toxins. Current Microbiol. 42: 96-99.
- Bravo, A, S. Sarabia, L. López, H. Otiveros, C. Abarca, A. Ortíz, L. Lina, F. Villalobos, G. Peña, M. Nuñez, M. Soberón, and R. Quintero, 2004. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. Applied and Environmental Microbiology. 64 (12): 4965–4972 p.
- De la Rosa, W., M. Figueroa and J. E. Ibarra, 2005. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains native to Mexico active against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Vedia 12 (1): 3-9.
- Jacas, J., P. Caballero y J. Avilla, 2005. El Control biológico de plagas y enfermedades. Publicaciones de la Universidad de Jaume I, DL., 5ta Ed., 67 pp.
- Loeza Lara, P. D., J. J. Valdez Alarcón, V. M. Baizabal Aguirre y J. E. López Meza, 2004. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. REB 23 (2): 71-78.
- Loeza Lara, P. D., 2005. Análisis molecular del plásmido pBMBt1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. darmstadiensis INTA Mo14-4 que se replica por el mecanismo de círculo rodante. PhD. Tesis. Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico. 14pp.
- Maniatis, T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Molecular Cloning: *Plasmids*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1st Ed. 11p.
- Molina, C.A., J. F. Caña Roca, A. Osuna, and S. Vilchez, 2010. Selection of *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitits capitata* (Wiedemann) Larvae. Applied and Environ. Microbiology. 76 (5): 1320-27.
- Ramarathnam, R., S. Bo, Y. Chen, W.G. Fernando, G. Xuewen and T. de Kievit, 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus spp.*, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. Can J. Microbiology. 53(7): 901-11.
- Sayeed Akhtar, M., and Z. A. Siddiqui, 2006. *Glomus intradaradices*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Gen. Plant Pathol. 74:53–60.
- Snustad, P. D. and M. J. Simmons, 2006. Principles of Genetics: *The Genetics of Bacteria*. Publisher John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, N.J. 4ta Ed. 173-186p.
- Snyder, L. and W. Champness, 2007. Molecular Genetics of Bacteria. Published by ASM Press, Washington, DC. 3rd Ed. 197pp.
- Vázquez, D. y M. Zapata, 2009. Resultados preliminares sobre el control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) con bacterias del tipo *Bacillus spp.* Investigación sub-graduada. Univ. de Puerto Rico, Mayagüez, PR. (*unpublished*).

Vázquez, D. y M. Zapata, 2011. Efecto de cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones in vitro. SOPCA Reunión Científica Anual, Ponce, P.R. (Resumen).

CAPÍTULO V.

PROTEINAS PRESENTES EN BACTERIAS TIPO *BACILLUS*.

CAPÍTULO V.

PROTEINAS PRESENTES EN BACTERIAS TIPO *BACILLUS*

RESUMEN

Las bacterias del género *Bacillus thuringiensis* (Bt) se caracterizan por la formación de cuerpos para-esporales conocidas como δ -endotoxinas denominados como proteínas cry y cyt las cuales se han utilizado por su gran potencial como control biológico de insectos. *Bacillus pumilus* (Bp) es una bacteria del tipo bacilo gram positivo formadora de esporas, con actividad anti-fúngica específica solo con ciertos patógenos y recientemente se ha evaluado como entomopatógena. El objetivo de éste estudio fue determinar la presencia de proteínas de los cultivos bacterianos Bt3971 y Bp4185 con potencial de control biológico de la broca del café. Se aislaron proteínas de las bacterias: Bt3971, Bp4185, *kurstaki* (4D -1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10, 4D-20), *aizawai/pacificus* (4J-2, 4J-5), clones de Bt en *E. coli* (6088, 6092 y 6096) utilizando el kit de extracción de proteínas B-PER y se detectaron mediante electroforesis de gel de poliacrilamida al 12.5%. Se determinó la presencia de bandas proteicas entre los pesos moleculares de 116Kda a 45Kda. En la bacteria Bt3971 se observó una banda de 116Kda. En Bp4185 no se observó la presencia de bandas. En las muestras de la subespecie *kurstaki* 4D-1, 4D-6, 4D-8, 4D-9, 4D-10 y 4D-20 se detectaron bandas similares de 97Kda a 116Kda. Para las bacterias de la subespecie *aizawai/pacificus* 4J-2 y 4J-5 se detectaron bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda. Para los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* 6092 y 6096 se detectó una banda de 116Kda. Las bacterias *Bacillus thuringiensis* 3971 (Bt3971) y *Bacillus pumilus* 4185 (Bp4185) se han identificado como posible control biológico de la broca del café. En general, mediante el electroforesis de SDS-PAGE se detectaron proteínas con pesos moleculares aproximados de 116Kda y 97Kda con Bt3971. Bandas similares existen en las bacterias de las subespecies *kurstaki*, *aizawai/pacificus* y los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* las cuales se caracterizan por la producción de proteínas cry tóxicos a coleópteros.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus thuringiensis* (Bt) are characterized by the formation of para-sporal bodies known as δ -endotoxins and designated as cry and cyt proteins which have been used for their potential as biological control of insects. *Bacillus pumilus* (Bp) is a gram-positive spore-forming bacterium with specific antifungal activity against certain pathogens and recently has been evaluated as entomopathogenic. The objective of this study was to determine the presence of proteins from the bacterial cultures Bt3971 and Bp4185 with potential for biological control of the coffee berry borer. Proteins were isolated from the bacteria: Bt3971, Bp4185, *kurstaki* (4D -1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10, 4D-20), *aizawai/pacificus* (4J-2, 4J-5), clones of *E. coli* of Bt (6088, 6092 y 6096) and were run on polyacrylamide gel of 12.5%. Protein bands were detected between the molecular weights of 116Kda and 45Kda. The Bt3971 showed one band of 116Kda. In Bp4185 showed now bands. With the samples of subspecies *kurstaki* 4D-1, 4D-6, 4D-8, 4D-9, 4D-10 and 4D-20 similar bands of 116Kda and 97Kda were detected. With the subspecies *aizawai/pacificus* were detected bands of 116Kda, 97Kda and 45Kda. With the clones of *E. coli* of *B. thuringiensis* 6092 and 6096 one band of 116Kda was detected. The bacteria *Bacillus thuringiensis* 3971 (Bt3971) and *Bacillus pumilus* 4185 (Bp4185) have been identified as possible biological control of the coffee berry borer. In general, in the

electrophoresis of SDS-PAGE proteins were detected with molecular weights approximate of 116Kda for Bt3971, similar to the bands detected in the bacteria from the subspecies *kurstaki*, *aizawai* / *pacificus* and clones of *E. coli* of *B. thuringiensis* which are characterized by the production of cry proteins toxic to coleopteran species.

5.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Bacillus thuringiensis* (Bt) pertenece a la familia Bacillaceae. Es un género de bacterias con forma de bastón, gram positivo y aerobia. Esta bacteria se caracteriza por tener dos fases diferenciadas, la fase de crecimiento vegetativo donde la bacteria se duplica por medio de bipartición y fase de esporulación que se desencadena mediante una limitación de nutrientes (Díaz, 2006). Las esporas son de forma elipsoidales y se encuentran en la parte central de la célula. Estas esporas de resistencia pueden permanecer activas por largos periodos de tiempo. Bt se caracteriza por la formación de cuerpos para-esporales conocidas como δ -endotoxinas denominados como proteínas *cry* y *cyt*. Las δ -endotoxinas se han utilizado debido a su gran potencial como control biológico de insectos y para la creación de plantas resistentes mediante la introducción y expresión de los genes que codifican por dichas proteínas para las plantas hospederas de los insectos (Soberón y Bravo, 2007). Estas proteínas resultan tóxicas al ser ingeridas por insectos susceptibles, en los que se incluyen importantes plagas agrícolas. Las toxinas forman un complejo spora-cristal que posee propiedades insecticidas efectivos para el control de lepidópteras, díptera y coleópteros (Baró *et al.*; Frankenhuyzen, 2009). Al ingerirse el cristal, la proteína *cry* se disuelve en el mesenterón del insecto creando poros en la membrana intestinal, lo que conlleva a que este cese la ingesta y eventualmente su muerte por septicemia. Esta bacteria la hace ideal como insecticida debido a que las proteínas *Cry* mantienen una forma de control sostenible; ya que no afecta a los insectos benéficos como los depredadores y parasitoides (Hernández, 2002).

Las proteínas *cry* pueden agruparse dentro de distintos grupos. La gran mayoría están formados por proteínas *cry* las cuales poseen tres dominios que son importantes en la función de las mismas. El dominio I, involucra la formación del poro mediante la inserción de sus hélices alfa en la membrana de las células epiteliales. El dominio II, está involucrado en la interacción con el receptor membranal y es el responsable de la toxicidad específica. Por último, el dominio III, está involucrado en la unión del receptor, además de la formación del poro (Loeza, 2005).

En la actualidad se conoce la secuencia de más de 200 diferentes genes *cry* y 16 diferentes genes *cyt*. Estas toxinas están distribuidas en grupo de 50 y varios sub-grupos, mientras que las toxinas *cyt* se dividen en dos grupos y varios sub grupos de acuerdo a su similitud en la secuencia de aminoácidos (Soberón y Bravo, 2007). Las toxinas *cry1*, *cry2* y *cry9* son tóxicas a lepidópteros; *cry3*, *cry7* y *cry8* son proteínas efectivas en coleópteros, así como *cry1B* y *cry11* proteínas de actividad dual (Nariman, 2007). Las *cry 1B* y *cry11* tiene un efecto dual contra coleópteros y lepidópteros. Las toxinas *cry5*, *cry12*, *cry13* y *cry14* actúan contra nemátodos mientras que las *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry16*, *cry17*, *cry19* y las *cyt* son tóxicas a dípteros. Los pesos moleculares de estas toxinas formadas por enlaces de polipéptidos se encuentran entre 27 a 140 kilodaltons (kDa) (Hernández, 2002).

La bacteria *Bacillus pumilus* (Bp) es una bacteria del tipo bacilo gram positivo formadora de esporas del tipo elipsoidal localizada en la parte central de la célula y se encuentra mayormente en el suelo. Bp es una bacteria con actividad anti-fúngica específica solo con ciertos patógenos (Sayeed y Siddiqui, 2006). También se la ha descrito como resistente a condiciones ambientales desfavorables, como la escasez de nutrientes, desecación extrema, radiación UV, radiación gamma o desinfección química. Las esporas de *Bacillus pumilus* poseen mayor resistencia en comparación con otras especies de *Bacillus*. Las endoesporas de Bp pueden sobrevivir a tratamientos de calor, y a radiaciones de UV fuertes, pudiendo posteriormente germinar y multiplicarse (Nicholson *et al.*, 2000). Esta se caracteriza por la producción de fungicidas tales como bacilomicin D y fengicin (Ramarathnam *et al.*, 2007). Muy poco se conoce de la toxicidad de Bp en insectos debido a que no es considerada como entomopatógena. Molina *et al.* (2010), demostraron la actividad tóxica, la cual relacionaron al proceso de esporulación y a las bajas temperaturas, de Bp en adultos y larvas de *Ceratitis capitata*. Por lo que, Bp al igual que Bt, tienen potencial como posibles bio-controladores de insectos plaga. En el 2009 y 2011, Vázquez y Zapata, determinaron el efecto de distintas cepas bacterianas del grupo *Bacillus* sp. con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones *in vitro*, donde las bacterias Bt 3971 y Bp 4185 indujeron la mayor mortalidad. También se determinó que Bp 4185 fue significativa en la reducción del movimiento del insecto.

El objetivo de de este trabajo fue detectar la presencia de proteínas en los cultivos de *Bacillus thuringiensis* (Bt3971) y *Bacillus pumilus* (Bp4185) y compararlos con cultivos de las especies de Bt que producen proteínas tóxicas a coleópteros.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Cultivos bacterianos:

Para la extracción de proteínas se utilizaron cultivos de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a la colección de bacterias de *Bacillus* Genetics Stock Center (BGSC) y las bacterias nativas *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *B. pumilus* (Bp) pertenecientes a la colección de bacterias de la Dra. Mildred Zapata, del Depto. de Cultivos y Ciencias Agro-ambientales UPR-RUM (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1. Descripción de cepas de *Bacillus* utilizadas para aislamientos de proteínas.

Cepas	Origen	Subespecie	Genes
4D-1	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry 1Ac, cry 2 A</i>
4D-6	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry3a, 3b, 3c</i>
4D-7	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry1</i>
4D-8	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry6</i>
4D-9	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry7</i>
4D-10	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry8</i>
4D-20	BGSC	<i>kurstaki</i>	<i>cry3a, 3b, 3c</i>
4J-2	BGSC	<i>aizawai/pacificus</i>	<i>cry1Aa, cry1B, cry1C, cry1D</i>
4J-5	BGSC	<i>aizawai/pacificus</i>	<i>cry1Aa, cry1B, cry1C, cry1D</i>
ECE53(6088)	BGSC	<i>E.coli clones of Bt</i>	<i>cry1Ac</i>
ECE127(6092)	BGSC	<i>E.coli clones of Bt</i>	<i>cry1Ea</i>
ECE131(6096)	BGSC	<i>E.coli clones of Bt</i>	<i>cry3Aa</i>
Bt3971	PR	<i>thuringiensis</i>	desconocido
Bp4185	PR	<i>pumilus</i>	desconocido

5.2.2 Obtención y Purificación de proteínas

Los cultivos se crecieron en placas con medio sólido de Agar Nutritivo (NA) con Ampicilina (10mg/ml) por 24h. Luego, se inocularon en 22ml de medio Luria-Bertani (LB) con

ampicilina (10mg/ml) en frascos tipo nephelos a 0.1A y se crecieron durante la noche en un agitador marca L.E.D. Orbit a 150rpm hasta alcanzar 1.7 a 2.0A. Se utilizó el protocolo del kit de extracción de proteína: B-PER® de Thermo Scientific con enzimas (lysoenzimas y DNase I). Los reactivos de B-PER facilitan la extracción de proteínas de bacterias sin la necesidad de la disrupción mecánica.

La obtención de las proteínas fue mediante centrifugación. Se centrifugaron las células bacterianas a 5,000ppm por 10 minutos hasta formar el pellet. Luego, se le añadió 2µl de lisozima y 2µl de DNase I. Por cada gramo del pellet de células se añadió 2ml del reactivo B-PER. Se suspendió hasta que homogenizara. Luego, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 14,000ppm por 5 minutos para separar las proteínas solubles de las insolubles y se guardaron a -20°C. Luego, se procedió a realizar el análisis de proteínas mediante electroforesis de SDS-PAGE. Se tomó 50µl de la muestra de proteínas y se mezcló con 20µl del loading buffer (10% SDS, Glicerol, Mercaptoetanol, 0.1% Azul de bromofenol. 0.5M Tris-HCl, pH 6.8). Se colocó 70µl en los pozos en un gel de poliacrilamida al 12.5% (30% acrilamida, 2% bisacrilamida, 1M Tris·HCl (pH 8.7), 20% SDS, H₂O, TEMED, 10% Persulfato de amonio) (Maniatis *et al.*, 1982). Se utilizó el marcador de peso molecular marca BIO-RAD 161-0304 (Hernández, 2002). El gel de poliacrilamida al 12.5% se colocó en una cámara vertical marca OWL Scientific, con el buffer de cámara Tris-Glicina-SDS 10X (14.4g Glicina, 3g Tris base, 1g SDS, H₂O, 1L). Las muestra fueron corridas a 75V por aproximadamente 3.5h. Por último, las proteínas se tiñeron en una solución de azul de Coomassie de 25ml (0.025% en 50% Metanol y 10% Acido Acético) y Tinción de plata de 25 ml (0.2g Nitrato de plata, 5.25ml Hidróxido de sodio, y 350µl Hidróxido de amonio).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron las siguientes bacterias: *B. thuringiensis* 3971, *B. pumilus* 4185, y las subespecies *kurstaki* (4D-1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10 y 4D-20), *aizawai/pacificus* (4J-2 y 4J-5) y los clones de *E.coli* de *B. thuringiensis* [ECE-53 (**6088**), ECE127 (**6092**) y ECE131 (**6096**)] para determinar la presencia de proteínas con potencial tóxicos a insectos.

Mediante el análisis de proteínas de SDS-PAGE se observaron 3 bandas entre los pesos moleculares aproximados a 116Kda, 97Kda y 45Kda. En la Figura 5.1 el pozo 2 perteneciente a la bacteria Bt3971 se observó una banda con peso molecular a 116Kda. En el pozo 3 con la bacteria Bp4185 no se observó bandas. En el pozo 4 con la muestra 4J-2 perteneciente a *aizawai/pacificus* se observaron tres bandas con pesos moleculares entre 116Kda, 97Kda y 45Kda. En el pozo 5 con la muestra 4J-5 perteneciente a la subespecie *aizawai/pacificus* se detectó una banda fuerte de 116Kda. En el pozo 6 con la muestra 4D-1 perteneciente a la subespecie *kurstaki* se observaron tres bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda. En el pozo 7 con la muestra 4D-6 de la subespecie *kurstaki* se observó dos bandas de 116Kda y 97Kda. En el pozo 8 con la muestra 4D-8 de la subespecie *kurstaki* se observaron tres bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda. En el pozo 9 con la muestra 4D-9 perteneciente a la subespecie *kurstaki* se detectaron tres bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda. En el pozo 10 con la muestra 4D-10 perteneciente a la subespecie *kurstaki* se detectaron tres bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda. En el pozo 11 con la muestra 4D-20 perteneciente a *kurstaki* se detectaron tres bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda. En el pozo 12 con la muestra 4D-7 de la subespecie *kurstaki* no se observaron bandas. En el pozo 13 con la muestra 6092 y en el pozo 14 con la muestra 6096 pertenecientes a los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* se detectó una banda de 116Kda. En el pozo 15 con la muestra 6088 no se observaron bandas.

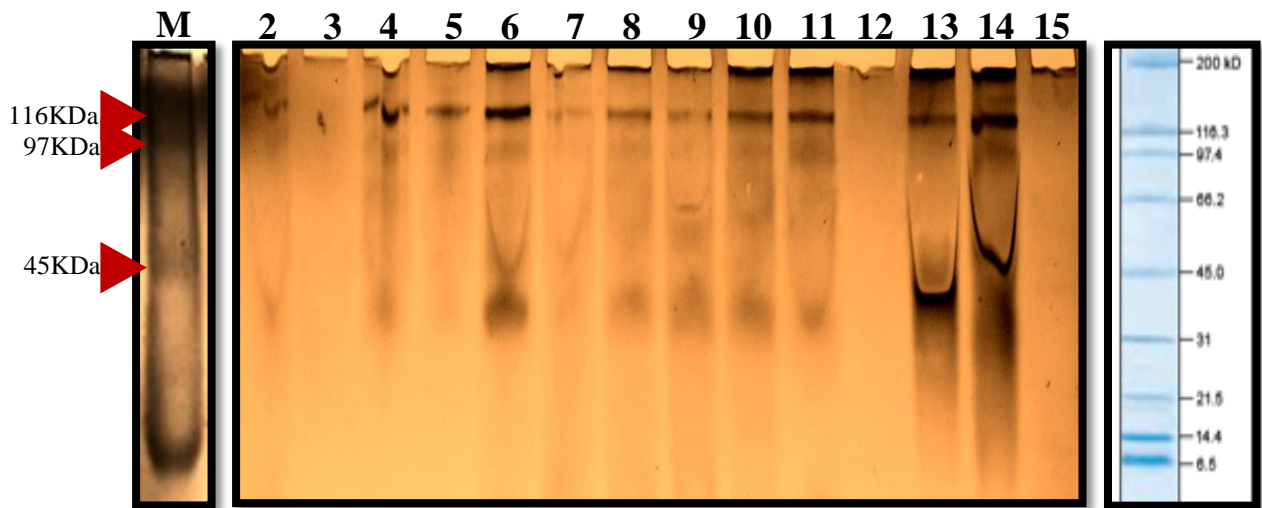


Figura 5.1: SDS-PAGE al 12.5% de las extracciones de proteínas mediante el Kit de B-PER. 1) Marcador SDS-PAGE, 2) 3971, 3) 4185, 4) 4J-2, 5) 4J-5, 6)4D-1, 7) 4D-6, 8) 4D-8, 9) 4D-9, 10) 4D-10, 11) 4D-20, 12) 4D-7, 13) 6092, 14) 6096, 15) 6088.

Dentro de éste grupo de bacterias estudiadas se encontraban especies bacterianas con proteínas tóxicas a coleópteros de importancia agronómica. Sin embargo, algunos subespecies de *Bacillus thuringiensis* se han encontrado proteínas cry tóxicas causando un efecto dual a lepidópteros y coleópteros. Mediante los resultados obtenidos se cuenta con cepas que expresan proteínas cry como las bacterias de la subespecie *kurstaki* (4D-1, 4D-6, 4D-7, 4D-8, 4D-9, 4D-10 y 4D-20) donde se observaron bandas oscilando entre los pesos moleculares de 116 a 97Kda. En las bacterias de la subespecie *aizawai/pacificus* (4J-2 y 4J-5) se observaron bandas de 116Kda, 97Kda y 45Kda, o sea que hay dos bandas cercanas a los 120Kda. En los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* (6088, 6092 y 6096) se observaron bandas con un peso molecular de 116Kda y 97Kda. En la bacteria Bt3971 se observaron bandas de proteínas de 116Kda. En la bacteria Bp4185 no se observó la presencia de bandas de proteínas.

Las bacterias *Bacillus thuringiensis* se caracterizan por la formación de cuerpos parasporales o cristales de proteínas denominadas como δ -endotoxinas, los cuales se forman durante la esporulación y son tóxicas contra insectos (Ben-Dov *et al.* 2001). Las δ -endotoxinas están formadas por dos tipos: las proteínas cry y cyt las cuales has sido identificadas por su actividad insecticida. Las δ -endotoxinas tienden a encontrarse entre los pesos moleculares de 27 a 140Kda.

Dentro de estos grupos de proteínas se encuentran las proteínas *cry* específicas a lepidópteros, dípteros, coleópteros, y nematodos (Carrera, 2009).

Dentro de estas subespecies se encuentran la subespecie *kurstaki* con los genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* y *cry2A* con pesos moleculares que oscilan entre 50 a 140Kda (Sauka y Benintende, 2008). Adicional, los genes *cry1*, *cry 6*, *cry7* y *cry 8* y los genes *cry3a*, *cry3b* y *cry3c* de la subespecie *kurstaki* también han sido identificados para el control de coleópteros oscilando entre los pesos moleculares de 50 a 140Kda (Carreras, 2005). Por lo cual, la presencia de las proteínas obtenidas con la subespecie *Kurstaki* utilizada en éste estudio se mantienen entre el rango de 50 a 140Kda informado por Carreras, 2005.

En la subespecie *aizawai/pacificus* los genes *cryIAa*, *cryIB*, *cryIC* y *cryID* han mostrado una actividad tóxica a especies de lepidópteros y coleópteros con pesos moleculares oscilando en los 120Kda (Méndez *et al.*, 2003). Al compararse los resultados obtenidos con lo reportado por Méndez *et al.*, 2003, las bandas de proteínas obtenidas están cerca de los 120Kda.

En los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* se han identificado los genes *cryIAc*, *cryIEa* y *cry3Aa* tóxicos a coleópteros con pesos moleculares de 50 a 140Kda (Sauka y Benintende, 2008). Mediante los resultados obtenidos se observaron proteínas de 116Kda y 97Kda con la sub especie *E. coli* de *B. thuringiensis* manteniéndose entre el rango de 50 a 140Kda.

Las bacterias *Bacillus thuringiensis* 3971 (Bt3971) y *Bacillus pumilus* 4185 (Bp4185) estudiadas en éste trabajo se han identificado como posible agente de control biológico de la broca del café. Ambas bacterias causan más del 50% de mortalidad y poseen un efecto significativo en la reducción en el movimiento del insecto (Vázquez y Zapata, 2011). Sin embargo, en éste estudio solo se pudo identificar la presencia de proteínas con la bacteria Bt 3971 con una banda de peso molecular de 116Kda similar a las detectadas en las subespecies *kurstaki*, *aizawai/pacificus* y los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* las cuales se caracterizan por poseer los genes *cry*, cuyas proteínas son tóxicas a coleópteros.

5.4 CONCLUSIONES

1. Mediante éste estudio se identificó la presencia de proteínas en la bacteria Bt3971 con una banda de peso molecular de 116Kda la cual estaría expresando la presencia de proteínas *cry*.
2. Bt3971 mostró bandas similares a las bacterias de las subespecies *kurstaki*, *aizawai/pacificus* y los clones de *E. coli* de *B. thuringiensis* utilizadas como controles positivos al caracterizarse por poseer genes *cry* tóxicos a coleópteros.

5.5 Literatura citada:

- Ben-Dov, E., R. Manasherob, A. Zaritsky, Z. Barak and Y. Margalith, 2001. PCR analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by five conserved blocks of toxins. *Current Microbiol.* 42: 96-99.
- Baró Robaina, Y., D. M. Fontana y R. D. Santos, 2009. Caracterización de cepas *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y *Anticarsia Gemmatalis* Hübner (Lepidóptera: Noctuidae). *Fitosanidad.* 13 (3): 187-192.
- Carrera Cabezas, M., 2009. Producción de *Bacillus thuringiensis* Berliner a nivel de laboratorio. Ph D. Tesis. Esc. Sup. Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 19pp.
- Carreras Solís, B., 2005. Cuantificación por densitometría de la proteína *cry* de *Bacillus thuringiensis*. *Fitosanidad.* 9 (1): 43-46.
- Díaz Mendoza, M., 2006. Proteasas digestivas de tipo tripsina del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* (Lepidóptera: Noctuidae): Caracterización e interacción con la proteína insecticida Cry1Ab. Ph D. Tesis. Dept. de Biotecnología. Univ. Politécnica de Madrid, Madrid, España. 19pp.
- Van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.
- Hernández Soto, A., 2002. Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari). M.S. Tesis. Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular, Univ. Costa Rica, CR. 10pp.
- Loeza Lara, P.D., 2005. Análisis molecular del plásmido pBMBt1 de *Bacillus thuringiensis* subep. *darmstadiensis* INTA Mo14-4 que se replica por el mecanismo del círculo rodante. Ph.D. Tesis. Univ. de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, México. 34pp.
- Maniatis, T, E. F. Fritsch, y J. Sambrook, 1982. *Molecular Cloning: Plasmids*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1st Ed. 11p.
- Méndez, I., R. Basurto and J. E. Ibarra, 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiology Letters.* 226: 73-77.
- Molina, C. A., J. F. Caña Roca, A. Osuna, and S. Vilchez, 2010. Selection of *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) Larvae. *Applied and Environ. Microbiology.* 76 (5): 1320-27.
- Nariman, A, y H. Aly, 2007. PCR detection of cry genes in local *Bacillus thuringiensis* isolates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 1(4): 461-466.
- Nicholson, W., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh and P. Setlow, 2000. Resistance of *Bacillus* endospore to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (3): 548-572.
- Ramarathnam, R., S. Bo, Y. Chen, W. G. Fernando, G. Xuewen and T. de Kievit, 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus spp.*, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can J Microbiol.* 53(7):901-11.

- Sauka, G. H. y G. B. Benintende, 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el control biológico de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiol.* 40:124-140.
- Sayeed Akhtar, M., y Z. A. Siddiqui, 2006. *Glomus intradaradices*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Gen. Plant Pathol.* 74:53–60.
- Soberón, M, y A. Bravo, 2007. Las toxinas *Cry* de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de aplicación. *Biotechnología*, V14: 1-12.
- Vázquez, D. y M. Zapata, 2009. Resultados preliminares sobre el control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) con bacterias del tipo *Bacillus spp.* Investigación sub-graduada. Univ. de Puerto Rico, Mayagüez, PR. (*unpublished*).
- Vázquez, D. y M. Zapata, 2011. Efecto de cepas bacterianas del grupo *Bacillus sp.* con potencial de control biológico en el movimiento y la mortandad de la broca del café bajo condiciones in vitro. SOPCA Reunión Científica Anual, Ponce, P.R. (Presentación oral).

RECOMENDACIONES

1. Probar las concentraciones bacterianas determinadas en este estudio como efectivas para el control de la broca bajo condiciones de campo.
2. Determinar los niveles poblacionales de broca presentes antes y después de haberse inoculado bajo condiciones de campo.
3. Determinar el perfil de los genes *cry* de los plásmidos encontrados de las bacterias *Bacillus thuringiensis* (Bt 3971) y *Bacillus pumilus* (Bp 4185).
4. Determinar los genes *cry* presentes en las proteínas encontradas en *Bacillus thuringiensis* (Bt 3971).