

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**CARACTERIZACION DE *Bacillus subtilis* AISLADO A PARTIR DEL CAFE  
VARIEDAD PACAMARA COMO AGENTE CONTROLADOR DE LA ROYA  
DEL CAFETO PRODUCIDA POR *Hemileia vastatrix***

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR**

**FLOR DE MARIA LUNA AVELAR  
MILTON ADEMIR ORELLANA HERNANDEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA**

**JUNIO 2019**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

**SECRETARIO**

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

**DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION**

**DIRECTORA GENERAL**

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

**TRIBUNAL CALIFICADOR**

**ASESORA DE AREA EN: MICROBIOLOGIA**

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

**ASESOR DE ÁREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS  
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

**DOCENTE ASESORA**

MSc. Norma Esthela Molina Velásquez

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por permitirnos culminar nuestros estudios de la mejor manera, y por ser nuestro motor y guía durante toda nuestra vida, principalmente, en nuestra formación universitaria.

También, agradecemos a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, por la formación académica, ética y cultural recibida

De igual forma, agradecemos a la directora general del proceso de graduación: MSc Cecilia Haydeé Gallardo de Velázquez, y a nuestro tribunal calificador: MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez y MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía, por su plena orientación al mejoramiento de nuestra investigación

Asimismo, agradecemos a nuestra asesora MSc. Norma Esthela Molina Velázquez por su completo apoyo, sus recomendaciones, consejos y opiniones que fueron piezas clave para el desarrollo de nuestro trabajo de graduación.

Además, agradecemos al Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por brindarnos herramientas esenciales para la ejecución de nuestra investigación, y haciendo menciones honoríficas a, Zoila Girón, Carlos López.

A su vez, agradecemos a la Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café (PROCAFÉ), al Dr. Sergio Lombardo Gil y al Ing. Óscar Mauricio Ramos por su asesoramiento en el área fitosanitaria de la roya del cafeto, especialmente

Expresamos también nuestros infinitos agradecimientos a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron en el desarrollo de la presente investigación, en especial a Ing. Miguel Ángel Rodríguez, Ing. Miguel Ángel Hernández Martínez, Katherine Magaña, Miguel Aguilar, Roberto Palacios, Nidia Rodríguez, Elliot Gómez, Tatiana Guevara, Priscila Sevillano.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por estar presente siempre en cada paso de mi vida y guiarme a lo largo de mi carrera.

A mis padres July y Luis por todas sus enseñanzas a lo largo de mi vida y por apoyarme en mi educación.

A mis hermanas, Fátima por enseñarme a ser una mejor persona, a Carmen Elena por motivarme y estar siempre para mí, porque a pesar de la distancia, sigues siendo mi mejor amiga y sigues inspirándome a seguir mis sueños.

A Miguel, por su paciencia, cariño y apoyo cuando más lo he necesitado.

A mi compañero y amigo Milton Ademir Orellana, por todos los buenos momentos que vivimos durante nuestra carrera, y por haber batallado conmigo durante este proceso hasta el final.

A Wendy, por estar siempre para mí y a mis amigas de la universidad Nidia y Priscila, por hacer alegres e inolvidables los momentos de estudio y formar parte de las personas especiales de mi vida.

Flor de María Luna Avelar

## DEDICATORIA

*A Dios todo poderoso, por brindarme el entendimiento y la fortaleza para poder culminar mis estudios.*

*A mi mamá, Yani de Orellana, por compartirme su pasión por ayudar a las demás personas desde su vientre, y por todo su amor, consejos, apoyo.*

*A mi papá, Milton Orellana, por su amor, entrega, cuidados, y por ser una roca de apoyo en momentos de alegría y tristeza.*

*A mis hermanas, Carolina Orellana y Kenny Orellana, por sus cuidados, consejos, por su amor, y por cada uno de los momentos vividos que han contribuido a mi superación personal.*

*A mi novia, Katherine Magaña, por todo su amor, su apoyo incondicional y su comprensión. Por ser esa persona con la que compartiré mi vida; mi futura colega Químico Farmacéutica.*

*A mi demás familia y amigos: Joaquín Orellana (Q.E.P.D), Teresa viuda de Orellana (Q.E.P.D), Nelson Orellana, Judith Magaña, Amílcar de Paz, Fernando Romero, por sus palabras de ánimos, oraciones y su apoyo.*

*A mis colegas-amigos: Flor Luna, Nidia Rodríguez, Priscila Sevillano, Roberto Palacios, Elliot Gómez, Tatiana Guevara y Licda. Ericka de Deras. Les deseo muchos éxitos en su desempeño profesional.*

*“Se valiente y ten ánimo; no tiembles ni tengas miedo; Yahvé tu Dios está contigo adonde quiera que tú vayas” Josué 1,9*

Milton Ademir Orellana Hernández

## INDICE GENERAL

	Pág. N°
Resumen	
<b>Capítulo I</b>	
1.0 Introducción	xxii
<b>Capítulo II</b>	
2.0 Objetivos	25
<b>Capítulo III</b>	
3.0 Marco Teórico	27
3.1 Problema del cultivo del café en El Salvador	27
3.2 Generalidades del café	28
3.2.1 <i>Coffea arabica</i>	29
3.2.2 Clasificación taxonómica de <i>Coffea arabica</i>	31
3.2.3 Descripción botánica	32
3.2.4 Principales variedades de café en El Salvador	34
3.3 Generalidades de la roya del café	36
3.3.1 Descripción del agente causal de la roya	37
3.3.2 Clasificación taxonómica de <i>Hemileia vastatrix</i>	38
3.3.3 Descripción morfológica	39
3.3.4 Patogenicidad de la roya y Desarrollo en la planta de café	39
3.3.5 Factores que influyen en la roya del café	42
3.3.6 Control biológico	43

3.4	Generalidades de <i>Bacillus subtilis</i>	44
3.4.1	Clasificación taxonómica	44
3.4.2	Características microscópicas	45
3.4.3	Características macroscópicas	47
3.5	Efecto anti fúngico de <i>Bacillus subtilis</i> contra la roya del cafeto	47
3.5.1	A través de metabolitos secundarios	47
3.5.2	A través de enzimas extracelulares	50
<b>Capítulo IV</b>		<b>53</b>
4.0	Diseño metodológico	53
4.1	Tipo de estudio	53
4.2	Investigación bibliográfica	53
4.3	Investigación de campo	54
4.4	Parte experimental	54
4.4.1	Georeferenciación	54
4.4.2	Muestreo, recolección y tratamiento de muestras	54
4.4.3	Morfología macroscópica	58
4.4.4	Morfología microscópica	58
4.4.5	Identificación bioquímica	60
4.4.6	Cosecha de <i>Bacillus sp.</i>	60
4.4.7	Caracterización	61
4.4.7.1	Conteo de UFC/mL	61

4.4.7.2 Pruebas enzimáticas	62
4.4.7.3 Cinética de crecimiento	63
4.4.7.4 Adhesión a solventes orgánicos	64
4.4.7.5 Prueba de tolerancia a pH	65
4.4.7.6 Prueba de tolerancia a temperaturas	65
4.4.7.7 Evaluación del efecto anti fúngico del <i>Bacillus subtilis</i> sobre el hongo de la roya del cafeto	66
<b>Capítulo V</b>	71
5.0 Resultados y discusión de resultados	
5.1 Aislamiento de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> aplicando la técnica de macerado de hojas de cafeto	71
5.1.1 Recolección de muestras.	71
5.1.2 Aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i> a partir de hojas de cafeto.	71
5.2 Identificación morfológica y bioquímica de Bacterias aisladas a partir de hojas de cafeto.	71
5.2.1 Morfología macroscópica	72
5.2.2 Morfología microscópica	76
5.2.2.1 Tinción de Gram	76
5.2.2.2 Tinción de esporas	81
5.2.3 Identificación bioquímica	85
5.3 Caracterización de las cepas cuyas características pertenecen a <i>Bacillus subtilis</i> .	89
5.3.1 Conteo de la cepa bacteriana.	89

5.3.2 Cinética de crecimiento.	93
5.3.3 Prueba de tolerancia a pH	96
5.3.4 Prueba de tolerancia a temperaturas	98
5.3.5 Pruebas enzimáticas	99
5.3.6 Prueba de adhesión bacteriana a solventes orgánicos.	101
5.4 Actividad antifúngica de <i>Bacillus subtilis</i> contra el hongo <i>Hemileia vastatrix</i> .	103
<b>Capítulo VI</b>	115
6.0 Conclusiones	
<b>Capítulo VII</b>	117
7.0 Recomendaciones	
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pg. N°
1. Comparación de las características de <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora var. Robusta</i> .	30
2. Clasificación taxonómica de <i>Coffea arabica</i>	31
3. Clasificación taxonómica de <i>Hemileia vastatrix</i>	38
4. Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	44
5. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de <i>Bacillus subtilis</i> .	45
6. Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para <i>Bacillus subtilis</i>	60
7. Resumen de resultados de los análisis realizados a cepas candidatas	112

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pg. N°
1. Arbusto <i>Coffea arabica</i>	29
2. Tallo y hoja <i>Coffea arabica</i>	33
3. Fruto seco <i>Coffea arabica</i>	34
4. Desarrollo de la roya en hojas de cafeto	37
5. Micrografías de uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i>	39
6. Diagrama del ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i> y los factores que lo afectan	41
7. Tinción de Gram de <i>Bacillus subtilis</i>	46
8. Tinción de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> por método de Shaeffer-Fulton	46
9. Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> en agar sangre	47
10. Estructuras de algunos lipopéptidos producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	48
11. Mecanismo de acción antifúngico de Iturina A	50
12. Actividad enzimática de la $\beta$ -1,3-glucanasa y Quitinasa	51
13. Pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos aislados 01 y 02	86
14. Curva de calibración de Bacilo 01	89
15. Curva de calibración de Bacilo 02	90
16. Curva de calibración de Bacilo 03	91

17. Curva de calibración de Bacilo 27	92
18. Curvas de crecimiento microbiano de las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> en estudio.	96
19. Resistencia a pH distintos por cepa de <i>Bacillus subtilis</i> estudiada	97
20. Resistencia a temperaturas distintas por cepa de <i>Bacillus subtilis</i> estudiada.	99
21. Pruebas de actividad enzimática	100
22. Actividad enzimática de las cepas estudiadas	101
23. Tubos incubados a temperatura ambiente para separación de las fases orgánica y acuosa	102
24. Porcentajes de adhesión a solventes orgánicos de las cepas estudiadas.	103
25. Folíolos infectados con roya	105
26. Recuento en cámara de Neubauer de las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> al 40x	105
27. Esporas del <i>Hemileia vastatrix</i> observadas al microscopio estereoscópico a las 48 horas de incubación	107

## INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pg. N°
1. Árboles de cafeto seleccionados para realización de muestreo	56
2. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en TSA.	72
3. Morfología microscópica a través de la tinción de Gram de los microorganismos aislados vistas al 100x.	77
4. Morfología microscópica de esporas de los microorganismos aislados vistas al 100x.	81
5. Resultados de las pruebas bioquímicas de los bacilos aislados	87
6. Conteo y absorbancias del Bacilo 01	89
7. Conteo y absorbancias del Bacilo 02	90
8. Conteo y absorbancias del Bacilo 03	91
9. Conteo y absorbancias del Bacilo 27	92
10. Concentración (UFC/mL) de la suspensión madre de cada cepa en estudio.	93
11. Concentraciones de las suspensiones de las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> por tiempo de incubación	94
12. Logaritmos de las concentraciones microbianas obtenidas en la cinética de crecimiento	95
13. Concentraciones, en UFC/mL, de las suspensiones de las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> en estudio	104
14. Recuento de suspensión de esporas.	106

15. Porcentajes de inhibición y germinación de <i>Hemileia vastatrix</i> frente a las suspensiones de <i>Bacillus subtilis</i> estudiadas.	108
16. Análisis estadístico de resultados Bacilo 01	109
17. Análisis estadístico de resultados Bacilo 02	110
18. Análisis estadístico de resultados Bacilo 03.	110
19. Análisis estadístico de resultados Bacilo 27.	111

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°	Pg. N°
1. Mapa georreferenciado del sitio de muestreo	129
2. Croquis de tarea y numeración de los ejemplares a muestrear	131
3. Tabla de números aleatorios con los números de muestra seleccionados	133
4. Esquema de procedimiento de recolección y traslado de muestras	135
5. Esquema de tratamiento de las muestras de folíolos de cafeto	137
6. Esquema de purificación de aislados y verificación de morfología	139
7. Esquema de procedimiento de tinción de Gram	141
8. Esquema de procedimiento de tinción de esporas	143
9. Esquemas de Pruebas bioquímicas realizadas	145
10. Esquema de cosecha de <i>Bacillus sp.</i>	149
11. Esquema de reanimación de cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	151

12. Esquema de siembra y conteo de las cepas bacterianas	153
13. Esquema de pruebas enzimáticas	155
14. Esquema de cinética de crecimiento	157
15. Esquema de prueba de adhesión a solventes orgánicos	159
16. Esquema de prueba de tolerancia a pH	161
17. Esquema de prueba de tolerancia a temperaturas	163
18. Esquema de preparación de suspensiones bacterianas de <i>Bacillus subtilis</i>	165
19. Esquema de comprobación de la actividad antifúngica de <i>Bacillus subtilis</i> contra <i>Hemileia vastatrix</i>	167
20. Figuras de recolección y tratamiento de la muestra	169
21. Figuras de aislamiento de <i>Bacillus sp.</i>	171
22. Esquema de cascada de dilución empleado en conteo de cepas bacterianas	173
23. Resultados obtenidos en conteo de cepas bacterianas	175
24. Resultados obtenidos en cinética de crecimiento	177
25. Ejemplos de cálculos en cinética de crecimiento	180

26. Resultados de pruebas de tolerancia a pH y temperaturas	182
27. Resultados de pruebas enzimáticas	184
28. Resultados de prueba de adhesión a solventes orgánicos	186
29. Resultados de recuento de esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> en determinación de actividad antifúngica	188
30. Resultados de análisis estadísticos	191
31. Informes de resultados de las cepas estudiadas	194
32. Medios de cultivos utilizados	207

## ABREVIATURAS

**APBF:** Agua peptonada bufferada suplementada con fluconazol

**GLC:** Glucosa

**ha:** Hectárea

**Kg:** Kilogramo

**LAC:** Lactosa

**MAN:** Manitol

**MAS:** Muestreo aleatorio simple

**MR – VP:** Caldo rojo de metilo – Voges Proskauer

**MSF:** Agar manitol salado suplementado con fluconazol

**RF:** Caldo rojo de fenol

**RM:** Rojo de metilo

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SAC:** Sacarosa

**SB:** Suspensión bacteriana

**SS:** Solución salina

**SM:** Suspensión madre

**T°:** Temperatura

**VP:** Voges – Proskauer

**qq:** Quintal

## RESUMEN

El cafeto variedad Pacamara presenta buena rentabilidad económica gracias a que se obtiene un producto apreciado por su aroma, pero es susceptible al hongo de la roya *Hemileia vastatrix*. Por lo que se realizó, de marzo a junio de 2018, la caracterización de cepas de *Bacillus sp.* aisladas de dicho arbusto, para comprobar la capacidad biocontroladora contra este hongo. Para ello, las muestras fueron recolectadas en campo experimental de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ). Posteriormente, estas fueron trasladadas al Centro de Investigación y desarrollo en Salud (CENSALUD) y se realizó el proceso de aislamiento empleando calentamiento a 100°C, medios de cultivo suplementados con fluconazol y resiembras de los microorganismos aislados, para realizar las identificaciones morfológica y bioquímica subsecuentes, siendo identificadas el 22.2% de las cepas aisladas como *Bacillus subtilis*, con códigos de aislados 01, 02, 03 y 27.

Se determinó que las concentraciones de las suspensiones madre de dichas cepas rondaron entre  $7.43 \times 10^{10}$  a  $1.61 \times 10^{12}$  UFC/mL. Por otro lado, se estableció que las tolerancias a pH y temperaturas fueron de 6 a 9 y de 37 a 50°C respectivamente. Asimismo, estas presentaron fase estacionaria a las 96 horas, buena producción de amilasa, proteasa y gelatinasa, alta adhesión al cloroformo y, por última parte, las cuatro cepas demostraron ser capaces de combatir al *Hemileia vastatrix*. Se concluye que se debe apostar a la búsqueda de biocontroladores para combatir las distintas enfermedades producidas por agentes patógenos en plantas, y así, reemplazar el uso de los agroquímicos disponibles en el mercado para contrarrestar los efectos perjudiciales que estos producen a la salud y al medioambiente. Se recomienda que se brinde la capacitación adecuada al gremio cafetalero para el uso de biocontroladores, haciendo hincapié en los beneficios económicos, ambientales y ocupacionales que estos brindan

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

El café se ha posicionado como uno de los principales productos de exportación en El Salvador, generando en la actualidad un aproximado de 4.8 millones de empleos temporales y permanentes en un año, convirtiéndose en la principal fuente de empleos en la zona rural de nuestro país. Se estima que aproximadamente el 8% del territorio nacional está cubierto de cafetales.

En el año 1979, se detectó la presencia de roya en El Salvador, enfermedad que es producida por el hongo *Hemileia vastatrix*, y que provoca defoliación y maduración temprana del fruto en la planta de café. Para contrarrestar la enfermedad, se utilizan agroquímicos del grupo de los azoles (ciproconazol) o del grupo de las estrobilas (Trifloxistrobina), los cuales provocan efectos tóxicos, tanto de las personas que los manipulan directamente al realizar la aspersion sobre las plantas afectadas, como también a los consumidores, ya que algunos poseen un alto grado de permanencia sobre los productos, provocando a largo plazo mutagenicidad y hepatotoxicidad. Además, muchas de estas sustancias poseen alta persistencia en el suelo, y como consecuencia se produce un proceso de lixiviación de estas sustancias a los mantos acuíferos y a los ríos, en donde se presenta el deterioro de la flora y fauna acuática.

En los últimos años, se han incrementado el número de investigaciones con el fin de buscar diversas medidas ecológicas que contribuyan la mitigación de enfermedades en los cultivos, por lo que a nivel mundial se está apostando a la utilización de sustancias de origen biológico que sean amigables con los seres humanos y el medio ambiente. Dichas investigaciones han descrito la actividad que poseen diversos microorganismos para el control de hongos patógenos en cultivos, siendo una de las bacterias con las que se han obtenido resultados favorables por su efecto antifúngico es *Bacillus subtilis*.

En El Salvador no se cuenta con una investigación previa sobre la actividad antifúngica de cepas nativas de *Bacillus subtilis* sobre *Hemileia vastatrix*. Dicha bacteria se caracteriza por ser aislada fácilmente del medio ambiente y no ser potencialmente patógena.

Por lo que en el presente estudio se buscó dar respuesta a la problemática planteada siendo este realizado en dos etapas, comprendidas entre marzo y julio de 2018. La primera etapa comprendió el muestreo de dieciocho arbustos de cafeto variedad Pacamara cultivados en el campo experimental de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones de Café (PROCAFÉ) para la recolección de hojas.

La segunda fue realizada en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), donde se logró el aislamiento e identificación de cuatro cepas de *Bacillus subtilis* (cantidad de correspondiente a cuatro arbustos), las cuales fueron sometidas a pruebas de caracterización microbiológica. Dichas pruebas consistieron en el conteo de cepas bacterianas, actividad enzimática (hidrolisis de gelatina, almidón, caseína, y lípidos), cinética de crecimiento, adhesión a solventes orgánicos, tolerancia a pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) y tolerancia a temperaturas (25°C, 37°C, 50°C y 70°C).

Como último punto, se determinó la concentración de suspensión bacteriana eficaz de cada cepa contra *Hemileia vastatrix* a través del estudio *in vitro*. Los resultados de las pruebas estadísticas arrojaron la evidencia suficiente que todas las cepas poseen el potencial antifúngico contra el hongo de la roya del cafeto.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *Bacillus subtilis* aislado a partir del café variedad Pacamara como agente controlador de la roya del cafeto producida por *Hemileia vastatrix*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Aislar cepas de *Bacillus sp.* aplicando la técnica de macerado de hojas de cafeto.
- 2.2.2 Identificar morfológica y bioquímicamente las cepas de *Bacillus sp.* obtenidas de las hojas de cafeto previamente maceradas.
- 2.2.3 Realizar la determinación de cinética de crecimiento, pruebas enzimáticas, resistencia a pH, resistencia térmica y adhesión a solventes orgánicos de las cepas de *Bacillus subtilis*.
- 2.2.4 Determinar la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* contra el hongo *Hemileia vastatrix*, empleando suspensiones bacterianas de este microorganismo a distintas concentraciones.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO DE CAFÉ EN EL SALVADOR.

El café es uno de los principales productos de exportación de nuestro país, generando en la actualidad un aproximado de 4.8 millones de empleos temporales y permanentes en un año.

En el periodo comprendido entre 1950 – 1970, el país apostó a la inversión y tecnificación de los procesos del sector cafetalero, posicionándose El Salvador durante esa época como el quinto productor mundial de café, y uno de los máximos exportadores, siendo reconocido El café de El Salvador como uno de los mejores por su calidad y aroma. <sup>(18)</sup>

A finales de 1979, se confirmó en el oriente de nuestro país la presencia de Roya del cafeto, convirtiéndose hasta nuestros días en la enfermedad más importante en las plantaciones. El hongo *Hemileia vastatrix*, que produce la roya del cafeto, provoca defoliación y una maduración temprana del grano, lo que se traduce en cortas anticipadas y pérdidas económicas para los productores. <sup>(27)</sup>

Según datos de la Organización Internacional del Café, a partir de la cosecha 2013/2014 El Salvador ha experimentado las producciones más bajas en el sector cafetalero desde su introducción como cultivo en nuestro país a finales del siglo XIX. Siendo la producción más baja la cosecha 2013-2014, con solo 506 mil quintales de café oro, disminuyendo un promedio de 40% respecto al año anterior.

Según informes Promecafé, fue también a partir de 2013 que El Salvador sufrió un aumento en la incidencia de roya, en donde la temporada de lluvias que inicio a finales de 2012, pudo haber incrementado la severidad del hongo brindando un

ambiente de humedad propicio para su crecimiento. <sup>(36)(47)(48)</sup>. La caída de los precios del café salvadoreño a nivel internacional, sumado a los altos precios de los fungicidas y la baja asistencia técnica hacia el sector cafetalero han provocado el abandono de la cosecha y de los parques cafetaleros, provocando repercusiones económicas a todas las familias que dependen de este sector para subsistir. <sup>(47)</sup>

En la actualidad existen diversas medidas de control de la enfermedad, que incluyen prácticas culturales de cultivo (Las que por sí mismas pueden ser insuficientes) y prácticas de control químico, siendo estas últimas las más efectivas para el control de la enfermedad.

Como una manera de mitigar la situación, el Ministerio de Agricultura y Ganadería ejecuta en 2014 el “Programa de Control Integral de la Roya del Cafeto”, consistiendo principalmente en la restauración del parque cafetalero con variedades resistentes a la Roya tales como: Híbrido centroamericano, Marsellesa y Catimor, asistencia técnica a productores que posean áreas de cultivo menores a 25 manzanas y entrega de agroquímicos para el control de la enfermedad. <sup>(36)(37)</sup>

### **3.2 GENERALIDADES DEL CAFÉ.** <sup>(49)</sup>

El café pertenece a la familia botánica Rubiaceae, que comprende aproximadamente 500 géneros y más de 6.000 especies. Hay probablemente 25 especies principales de *Coffea*, todas ellas autóctonas del África tropical y algunas islas de Océano Índico, en especial Madagascar.

Las dos especies más importantes de café desde el punto de vista económico son el *Coffea arabica* (café Arábica) – que supone más del 60% de la producción

mundial – y el *Coffea canephora* (café Robusta). Otras dos especies que se cultivan en mucha menor escala son el *Coffea liberica* (café Libérica) y el *Coffea dewevrei* (café Excelsa). (40)

### 3.2.1 *Coffea arabica*

El cafeto normal de Arábica es un arbusto grande con hojas ovaladas verde oscuro. El *Coffea arabica* es un tetraploide (44 cromosomas) y se autopoliniza. El fruto es ovalado y tarda en madurar de 7 a 9 meses. Contiene habitualmente dos semillas aplastadas (los granos de café).

Hay dos variedades botánicas distintas: *arábica* (typica) y *bourbon*. Históricamente, el typica se cultivó en Latinoamérica y Asia, mientras que el borbón llegó a Sudamérica y más tarde a África Oriental a través de la colonia francesa de Bourbon (Reunión). El café Arábica actualmente se cultiva en toda Latinoamérica, en África Central y Oriental, en la India y un poco en Indonesia.



**Figura N°1.** Arbusto *Coffea arabica*. (38)

Debido a que el *Coffea arabica* se autopoliniza, esas variedades tienden a permanecer genéticamente estables. No obstante, se han cultivado mutaciones espontáneas que muestran características deseables, como son el Caturra (Brasil, Colombia), el Mundo Novo (Brasil), el Tico (América Central), el San Ramón enano, el Jamaican Blue Mountain, y el Pacas en El Salvador.

**Cuadro N° 1.** Comparación entre las características de *Coffea arabica* y *Coffea canephora var Robusta*. (40)

Características	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora var Robusta</i>
Fecha de descripción de la especie	1753	1895
Cromosomas (2n)	44	22
Tiempo que tarda desde la flor hasta la cereza madura	9 meses	10 - 11 meses
Floración	Después de las lluvias	Irregular
Cerezas maduras	Caen	Quedan
Rendimiento (kg granos/ha)	1.500 - 3.000	2.300 - 4.000
(qq / mz)	10.60 – 21.15	16.22 - 282
Raíz	profunda	poco profunda
Temperatura óptima (media anual)	15 -24° C	24 - 30° C
Precipitación pluvial óptima	1.500 - 2.000 mm	2.000 - 3.000 mm
Crecimiento óptimo	1.000 - 2.000 m	0 - 700 m
<i>Hemileia vastatrix</i>	susceptible	resistente

**Cuadro N°1.** Continuación

<b>Características</b>	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i> <i>var Robusta</i>
Koleroga	susceptible	tolerante
Nematodos	susceptible	resistente
Antracnosis del fruto del café	susceptible	resistente
Contenido de cafeína del grano	0,8 - 1,4%	1,7 - 4,0%
Forma del grano	chato	Alargado
Características típicas del café bebida	acidez	amargor, pleno
Cuerpo	promedio 1,2%	promedio 2,0%
Antracnosis del fruto del café	susceptible	resistente

El café Arábica es a menudo susceptible a plagas y enfermedades, por lo cual la obtención de resistencia es una de los principales objetivos de los programas de mejora vegetal, para ello se realizan mutaciones genéticas por cruces con otras especies como el *Coffea canephora* (Café robusta), el cual presenta resistencia a varias enfermedades del cafeto y sus híbridos, por lo tanto, poseen esas características. (54)

### 3.2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Coffea arabica*. (5)

**Cuadro N°2.** Clasificación taxonómica de *Coffea arabica*

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Antofita
<b>Clase</b>	Dicotiledónea

**Cuadro N°2.** Continuación

<b>Subclase</b>	Simpétala
<b>Orden</b>	Rubiales
<b>Familia</b>	Rubiáceas
<b>Género</b>	<i>Coffea</i>
<b>Sección</b>	Eucoffea
<b>Subsección</b>	Eritrocoffea
<b>Especie</b>	<i>Coffea arabica</i>

### 3.2.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

**Raíz:** El sistema radical de los cafetos está constituido por una raíz cónica y pivotante, que alcanza de 50 cm. a 60 cm. de profundidad. De la raíz principal se derivan dos tipos de raíces de segundo orden: las raíces de sostén o axiales, las cuales son profundas, y las raíces laterales, en donde crecen las raicillas encargadas del intercambio de nutrientes con el suelo; comprendiendo estas últimas el 80% del sistema radical es a una profundidad de 0.30 m y un radio de 2.5 m alrededor del tronco de la planta.

**Tallo:** La planta está formada por un eje central en cuyo extremo hay una zona de crecimiento llamada comúnmente “yema terminal”, la cual va alargando el tallo formando nudos y entrenudos, sobre dicho eje se localizan las ramas productivas denominadas en nuestro país “laterales o bandolas”, en las que pueden originarse ramas secundarias o terciarias, constituyendo las crinolinas o palmillas; todo lo cual llega a conformar el sistema vegetativo y productor de la planta.

**Hojas:** Las hojas crecen en las ramas plagio trópico o lateral, caracterizándose por tener color verde oscuro brillante en la cara superior y verde claro opaco en la inferior. El tamaño y número de hojas varía principalmente de acuerdo a la

variedad, cantidad de sombra en el cafetal, estado fitosanitario, edad y densidad de siembra en la plantación. Las Hojas son las responsables junto a las raíces de la nutrición de la planta.

Dentro de su composición química se encuentran lípidos, proteínas, compuestos fenólicos, tales como los ácidos cinámicos, celulosa, lignina, hemicelulosa, almidón, ácidos orgánicos y alcaloides.



**Figura N°2.** Tallo y hoja de *Coffea arabica*. (20)

**Flores y fruto:** En los vértices (axiales) de los laterales, se forman las flores que representan la futura cosecha de la planta, determinándose que el inicio y crecimiento de la flor y luego del fruto, están básicamente influenciados por la luz

solar, agua, temperatura, reguladores de crecimiento vegetal (hormonas), balance nutricional y condiciones fitosanitarias de la planta.



**Figura N°3.** Fruto seco de *Coffea arabica*. (38)

En las variedades de *Coffea arabica* que se cultivan en el país, la auto polinización alcanza alrededor de un 90-95%, lo garantiza en gran medida que no se tengan problemas de mezcla genética en las plantas “hijas” que se obtienen por la semilla. De la flor se origina el fruto y dentro de este se encuentra el grano, que comercialmente se denomina “café”.

El grano de café crudo contiene aproximadamente 6% de ácidos cafeicos y clorogénicos, ácido tánico, trigonelina (que se transforma en ácido nicotínico durante el proceso de torrefacción), 8% de azúcares diversos, alrededor de 15% de lípidos y 1 a 2% de cafeína, según las especies (40).

### **3.2.4 PRINCIPALES VARIEDADES DE CAFÉ EN EL SALVADOR**

Las variedades predominantes en los cafetales de El Salvador, son las especies denominadas: Pacas, Bourbon y Arábica, su diferencia radica en el tamaño de los entrenudos y porte de la planta. También existen variedades como Pacamara y Catuai que son buenos productores, de buena taza. Su origen y características se muestran a continuación: (5) (40)

**Tekisic o bourbon mejorado:** Obtenido de una selección continua de la variedad Bourbon. Posee buen crecimiento vegetativo, entrenudos largos, hojas de color verde tenue, frutos grandes de color rojo, presenta maduración temprana. Bienalidad marcada; alta producción. Susceptible a la roya y al viento, poco tolerante a la sequía y a la alta luminosidad.

**Pacas:** Mutación de la variedad Bourbon. De porte pequeño con bandolas largas, entrenudos cortos, resistente al viento, sus hojas de color verde oscuro intenso, frutos de menor tamaño que los de Bourbon, presenta brotes verdes, es precoz, con menor bienalidad, susceptible a la roya, tolerancia a la sequía y alta luminosidad.

**Catuai:** Cruzamiento de Caturra Amarillo y Mundo Novo. De porte pequeño, copa compacta, bandolas largas y con alta capacidad de producir bandolas secundarias o crinolinas, hojas de color verde suave redondeadas y brillantes, frutos similares a los de la variedad Pacas. Alta capacidad productiva en algunos casos presenta brotes bronceados, madurez tardía, susceptible a la roya.

**Pacamara:** Cruce de Pacas por Maragogipe Rojo. Porte intermedio, hojas medianas a grandes, corrugadas, color verde oscuro, brotes verdes y/o bronceados, frutos de tamaño mediano a grande, posee alto porcentaje de segregación a pacas y a maragogipe, susceptible a la roya.

**Catisic:** Catimor seleccionado del cruce de Caturra Rojo por Híbrido de Timor. Porte pequeño, bandolas y entrenudos cortos, hojas de color verde oscuro, brotes

verdes, frutos similares a Pacas, precoz, necesita luminosidad y demanda suelos fértiles, resistente a la roya. <sup>(40)</sup>

### **3.3 GENERALIDADES DE LA ROYA DEL CAFÉ**

El primer reporte de la roya del café se produjo en 1869 en el continente asiático, en Sri Lanka. Ese mismo año fue descrita por Miles Joseph Berkeley, un especialista británico en hongos, quien descubrió al hongo responsable de la enfermedad y le dio el nombre científico con el cual se le conoce hoy en día. McCook propuso la hipótesis de que la roya del café fue introducida a Sri Lanka desde África del Este de forma accidental a través de plantas enfermas por la movilización de británicos a ese país.

Al llegar a Sri Lanka el hongo encontró las condiciones propicias para su desarrollo ya que la isla recibe lluvias abundantes, por efecto de los vientos monzónicos que favorecen la enfermedad, y al realizar el cultivo del café en plantaciones homogéneas con materiales susceptibles y a plena exposición del sol, los agricultores brindaron mayores condiciones de desarrollo a este patógeno. <sup>(51)</sup>. Posterior al reporte de la aparición de la roya del café, el cultivo se expandió a muchas regiones del continente asiático, y con el cultivo también se expandió la enfermedad, llegando así al continente americano en 1970, cuando fue reportada por primera vez en Brasil, y afectando posteriormente a El Salvador, en donde se reportó por primera vez en el año 1979, y provocó en la cosecha 2010 – 2011 severos daños a los cultivos. <sup>(51)(59)</sup>

El impacto del ataque de la roya del café en la región centroamericana durante la cosecha 2012-2013 fue en promedio del 15%, reportándose en El Salvador la epifitía más severa desde su ingreso. Desde que la roya del café apareció en Brasil, los ministerios de agricultura y organismos a cargo del sector café del área centroamericana iniciaron investigaciones orientadas a la evaluación de materiales brasileños con tolerancia a la roya del café. En 1978 se estableció el

Programa Regional para la Protección y Modernización de la Caficultura en Centroamérica y Panamá. Este programa produjo un cambio significativo en la forma de pensar de los investigadores en los países de la región; así se inició una fase de modernización y mejoramiento de la caficultura en Centroamérica.

(55)

### 3.3.1 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA ROYA

La roya del café es producida por un hongo que infecta las hojas. El proceso infectivo comienza cuando los síntomas de la enfermedad aparecen en la parte superior de las hojas y en el envés de las hojas, se observan manchas pálidas que con el tiempo aumentan de tamaño y se unen formando las características manchas amarillas o naranjas, con presencia de polvo fino amarillo, donde se producen las esporas del hongo (Ver Figura N°4). El hongo no rompe la epidermis de la hoja, como lo hacen la mayoría de las royas, sino que esporula a través de los estomas; o sea que este hongo no forma las pústulas típicas de las royas comunes.



**Figura N°4.** Desarrollo de la roya en hojas de cafeto <sup>(59)</sup>. A: Lesión inicial en el haz de la hoja; B: Inicio de la producción de urediosporas en el envés de la hoja; C: Lesión de roya del café en estado avanzado.

A inicios de la estación lluviosa las primeras lesiones aparecen en las hojas inferiores y la infección progresa lentamente hacia arriba en el árbol. Las hojas

infectadas caen prematuramente dejando largas extensiones de bandolas (ramas plagiotrópicas) desprovistas de hojas.

*Hemileia vastatrix* es un organismo biótrofo (parásito que se alimenta de las células vivas), también conocido como un parásito obligado, que parasita las hojas del género *Coffea*; es decir que se alimenta y completa su ciclo de vida en células vivas. De las especies cultivadas de café, la más atacada es *Coffea arabica*. <sup>(59)</sup>

El nombre genérico *Hemileia*, refleja la morfología característica “mitad suave, mitad rígida” de las supuestas esporas asexuales (o urediniósporas). Rajendren (1967) fue el primero en observar que la uredinióspora podía albergar un proceso de meiosis, dentro de la supuesta espora asexual, lo cual fue comprobado recientemente. <sup>(14)</sup>

Esta reproducción sexual escondida fue denominada criptosexualidad, y de la cual se piensa que puede tener implicaciones considerables, no solo para las futuras estrategias de cultivo del café, sino que también para la producción de café a largo plazo, al igual que el calentamiento global puede incrementar la cobertura de este, y así se empeora el impacto económico de la roya del café en los países donde se ha reportado la presencia de este fitopatógeno. <sup>(14)</sup>

### 3.3.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Hemileia vastatrix*

**Cuadro N°3.** Clasificación taxonómica de *Hemileia vastatrix*

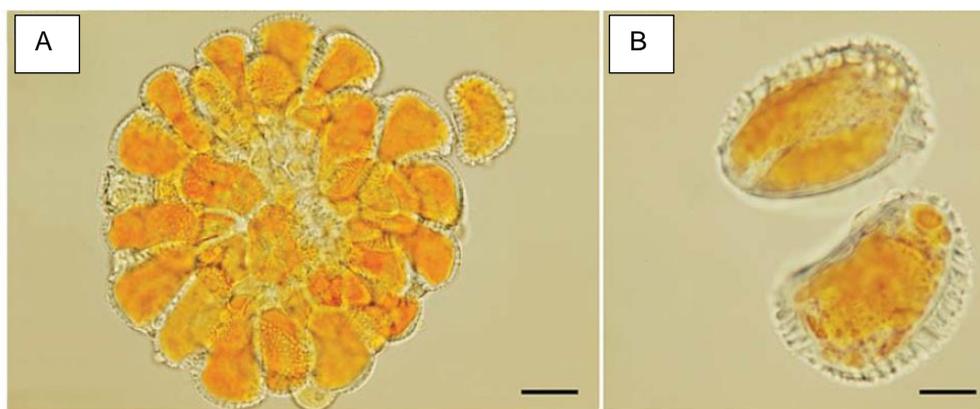
<b>Reino:</b>	Fungi	<b>Nombre común:</b> Roya del cafeto, roya del café, roya amarilla del café, roya anaranjada.
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota	
<b>Subphylum:</b>	Puccinioniomycotina	
<b>Clase:</b>	Urediniomycetes	

**Cuadro N°3.** Continuación

<b>Orden:</b>	Uredinales	<b>IDENTIDAD</b>
<b>Familia:</b>	Chaconiaceae	
<b>Género:</b>	<i>Hemileia</i>	
<b>Especie:</b>	<i>Hemileia vastatrix</i>	
		<b>Nombre:</b> <i>Hemileia vastatrix</i> Berkeley & Broome
		<b>Sinonimia:</b> <i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Br.

**3.3.3 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA**

Las esporas son de tamaño microscópico (30µm de largo x 20µm de ancho), de formas reniformes, lisas en la cara interna, y rugosas en la externa, denominadas uredosporas, (Ver Figura N°5), y son producidas en grandes cantidades, y corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas del café y es característico de esta enfermedad y que contienen gotículas de lípido carotenoides que imparte la coloración amarillo-naranja (51).



**Figura N° 5.** Micrografías de uredosporas de *Hemileia vastatrix* (51). A: estructuras de las esporas; B: pared verrugosa superior.

**3.3.4 PATOGENICIDAD DE LA ROYA Y DESARROLLO EN LA PLANTA DE CAFÉ**

El ciclo de *Hemileia vastatrix* inicia con el proceso de liberación y deposición de la espora en la hoja de café; posteriormente, la espora germina y se inicia el proceso de infección.

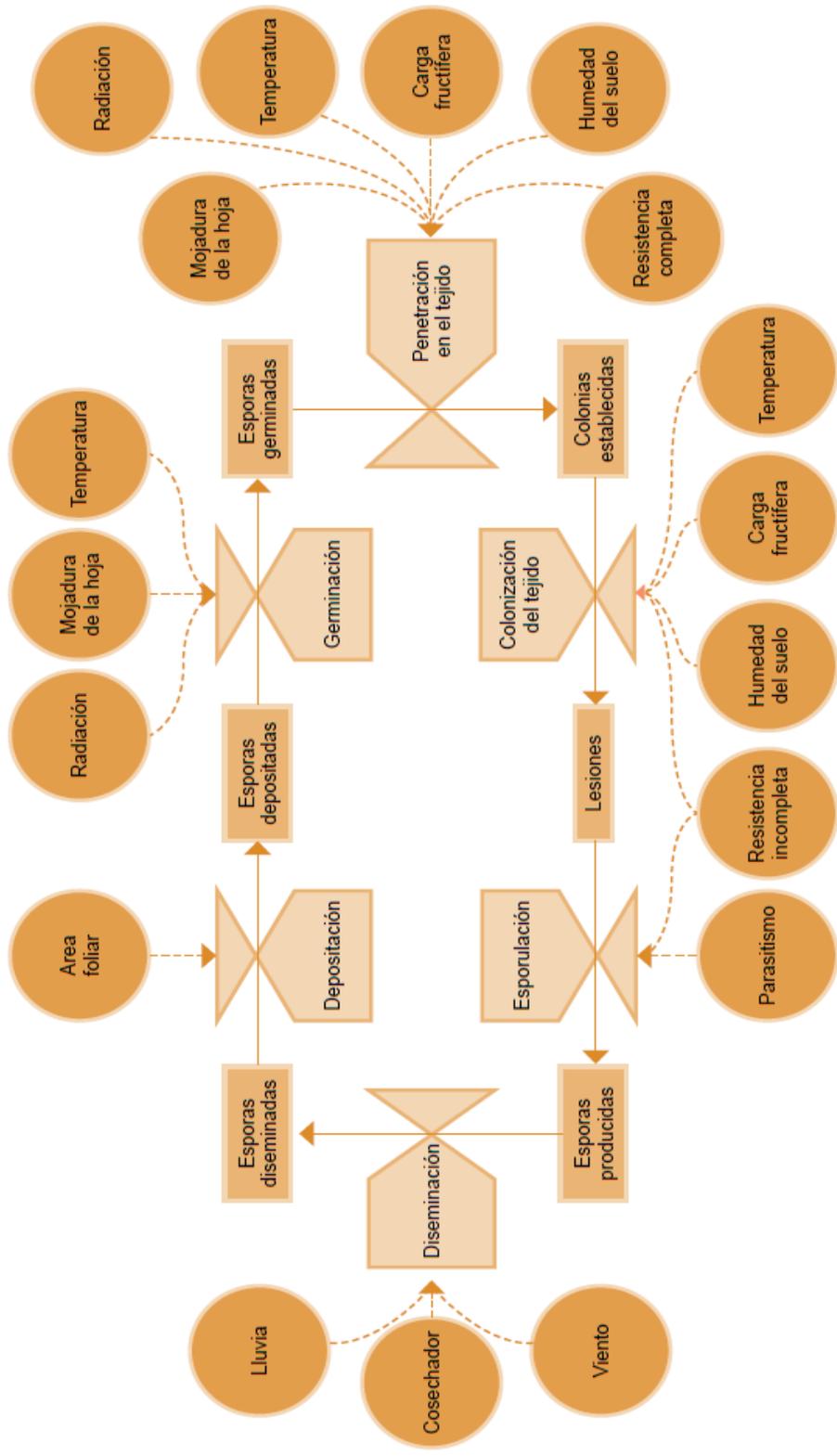
Recién en la tercera etapa se presentan los síntomas de la enfermedad, cuando aparecen las manchas de color amarillo pálido en el envés de las hojas que, con el tiempo, aumentan de tamaño y se unen formando las características manchas amarillas o anaranjadas con polvo fino amarillo que produce las nuevas esporas del hongo. El tiempo entre la germinación de la espora, penetración a los tejidos internos de la hoja e inicio de la producción de esporas oscila entre 20 a 40 días (Ver Figura N°6). Para la germinación de las esporas se requiere de la presencia de agua libre por lo menos durante seis horas, temperaturas entre 21-25 °C y condiciones de oscuridad. Para formarse el apresorio (modificación de las hifas para la infección de una célula epidérmica del huésped) se requiere de un periodo de entre 5,3 y 8,5 horas.

Luego de germinar, el hongo penetra en las hojas a través de los estomas (aberturas naturales usadas por las plantas para respiración y transpiración) situados en el envés de las hojas maduras.

Una vez que ha penetrado al interior de la hoja, el hongo desarrolla unas estructuras denominadas haustorios, los cuales entran en contacto con las células de la planta para extraer los nutrientes necesarios para su crecimiento.

La germinación se inhibe con la presencia de luz y falta de agua entre 24 y 48 horas; cuando se evapora o se reduce la disponibilidad de agua en la hoja se detiene el proceso de germinación, ya que afecta el crecimiento de los tubos germinativos de las esporas.

La concentración óptima de espora del hongo para que se produzca la infección debe ser de 15-30 esporas por centímetro cuadrado; si las esporas están demasiado dispersas no se produce la infección.



**Figura N° 6.** Diagrama del ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* (líneas continuas) y los factores que lo afectan (líneas discontinuas). <sup>(59)</sup>

Transcurridos 30 días después de la colonización, el hongo está lo suficientemente maduro para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son las encargadas de producir nuevas uredosporas. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de esporas se denomina periodo de latencia. (59)

### 3.3.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ROYA DEL CAFÉ

- **TEMPERATURA:** La temperatura óptima para el desarrollo de la roya del cafeto es de 22-23 °C, la cual favorece el proceso de germinación de la uredospora, la penetración a los tejidos y colonización de la hoja. El periodo de incubación de *Hemileia vastatrix* se acorta en los meses con temperaturas favorables para la germinación.
- **ALTITUD:** Esta se encuentra íntimamente relacionada al viento y la temperatura, ya que entre a más MSNM se encuentre el cultivo de cafeto, mayor será la velocidad del viento, favoreciendo así, la dispersión de uredosporas del hongo, mientras que a mayor altura, se obtienen las temperaturas óptimas para el desarrollo de la enfermedad.
- **LLUVIA Y ROCÍO:** Al presentarse lluvias, mejora la disponibilidad de agua en el ambiente y los tejidos vegetales (hojas, frutos y ramas) permanecen húmedos, lo que favorece la germinación de la uredospora de la roya del café y la proliferación de la infección por efecto de arrastre de las uredosporas. Las lluvias de baja intensidad contribuyen a limitar la dispersión de uredosporas de la roya; al contrario, las lluvias fuertes alientan la dispersión, por el impacto de las gotas grandes de agua en las hojas. De igual forma, La presencia o ausencia de rocío en las hojas de café puede ser un aspecto determinante para que las esporas del hongo puedan o no desarrollarse.

- SOMBRA: Bajo condiciones de sombra, las hojas se mantienen mojadas por más tiempo lo cual favorece la germinación de la uredospora, las temperaturas son cercanas a las óptimas para la germinación y penetración del hongo y hay una mayor humedad relativa. (59)

### 3.3.6 CONTROL BIOLÓGICO. (45)

En agricultura, el término Control biológico se aplica al uso de microorganismos antagonistas para suprimir enfermedades en los cultivos. Los principales mecanismos de control que utilizan las bacterias antagonistas son: (40)

**Antagonismo directo:** El patógeno se encuentra en contacto directo con el microorganismo antagonista y este logra su control por medio de hiperparasitismo o depredación.

**Antagonismo mixto:** El patógeno tiene contacto directo con el antagonista, sin embargo el control se logra por interferencia físico-química o por la producción de sustancias controladoras, como antibióticos y enzimas.

**Antagonismo indirecto:** En este tipo, el microorganismo ejerce control por medio de la competencia, ya sea de nutrientes o de espacio físico, o por la inducción de resistencia en la planta. (53)

Distintas especies de *Bacillus* son conocidas como agentes biocontroladores y es *Bacillus subtilis*, una de las especies más estudiadas en el control de enfermedades en plantas.

El mecanismo más conocido asociado con el efecto antagonista de este es la producción de metabolitos secundarios, como mecanismo de defensa en respuesta a otros microorganismos, entre los cuales se mencionan antibióticos, antifúngicos orgánicos volátiles, compuestos antivirales, y además promueve la

resistencia sistémica inducida (Capacidad de rizobacterias de promover el crecimiento de la planta). (13)

### 3.4 GENERALIDADES DE *Bacillus subtilis*

#### 3.4.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA. (34)

**Cuadro N°4. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis***

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacilliales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i>

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, aerobio facultativo comúnmente encontrada en el suelo. Es capaz de producir esporas en incubación en aerobiosis las cuales son termoresistentes y resistentes a factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. (46)(60)

*Bacillus subtilis* no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilinas y otros antibióticos de la familia iturinas. La subtilina secretada por *Bacillus subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos.

Se ha demostrado que al aplicarse en plantas induce resistencia sistemática natural contra el patógeno bacteriano y fungoso propiedad llamada resistencia sistemática Adquirida (SAR). Se utiliza industrialmente como bioinsecticida y biofungicida. En el cuadro N°2 se resumen las pruebas bioquímicas empleadas para identificar *Bacillus subtilis*.

**Cuadro N°5.** Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de *Bacillus subtilis*.

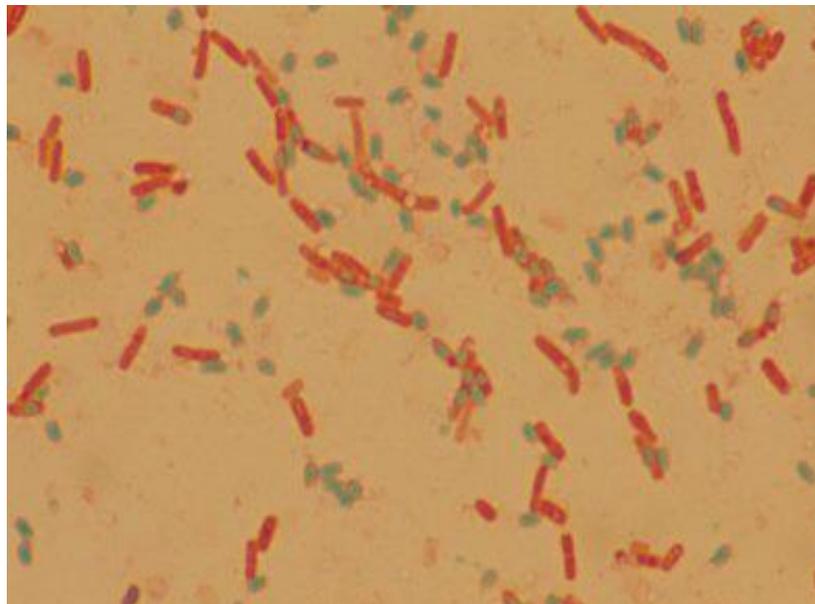
Prueba	Reacción	Prueba	Reacción
Catalasa	+	Rojo de Metilo	-
Coagulasa	-	TSI	V/A, el microorganismo puede fermentar glucosa y sacarosa. No hay producción de gas ni H <sub>2</sub> S
Nitratos	+	Fermentación de Glucosa	+
Motilidad	√	Fermentación de Manitol	+
Indol	+	Fermentación de Xilosa	-
Esculina	+	Fermentación de Maltosa	-
Urea	√	Hidrolisis de gelatina	+
V-P	+	Hidrolisis de Almidón	+
Citrato	+	Hidrolisis de Esculina	+

### 3.4.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS. (60)

Bacilos Gram positivos de aproximadamente 0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo, menores o iguales a 1  $\mu\text{m}$  de espesor, con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales o paracentrales que no deforman el soma bacteriano.



**Figura N°7.** Tinción de Gram de *Bacillus subtilis*



**Figura N°8.** Tinción de esporas de *Bacillus subtilis* por método de Shaeffer-Fulton

### 3.4.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS. (50)

Sus colonias se pueden observar redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café. Cultivadas en agar sangre se presentan como colonias de 2 a 4 mm de diámetro, que pueden ser de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.



**Figura N°9.** Cultivo de *Bacillus subtilis* en agar sangre. (50)

## 3.5 EFECTO ANTIFÚNGICO DE *Bacillus subtilis* CONTRA LA ROYA DEL CAFETO.

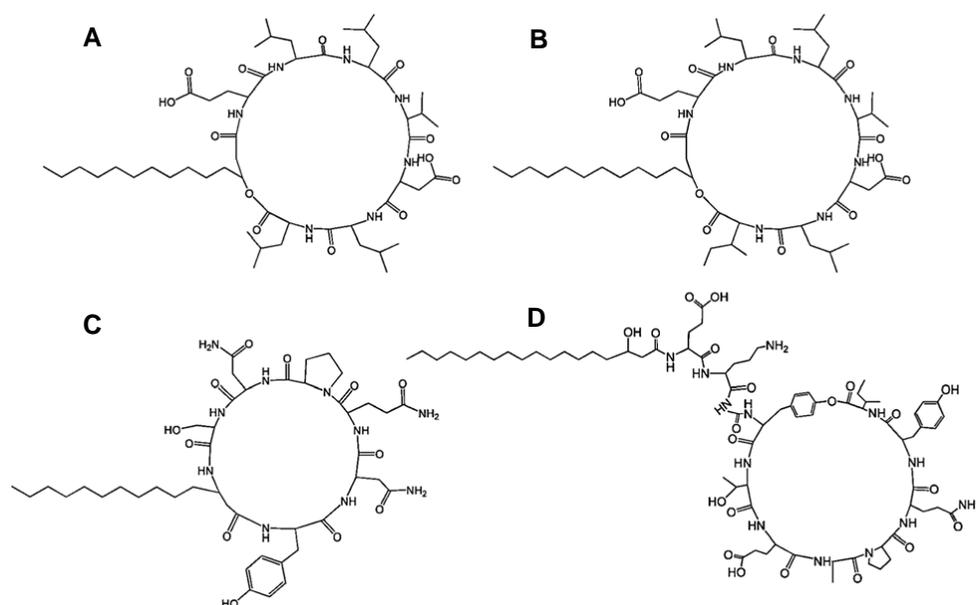
### 3.5.1 A TRAVÉS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Las cepas aisladas de *Bacillus* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, mayormente lipopéptidos, como la surfactina, iturina A y la fengicina. (54)

Las cepas aisladas de *Bacillus* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, mayormente lipopéptidos, como la surfactina, iturina A y la fengicina. (53)

En el contexto del control biológico de enfermedades de los cultivos, las tres familias de lipopéptidos de *Bacillus*, surfactina, iturinas y fengicinas han sido estudiadas por sus potenciales actividades antagónicas contra varios fitopatógenos. (31) Las surfactinas es la familia más estudiada de los lipopéptidos, tiene la habilidad de inducir resistencia sistémica en plantas y la propiedad para proliferar células bacterianas, facilitando así la colonización de la rizósfera.

La familia de las iturinas representada por la iturina A, micosubtilinas y baciliomicinas, muestran una fuerte actividad antifúngica. La iturina A purificada suprime el crecimiento de varios tipos de hongos en ensayos con placas. Aunque las surfactinas tienen una actividad antibiótica relativamente débil, la actividad antibiótica de la iturina A es muy fuerte.



**Figura N°10.** Estructuras de algunos lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis*: A) Surfactina, B) Lichenisina, C) Iturina A, D) Fengicina/Plipastatina A

Las fengicinas son una clase de lipopéptido bioactivo producido por algunas cepas de *Bacillus subtilis*, que demuestra actividad antifúngica contra los filamentos de los hongos.

Como la mayoría de péptidos naturales antimicrobianos, las fengicinas probablemente actúan haciendo la membrana plasmática de la célula objetivo más permeable.

Los lipopéptidos son conocidos por actuar de manera sinérgica, algunos estudios sugieren surfactinas con iturinas, surfactinas con fengicinas y fengicinas con iturinas. (53)

#### - MODO DE ACCIÓN

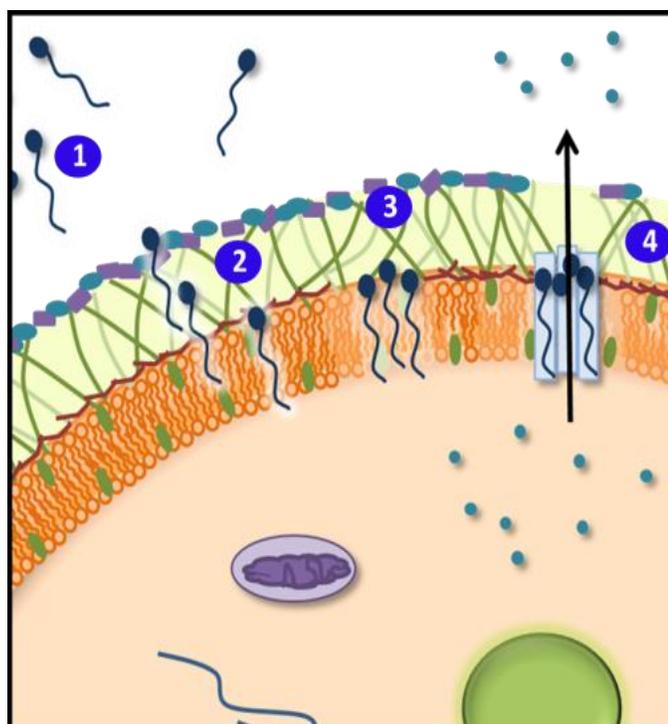
**Colonización de la rizosfera:** Se reporta que parte del mecanismo de biocontrol es adherirse a la superficie de las raíces y forma una biopelícula estable y no patogénica que permite la colonización de las superficies de las raíces para la secreción de un antibiótico, la surfactina. (30)

**Antagonismo:** Una vez establecido en la rizósfera, los aislados de *Bacillus* pueden desplegar todo su arsenal de antibióticos. La Iturina A muestra una fuerte actividad antibiótica con un amplio espectro antifúngico, haciéndola un agente ideal para el control biológico con el objetivo de reducir el uso de pesticidas en la agricultura.

La producción de iturina A es frecuentemente un factor muy importante con respecto a la actividad antimicótica. Ensayos de inhibición in vitro contra siete patógenos de cultivos probaron el rango de la capacidad antagonista de iturina A. (30) Todos los patógenos fueron afectados sin excepción, en comparación con

otros dos lipopéptidos: fengicinas y surfactinas, que no tuvieron mayor efecto en todos los patógenos. (26)(45)

La iturina A trastorna la membrana citoplasmática del hongo, creando canales a través de la membrana, lo cual permite la liberación de iones vitales como el  $K^+$  y la pérdida de contenido vesicular por desestabilización lipídica. (30)



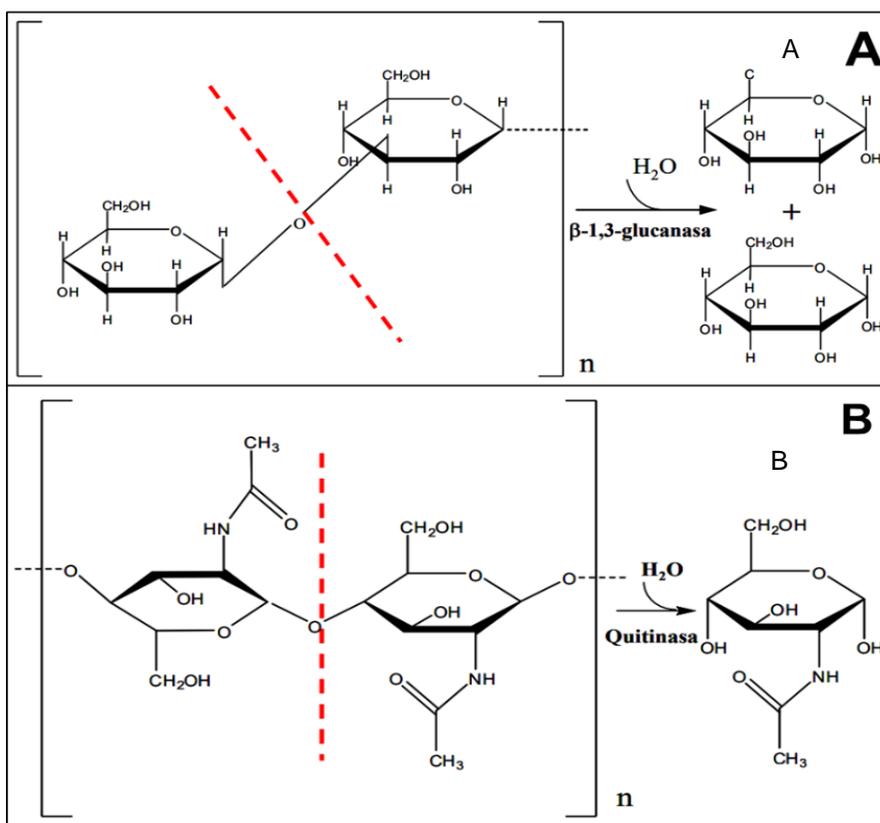
**Figura N°11.** Mecanismo de acción antifúngico de Iturina A

### 3.5.2 A TRAVÉS DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Las cepas de *Bacillus subtilis* son capaces de producir enzimas extracelulares que pueden ejercer su acción de distintas formas. Se reporta que las enzimas extracelulares actúan de manera sinérgica con los lipopéptidos, potencializando la actividad antifúngica. Un grupo de enzimas son capaces de degradar la pared celular de los hongos micromicetos fitopatógenos, por estar conformada en su

mayoría por  $\beta$ -1,3-glucano y quitina, siendo estos componentes hidrolizados por las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa respectivamente. Posteriormente, los lipopéptidos ejercen su acción directamente la membrana plasmática de la célula fungi. (35) (25) (22)

Por otra parte, se sugiere que otros tipos de enzimas, como lo son la amilasa, proteasa, pectinasa, y otras, contribuyen al crecimiento de rizobacterias, como el *Bacillus subtilis*, y se promueva el desarrollo de las plantas. (33) (25) (Ver Figura N°12)



**Figura N°12.** Actividad enzimática de la  $\beta$ -1,3-glucanasa (A) y Quitinasa (B). (19). Estas enzimas poseen la capacidad de hidrolizar los enlaces glicosídicos 1,3 y 1,4 presentes en los polisacáridos  $\beta$ -1,3-glucano y quitina respectivamente.

**CAPÍTULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación fue de carácter prospectivo y experimental.

- **Correlacional:** En esta investigación se determinó la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* sobre *Hemileia vastatrix*, relacionando las variables disminución de esporulación de *Hemileia vastatrix* y concentración bacteriana utilizada.
- **Experimental:** Se generaron y documentaron los resultados obtenidos de la investigación, como lo son el aislamiento y tipificación de *Bacillus subtilis* presente en el ambiente, como también la caracterización, la cual incluye la actividad antifúngica sobre *Hemileia vastatrix*.
- **Exploratorio:** El Salvador no posee un estudio previo sobre el uso de *Bacillus subtilis* como control biológico de la roya del café, por tanto, se pretende que este estudio de inicio a la investigación sobre su actividad antifúngica contra *Hemileia vastatrix*.
- **Prospectivo:** Los resultados obtenidos servirán a futuras investigaciones.

### 4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La investigación bibliográfica se realizó en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia
- Facultad de Ciencias Agronómicas
- Central
- Repositorio Institucional, Universidad de El Salvador

- Bases de datos de artículos científicos
- Internet

### **4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO**

- Universo

Plantaciones de cafeto variedad Pacamara presentes en el Campo Experimental de La Fundación Salvadoreña para Investigación del Café (PROCAFÉ) Santa Tecla.

- Muestra

Folíolos de cafeto variedad Pacamara susceptible al *Hemileia vastatrix*

### **4.4 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **4.4.1 GEOREFERENCIACIÓN**

Se realizó el proceso de georeferenciación del Campo Experimental de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café. Para dicho procedimiento se procedió a buscar las esquinas correspondientes al Campo para tomar las coordenadas de cada una de ellas en el sistema WGS84, con el GPS. Posteriormente, estas fueron documentadas y utilizadas para la elaboración del mapa georeferenciado con la colaboración de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de El Salvador (Ver Anexo N°1).

#### **4.4.2 MUESTREO, RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS**

Se realizó el reconocimiento del área de muestreo para contabilizar los árboles del *Coffea arabica* variedad Pacamara presentes en el campo experimental, obteniendo como resultado la existencia de veintiocho ejemplares, a los cuales

se les asignó un número de dos dígitos, iniciando desde el 01 hasta el 28 (Ver Anexo N°2).

Se estableció el tamaño de muestra de dieciocho arbustos, aplicando la fórmula estadística siguiente: <sup>(55)</sup>

$$n = \frac{N \times Z_a^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z_a^2 \times p \times q}$$

Dónde:

N = Tamaño de la población      q = Probabilidad de fracaso  
 n = Tamaño de la muestra      d = Precisión  
 p = Probabilidad de éxito

**Sustituyendo:**

$$n = \frac{28 \times 1.65^2 \times 0.75 \times 0.25}{0.1 \times (28 - 1) + 1.65^2 \times 0.75 \times 0.25} = 18$$

Dónde:	
N = 28	q = 0.25
n = 18	d = 0.1
p = 0.75	

#### - SELECCIÓN DE MUESTRAS <sup>(55)</sup>

La selección de los árboles a muestrear se realizó a través del muestreo aleatorio simple. Se empleó una tabla de números aleatorios la cual se obtuvo aplicando la función "ALEATORIO.ENTRE" de Microsoft Excel 2013 y estableciendo un rango de números entre 10,000 y 99,999 (Ver Anexo N°3), Cada columna de dicha tabla se examinó de forma vertical descendente, tomando en cuenta los

números contuvieran en sus dos últimos dígitos el código de muestra de un árbol de cafeto, ese árbol se tomó en cuenta para muestrearlo. Este proceso se repitió hasta obtener el número total de muestras, sin tomar en cuenta los números que no se incluyan en el rango 01 al 28, o si se repite el número de muestra seleccionada.

De dicho proceso, se seleccionaron los árboles a muestrear, los cuales se reflejan en la tabla N°1

**Tabla N°1:** Árboles de cafeto seleccionados para realización de muestreo

Número Muestra	Número Muestra	Número Muestra
01	10	21
02	14	22
03	15	24
04	16	25
05	17	26
08	20	27

- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS (Ver anexo N°4)

Posteriormente, se procedió a la recolección de muestras, teniendo en cuenta que los folíolos recolectados estuvieran aproximadamente de uno a dos metros de altura y procurando que el muestreo fuese en las primeras horas de la mañana para evitar que los distintos factores ambientales (temperatura, humedad, radiación UV, corrientes de aire) afectaran a la microflora presente sobre la superficie de las hojas de cafeto, y posteriormente se trasladaron las muestras al

laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES).

**NOTA ACLARATORIA:** tener en cuenta que los folíolos recolectados deben estar aproximadamente de uno a dos metros de altura y procurar que el muestreo se realice en las primeras horas de la mañana para evitar que los distintos factores ambientales (temperatura, humedad, radiación UV, corrientes de aire) afecten la microflora presente sobre la superficie de las hojas.

- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA <sup>(12)</sup> (Ver Anexo N°5 )

Se procesaron mediante la técnica de maceración, para ello, los folíolos recolectados se cortaron en trozos pequeños y se pesaron 25 g de hojas por cada punto de muestreo y se colocó la muestra en una bolsa plástica. Luego, se agregaron a 225 mL de Agua Peptonada Buferada suplementada con Fluconazol (APBF) a cada una de las muestras y se homogenizaron en stomacher a 260 rpm durante 2 minutos.

Posteriormente, se aplicó calentamiento a temperatura de 100°C para eliminar aquellas bacterias que se pudiesen encontrar en estado vegetativo y conservar únicamente las esporas de bacilos. Posterior al calentamiento, se procedió a incubar los macerados a 37°C durante 24 h.

Pasado el tiempo de incubación, se observó crecimiento de microorganismos en el medio APBF en forma de películas sobrenadantes, lo que indicó la presencia de microorganismos termófilos, siendo esta una característica propia de bacterias del género *Bacillus*.

Cada frasco fue agitado con el objetivo de romper la película formada, para posteriormente, ser sembrada en medio Agar Manitol Salado suplementado con

fluconazol (MSAF) mediante placa vertida y por extendido, estas placas se incubaron con el fin de obtener colonias aisladas de bacilos.

#### 4.4.3 MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA <sup>(50)</sup> (Ver Anexo N°6 )

Posterior al tiempo de incubación, se observó la morfología macroscópica de los crecimientos bacterianos y el viraje de color del agar manitol salado suplementado con fluconazol.

**NOTA ACLARATORIA:** El cambio de color del Agar Manitol Salado suplementado con Fluconazol (MSAF), de rojo a amarillo debido a la fermentación del manitol, se considera una prueba presuntiva a la presencia de *Bacillus subtilis*.

Como paso siguiente, se realizó la resiembra en Agar Trypticase Soya (TSA), incubándolo a temperatura de 37°C durante 24 horas para el estudio de la morfología macroscópica más a detalle, la posterior identificación microscópica y para realizar los procesos de cosecha y almacenamiento de los microorganismos obtenidos, en ultra congelación.

#### 4.4.4 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA <sup>(12)</sup> <sup>(23)</sup>

Posteriormente, se tomaron asadas de colonias aisladas para realizar la tinción de Gram. Así mismo, se realizaron resiembras en agar TSA inclinado para cultivar los microorganismos aislados y se incubaron durante 5 días para permitir la esporulación de la bacteria y realizar posteriormente la tinción de esporas. Dichos procedimientos se describen a continuación:

- TINCIÓN DE GRAM (Ver Anexo N°7)

Se realizó el procedimiento de fijación de la colonia en estudio previamente. Para ello, se colocó una gota de solución salada en un portaobjeto y una colonia en estudio fue tomada del cultivo en TSA en placa con un asa bacteriológica estéril, se resuspendió y se fijó al portaobjeto mediante flameo. Luego, se siguió la técnica de tinción de Gram y las muestras fueron observadas en el microscopio óptico convencional al objetivo de inmersión, para determinar el grosor de la pared celular de peptidoglicano mediante la coloración violeta característica de los microorganismos Gram (+), y la forma de la célula bacteriana.

- TINCIÓN DE ESPORAS <sup>(12)</sup> <sup>(23)</sup> (Ver Anexo N°8)

Para realizar esta tinción, se empleó el método de Schaeffer-Fulton, en la cual se utiliza el colorante verde de malaquita para teñir las endosporas bacterianas. Se utilizaron los microorganismos inoculados en TSA inclinado de 5 días de incubación. Se siguió la misma técnica de fijado establecida anteriormente. Como paso siguiente, se cortó un trozo de papel filtro a la medida del portaobjetos y se colocó sobre la fijación hecha anteriormente. Se procedió a agregar la solución de verde de malaquita hasta humedecer completamente el papel. Luego, la muestra fue calentada empleando baño de vapor durante un periodo de 5 a 10 minutos, teniendo en cuenta agregar más solución de verde de malaquita al evidenciar la evaporación de esta.

Después, la muestra fue enfriada, enjuagada con agua desmineralizada y se agregó la cantidad suficiente de safranina para cubrir completamente la fijación y se dejó reposar durante 1 minuto. Como pasos finales, se enjuagó nuevamente el portaobjetos con agua desmineralizada, se secó cuidadosamente y se observó

al microscopio en el objetivo de inmersión para verificar la presencia de endosporas bacterianas.

#### 4.4.5 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA <sup>(8)</sup> <sup>(54)</sup> (Ver Anexo N°9)

Posterior al análisis morfológico, se realizó la identificación bioquímica, en la cual, cada bacilo aislado se sometió a un set de trece pruebas bioquímicas con el fin de determinar cuáles de ellos correspondían al perfil bioquímico establecido para *Bacillus subtilis* en la bibliografía.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas fueron comparados con el perfil bioquímico de *Bacillus subtilis* (Ver Cuadro N°3).

**Cuadro N°6.** Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para *Bacillus subtilis*.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Catalasa	+	Fermentación Glucosa	+	Citrato	+
Nitratos	+			Indol	-
Motilidad	+	Fermentación Manitol	+	Esculina	+
RM	-	Fermentación Lactosa	-	Urea	+ ó -
VP	+	TSI	K/A, A/A		

#### 4.4.6 COSECHA DE *Bacillus sp* <sup>(12)</sup> (Ver Anexo N°10)

Posterior a las identificaciones morfológica y bioquímica, se tomaron colonias de la cepa seleccionada, y se transfirieron a 10 crioviales respectivos que contenían caldo CASOY + glicerol al 60% v/v. Una vez guardadas todas las cepas bacterianas, se procedió a almacenarlas a 5°C durante 24 horas y posteriormente a temperatura de -70°C en ultra congelador.

#### 4.4.7 CARACTERIZACIÓN <sup>(8)</sup> <sup>(41)</sup> <sup>(54)</sup>

Las cepas que presentaron las características bioquímicas correspondientes a *Bacillus subtilis*, fueron reanimadas previo a la realización de las pruebas de caracterización.

##### 4.4.7.1 CONTEO DE UFC/mL

###### 1) REANIMACIÓN DE LA BACTERIA AISLADA (Ver Anexo N°11)

Las cepas que presentaron las características bioquímicas correspondientes a *Bacillus subtilis*, fueron reanimadas previo a la realización de las pruebas de caracterización, tomando una alícuota de 20 µL de cada criovial conteniendo las cepas identificadas, y posteriormente inoculada en tubos conteniendo 5 mL de caldo CASOY para someterlos a incubación durante 24 h a temperatura de 37°C.

###### 2) SIEMBRA Y CONTEO DE LA CEPA BACTERIANA (Ver Anexo N°12)

Luego, de cada tubo, se tomaron asadas consecutivas y se inocularon tres tubos conteniendo Agar Tripticasa Soya (TSA) inclinado por cada cepa de *Bacillus subtilis*. Dichos tubos fueron incubados a 37°C durante 24 h, para obtener la biomasa deseada.

Posterior al tiempo de incubación, a cada aislado, se agregó 2 mL de solución salina estéril 0.9% y perlas de ebullición, con el objetivo de arrastrar toda la biomasa presente sobre el bisel del agar y poder suspenderla en dicha solución. Como siguiente paso, se mezcló el contenido de cada tríada de tubos, según cepa, para poder recoger los 6 mL de la suspensión madre. Después, se

elaboraron diluciones seriadas, desde la dilución  $10^{-1}$  hasta la dilución  $10^{-8}$  por cada cepa (Ver Anexo N°4) y se midieron y documentaron las absorbancias de las diluciones  $10^{-5}$  a la  $10^{-8}$ , empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm, y de estas diluciones, se tomaron alícuotas por duplicado, de 1 mL, se colocaron en placas Petri y se adicionaron 20 mL de Agar Plate Count, cada placa fue mezclada empleando la técnica del ocho. Las placas inoculadas se dejaron reposar hasta solidificación y posteriormente se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

Pasado el tiempo de incubación, se realizó el recuento en placa de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) obtenidas por cada cepa y se relacionaron las absorbancias de cada dilución con cada valor obtenido en el recuento, obteniéndose las curvas de calibración y las ecuaciones de la recta para cada cepa en estudio.

Para determinar las concentraciones, en UFC/mL de las suspensiones madre, se realizaron las lecturas de las absorbancias de estas y se sustituyeron respectivamente en las ecuaciones de la recta obtenidas para cada cepa.

#### 4.4.7.2 PRUEBAS ENZIMÁTICAS. <sup>(2)</sup> <sup>(33)</sup> (Ver Anexo N°13).

Se realizó este ensayo para determinar la producción de exoenzimas que tuvieran la capacidad de degradar los distintos sustratos presentes en el medio de cultivo. Para ello, se elaboraron los agares almidón, polisorbato 20, leche descremada y gelatina, para la determinar la producción de amilasa, lipasa, proteasa y gelatinasa respectivamente. Cada uno de ellos fue vertido en placas Petri, y posterior a su solidificación, se realizaron dos posillos por placa, empleando un horador de 5 mm.

Posteriormente, se prepararon suspensiones de las cepas seleccionadas a una concentración de  $10^8$  UFC/mL. Luego se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  y fueron

colocadas en cada uno de los posillos anteriormente elaborados en los agares almidón, polisorbato 20, leche descremada y gelatina. Luego estas placas fueron incubadas a una temperatura de 37°C por 24 h.

Como paso siguiente, se midieron los halos de hidrólisis sin la necesidad de emplear ningún reactivo revelador en el caso de los agares leche descremada, polisorbato 20 y gelatina, caso contrario con el agar almidón en el que fue necesario agregarle reactivo de Lugol. Las medidas de cada halo de hidrólisis fueron documentadas y promediadas.

#### 4.4.7.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO. <sup>(15)</sup> (Ver Anexo N°14).

De cada una de las suspensiones estandarizadas anteriormente, se elaboraron las diluciones necesarias hasta obtener una concentración de  $10^8$  UFC/mL.

Se prepararon 21 tubos conteniendo caldo CASOY y se inoculó a cada tubo 0.1 mL de la suspensión de concentración  $10^8$ , los tubos inoculados se agruparon en grupos de tres, para realizar por triplicado, las lecturas correspondientes a cada tiempo de incubación (0, 4, 24, 48, 72, 96 y 196 horas). Asimismo, se empleó un blanco para cada tiempo de muestreo, equivalente a 7 tubos sin inocular para cada cepa, sumando así un total de 28 tubos por cada cepa en estudio. Posteriormente a cada tiempo de incubación, se realizó la lectura de las absorbancias de cada muestra utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a 550 nm.

Los resultados obtenidos se sustituyeron en la ecuación de la curva de calibración para determinar la concentración a cada tiempo de muestreo. Luego, cada concentración obtenida fue promediada de acuerdo con el tiempo de incubación y según la cepa estudiada.

Como último paso, se procedió a calcular el logaritmo base 10 con los valores promediados anteriormente de cada cepa en estudio, con el fin de obtener las curvas de crecimiento microbiano

#### 4.4.7.4 ADHESIÓN A SOLVENTES ORGÁNICOS. <sup>(41)</sup> <sup>(52)</sup> (Ver Anexo N°15).

Se inoculó 1 mL de suspensión madre estandarizada de cada cepa en estudio en frascos conteniendo 99 mL de caldo CASOY. Dichos frascos fueron incubados durante 48 h a una temperatura de 37°C. Luego, cada suspensión fue transferida a tubos cónicos para ser centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos con el fin de separar toda la biomasa del caldo.

Como paso siguiente, este medio líquido fue decantado y la pastilla obtenida fue lavada con solución tampón PUM y centrifugada a las mismas condiciones descritas anteriormente; los procesos de lavado y centrifugado se realizaron dos veces.

Posteriormente, se agregaron 30 mL de solución tampón PUM a la pastilla obtenida anteriormente lavada, y esta fue resuspendida empleando agitación mediante vórtex, a continuación, se midió la absorbancia correspondiente empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

Después se tomaron tres alícuotas de 3 mL de cada una de las suspensiones y 1 mL de cada uno de los solventes en estudio: xileno, tolueno y cloroformo, y fueron colocados en tubos con rosca para realizar el proceso de agitado empleando un vórtex durante 2 minutos.

Luego, estos fueron incubados a temperatura ambiente durante 20 minutos con el fin de permitir la separación de las fases orgánica y acuosa. Como último paso, se tomó una alícuota de 1 mL de la fase acuosa y nuevamente se tomó la absorbancia de esta. Cabe mencionar que la toma de absorbancia post-mezcla se realizó por triplicado.

Con dichas absorbancias se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de adherencia a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Adherencia} = \frac{A_{1550} - A_{0550}}{A_{0550}} \times 100$$

Dónde:

$A_{0550}$ : Absorbancia obtenida de la fase acuosa a 550 nm antes de mezclar con cada solvente.

$A_{1550}$ : Absorbancia obtenida de la fase acuosa a 550 nm después de mezclar con el solvente orgánico en estudio.

#### 4.4.7.5 PRUEBA DE TOLERANCIA A pH. <sup>(41)</sup> (Ver Anexo N°16).

Se armaron sets de 14 tubos, para cada cepa bacteriana, contiendo cada uno 5 mL de caldo CASOY, de los tubos anteriores, se tomaron 2 para cada nivel de pH de un rango de 4 a 10. Cada set fue inoculado con 0.1 mL de suspensión  $10^8$  UFC/mL de cada cepa y fueron mezclados empleando un vórtex. Luego fueron incubados a temperatura de 37°C durante un periodo de 24 – 48 h. Se realizó una lectura cada 24 h con el fin de obtener los datos necesarios para determinar la resistencia de cada cepa aislada a los distintos niveles de pH analizados.

**NOTA ACLARATORIA:** para elaborar cada nivel pH agregar a los tubos conteniendo 10 mL de caldo CASOY la cantidad suficiente de HCl o NaOH según sea el caso.

#### 4.4.7.6 PRUEBA DE TOLERANCIA A TEMPERATURAS. <sup>(60)</sup> (Ver Anexo N°17).

Se armaron sets de 12 tubos conteniendo cada uno 5 mL de caldo CASOY, y estos fueron inoculados con suspensiones de concentración  $10^8$  UFC/mL por

cada cepa en estudio. Se agregó una alícuota de 0.1 mL de dicha suspensión a cada uno de los tubos de los sets armados para luego ser mezclados por 30 segundos empleando un vórtex. Luego se tomaron dos tubos de cada cepa y fueron incubados a 37°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C y 70°C durante 24 – 48 h, teniendo el cuidado de realizar lectura de los tubos cada 24 horas

#### 4.4.7.7 EVALUACIÓN DE EFECTO ANTI FÚNGICO DEL *Bacillus subtilis* SOBRE EL HONGO DE LA ROYA DEL CAFETO

- PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES BACTERIANAS DE *Bacillus subtilis*. (Ver Anexo N°18). <sup>(9)</sup> <sup>(17)</sup>

Se tomaron alícuotas de 1 mL de la suspensión madre de cada cepa en estudio y fueron colocadas en frascos Erlenmeyer conteniendo 200 mL del medio de fermentación.

Estos fueron homogenizados y posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL de dicho medio inoculado, por cada cepa, para determinar la absorbancia de estos empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm, y empleando como blanco el mismo medio de fermentación sin inocular. Posteriormente, estos fueron incubados durante 14 días a una temperatura de 37°C

Después del tiempo de incubación, se tomó nuevamente 1 mL de cada frasco Erlenmeyer y se midió nuevamente la absorbancia. Los resultados de las absorbancias se sustituyeron en las ecuaciones obtenidas en el conteo de las cepas de *Bacillus subtilis*, con el fin de obtener la concentración en UFC/mL, de cada cepa de bacteriana en estudio.

Luego, se realizaron las diluciones necesarias para obtener cuatro concentraciones de cada cepa de *Bacillus subtilis*:  $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^6$ , y  $10^4$  UFC/mL,

las cuales serían ensayadas para determinar la actividad antifúngica contra *Hemileia vastatrix* de cada cepa a distintos niveles de concentración.

- DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN ANTIFÚNGICA EFICAZ DE *Bacillus subtilis* CONTRA EL HONGO *Hemileia vastatrix*. (Ver Anexo N°19). (20) (26)

Se colectaron folíolos que presentaran pústulas anaranjadas en el envés de las hojas, características del *Hemileia vastatrix*. Una vez trasladados al laboratorio, estos fueron raspados con una espátula plástica para obtener las esporas de dicho hongo, y fueron colocadas en tubos conteniendo agua bufferada. Luego, se tomó una alícuota de 1 mL y fue colocada en una cámara de Neubauer para realizar el recuento de las esporas, observándolas al objetivo 40x en un microscopio óptico compuesto.

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 0.1 mL de esta suspensión y fueron colocadas en placas Petri conteniendo agar 1.5%, y después se inoculó 0,1 mL de la suspensión de *Bacillus subtilis* sobre la alícuota antes colocada. Este proceso se realizó por duplicado según la concentración de cada suspensión bacteriana.

Concomitantemente, se realizó el ensayo de los controles positivo y negativo, los cuales fueron inoculados con la suspensión de *Hemileia vastatrix* de la misma forma descrita anteriormente, y siendo aplicado en el control positivo, 0.1 mL de una solución de Sulfato de Cobre Pentahidratado al 1% P/V, mientras que, al control negativo, no se le aplicó tratamiento alguno.

Las placas se dejaron reposar hasta que el diluyente fue absorbido por el agar, y se procedió a sellar cada una de las placas con Parafilm, para luego ser incubadas a temperatura ambiente durante 24 – 48 h, siendo las 48 horas el tiempo máximo de incubación. Como último paso, se realizó el conteo de las

esporas del hongo, tanto las germinadas, como las no germinadas, utilizando un microscopio estereoscópico. Con los resultados obtenidos, se procedió a calcular los porcentajes de crecimiento e inhibición de cada uno de los ensayos realizados, empleando las siguientes fórmulas:

Porcentaje de inhibición

$$\% I = \frac{EG C(-) - EG Tx}{EG C(-)} X 100$$

Dónde:

EG C (-): Número de esporas germinadas control negativo

EG Tx: Número de esporas germinadas por tratamiento

Porcentaje de germinación

$$\%G = \frac{EG}{ET} X 100$$

Dónde:

EG: Número de esporas germinadas

ET: Número de esporas totales presentes en el campo observado

Para determinar la efectividad de los tratamientos de *Bacillus subtilis*, se compararon los resultados de los tratamientos bacterianos, con el porcentaje de inhibición obtenido con la solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1% mediante la prueba de t de student.

A partir de este estudio se plantearon las dos hipótesis de estudio:

- **Hipótesis nula o H<sub>0</sub>:** No existe diferencia significativa entre el tratamiento con sulfato de cobre y el tratamiento con *Bacillus subtilis*.
- **Hipótesis alternativa o H<sub>1</sub>:** Existe diferencia significativa entre el tratamiento con sulfato de cobre y el tratamiento con la cepa de *Bacillus subtilis en estudio*.

Si el valor absoluto de la  $t$  experimental (estadístico  $t$ ) obtenido, es menor que la  $T$  de tablas, se aprueba la hipótesis nula, es decir, se puede afirmar que no hay diferencia significativa entre el tratamiento bacteriano y el tratamiento con sulfato de cobre al 1%. Si por el contrario, la  $t$  experimental obtenida es mayor que la  $t$  de tablas, se puede afirmar que existe diferencia entre ambos tratamientos.

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSION**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento de cepas de *Bacillus subtilis* aplicando la técnica de macerado de hojas de cafeto.

#### 5.1.1 Recolección de muestras.

Las muestras fueron recolectadas en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones en Café (PROCAFÉ) (Ver Anexo N°20). Se obtuvieron un total de 18 muestras correspondientes a folíolos de cafeto infectados con Roya. Las muestras fueron colectadas en bolsas tipo Ziploc y se rotularon con Fecha, lugar y número de muestra.

#### 5.1.2 Aislamiento de *Bacillus subtilis* a partir de hojas de cafeto.

La supervivencia a condiciones extremas es una característica de los microorganismos formadores de esporas. En este experimento, la aplicación de calor, permitió eliminar los microorganismos que se encontraban en su forma vegetativa sobre la superficie de los folíolos de cafeto recolectados (Ver Anexo N°20), y añadiendo fluconazol en los medios de cultivo, se garantiza la obtención de cultivos bacterianos, sin la presencia de otro tipo de microorganismos, como mohos y/o levaduras.

Con dicha técnica, se logró el aislamiento de microorganismos termófilos de todas las muestras recolectadas, evidenciándose crecimiento, posterior al tiempo de calentamiento a 100°C y al subsecuente período de enriquecimiento de 24 h. Las colonias obtenidas presentaron morfología macroscópica y resultados positivos en la prueba presuntiva de fermentación de manitol, lo que indica la presencia de bacterias del género *Bacillus* (Ver Anexo N°21).

### 5.2 Identificación morfológica y bioquímica de las cepas de *Bacillus sp.* obtenidas de las hojas de cafeto previamente maceradas.

### 5.2.1 Morfología macroscópica

De las dieciocho muestras, diecisiete cepas presentaron la morfología macroscópica característica a *Bacillus sp.*, siendo la cepa con código de aislado N°25 la que no cumple con lo descrito en la bibliografía <sup>(49)</sup> (Ver Tabla N°2).

**Tabla N° 2.** Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en TSA.

CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
01		Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoide o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias irregulares, planas, borde filamentosos, color beige, superficie mate, opacas.	Conforme
02			Colonias irregulares, elevadas, borde ondulado, color crema, superficie opaca, de consistencia cética.	Conforme
03			Colonias irregulares, plana, borde liso, color beige, superficie mate, opacas, de consistencia seca.	Conforme

Tabla N° 2. Continuación

CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
04		Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias circulares, plana, borde liso, color blanco, superficie mate, translúcidas, de consistencia mixta.	Conforme
05			Colonias de forma irregular, plana, borde liso, color beige, superficie opaca y consistencia viscosa.	Conforme
08			Colonias irregulares, elevadas, borde lobulado, color blanco, superficie mate, opacas, de consistencia viscosa.	Conforme
10			Colonias irregulares, elevadas, borde lobulado, color beige, superficie mate, opacas, de consistencia viscosa.	Conforme

Tabla Nº 2. Continuación

CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
14		Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoide o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias irregulares, planas, de borde ondulado, color blanco, superficie mate, opacas, de consistencia viscosas.	Conforme
15			Colonias circulares, planas, de borde ondulado, color blanco, superficie mate, opacas, de consistencia untuosa.	Conforme
16			Colonias irregulares, planas, de margen lobulado, color blanco, de superficie brillante, translúcida, de consistencia membranosa.	Conforme
17			Colonias circulares, planas, borde ondulado, color amarillo, de superficie mate y consistencia untuosa.	Conforme

Tabla Nº 2. Continuación

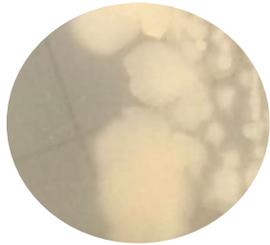
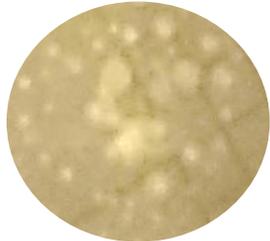
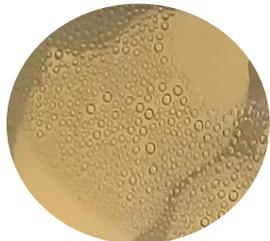
CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
20		Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoide o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias circulares, planas, de borde ondulado, color blanco, superficie mate, opacas, de consistencia viscosa.	Conforme
21			Colonias de forma irregular, planas, de bordes ondulados, de color blanco, superficie mate, opacas. De consistencia quebradiza.	Conforme
22			Colonias de forma irregular, planas, de bordes ondulados, blancas, de superficie levemente brillante, opacas, de consistencia untuosa.	Conforme
24			Colonias de forma irregular, planas, bordes lobulados, de color blanco hueso, superficie mate, opacas y de consistencia untuosa.	Conforme

Tabla Nº 2. Continuación

CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
25		Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias puntiformes, planas, borde liso, color beige, levemente traslúcida, de consistencia untuosa.	No Conforme
26			Colonias irregulares, planas, borde ondulado, color beige, mate, opacas, de consistencia cerosa.	Conforme
27			Colonias irregulares, planas, borde liso, color beige, mate, opacas, de consistencia cerosa.	Conforme

## 5.2.2 Morfología Microscópica

### 5.2.2.1 Tinción de Gram

La identificación microscópica se realizó utilizando el método de tinción de Gram, utilizando el cultivo de cada microorganismo empleado para la morfología

macroscópica, con 24 horas de edad. Las dieciocho cepas aisladas presentaron la morfología microscópica característica a bacterias del género *Bacillus*, la cual consiste en bastones largos Gram positivos, de acuerdo a lo establecido la bibliografía <sup>(50)</sup> (Ver Tabla N°3).

**Tabla N° 3.** Morfología microscópica a través de la tinción de Gram de los microorganismos aislados vistas al 100x

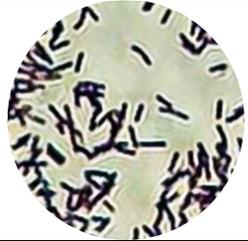
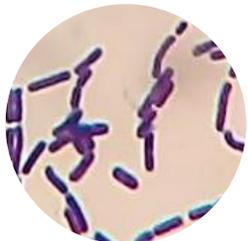
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
01		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos.	Conforme
02		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos.	Conforme
03		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos.	Conforme
04		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos, que se presentan en forma de cadena.	No Conforme

Tabla Nº 3. Continuación

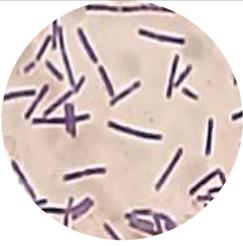
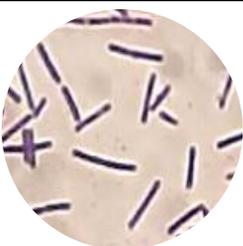
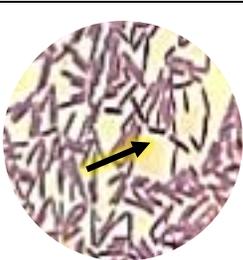
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
05		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondos.	Conforme
08		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondos.	Conforme
10		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondos.	Conforme
14		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondos	Conforme
15		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondo se presentan en forma de cadena.	Conforme

Tabla Nº 3. Continuación

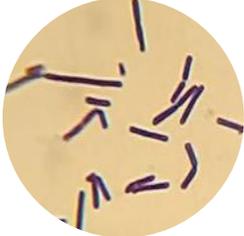
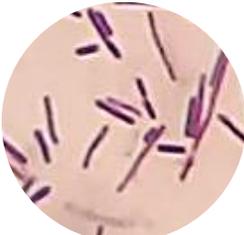
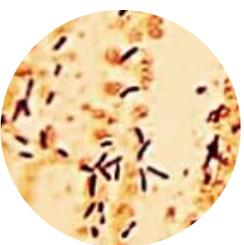
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	CONCLUSIÓN
15		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondo se presentan en forma de cadena.	Conforme
16		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos positivos, redondo.	Conforme
17		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondo, que se presentan en forma de cadena.	Conforme
20		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos	Conforme
21		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, redondo se presentan en forma de cadena.	Conforme

Tabla Nº 3. Continuación

CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	CONCLUSIÓN
22		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, borde redondo se presentan en forma de cadena.	Conforme
24		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, borde redondo se presentan en forma de cadena.	Conforme
25		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos	Conforme
26		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos	Conforme
27		Bacilos Gram positivos de bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos	Conforme

### 5.2.2.2 Tinción de esporas

Se puede observar que todas las cepas aisladas presentaron la capacidad de formar esporas, la identificación se realizó a través de la coloración con verde de malaquita. <sup>(23)</sup>, presentándose las cepas 01, 15, 21, 22, 24, 26 y 27 como esféricas; en cambio, las cepas 02, 03, 04, 05, 08, 10, 14, 16, 17, 20 y 24 presentaron esporas elipsoidales centrales que no deformaron el cuerpo bacteriano (Ver Tabla N°4)

**Tabla N° 4.** Morfología microscópica de esporas de los microorganismos aislados vistas al 100x

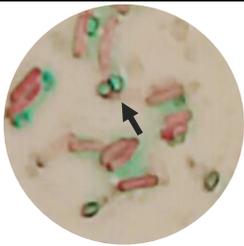
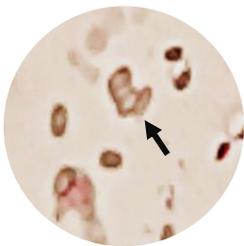
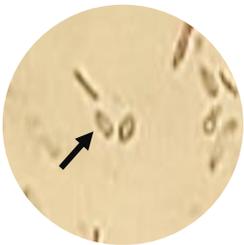
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
01		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al bacilo.	No conforme
02		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales, que no deforman al bacilo.	Conforme
03		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme

Tabla N°4. Continuación

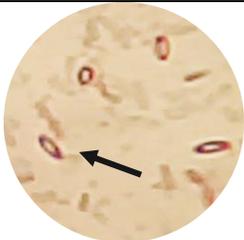
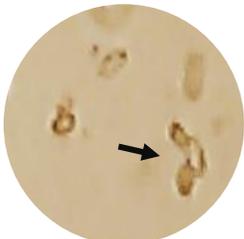
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	DICTAMEN
04		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme
05		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme
08		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que deforman al bacilo.	No conforme
10		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme
14		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme

Tabla N°4. Continuación

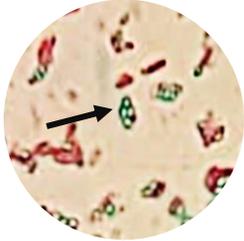
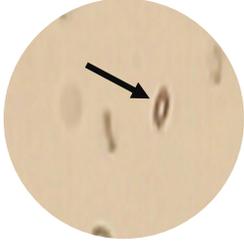
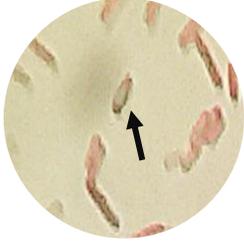
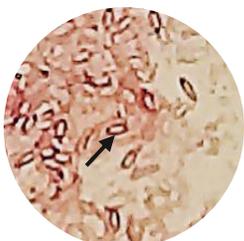
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	CONCLUSIÓN
15		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	No conforme
16		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme
17		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que deforman al bacilo.	No conforme
20		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales centrales que no deforman al bacilo.	Conforme

Tabla N°4. Continuación

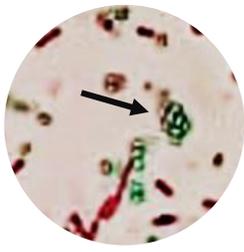
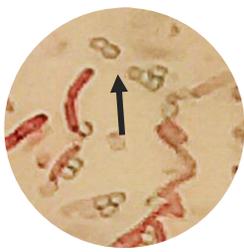
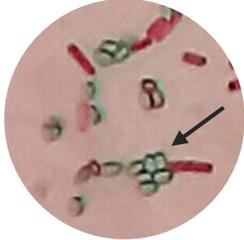
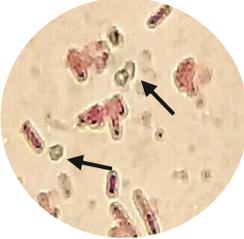
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	CONCLUSIÓN
21		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	No conforme
22		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	No conforme
24		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	No conforme
25		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas elipsoidales que no deforman al soma bacteriano.	Conforme

Tabla N°4. Continuación

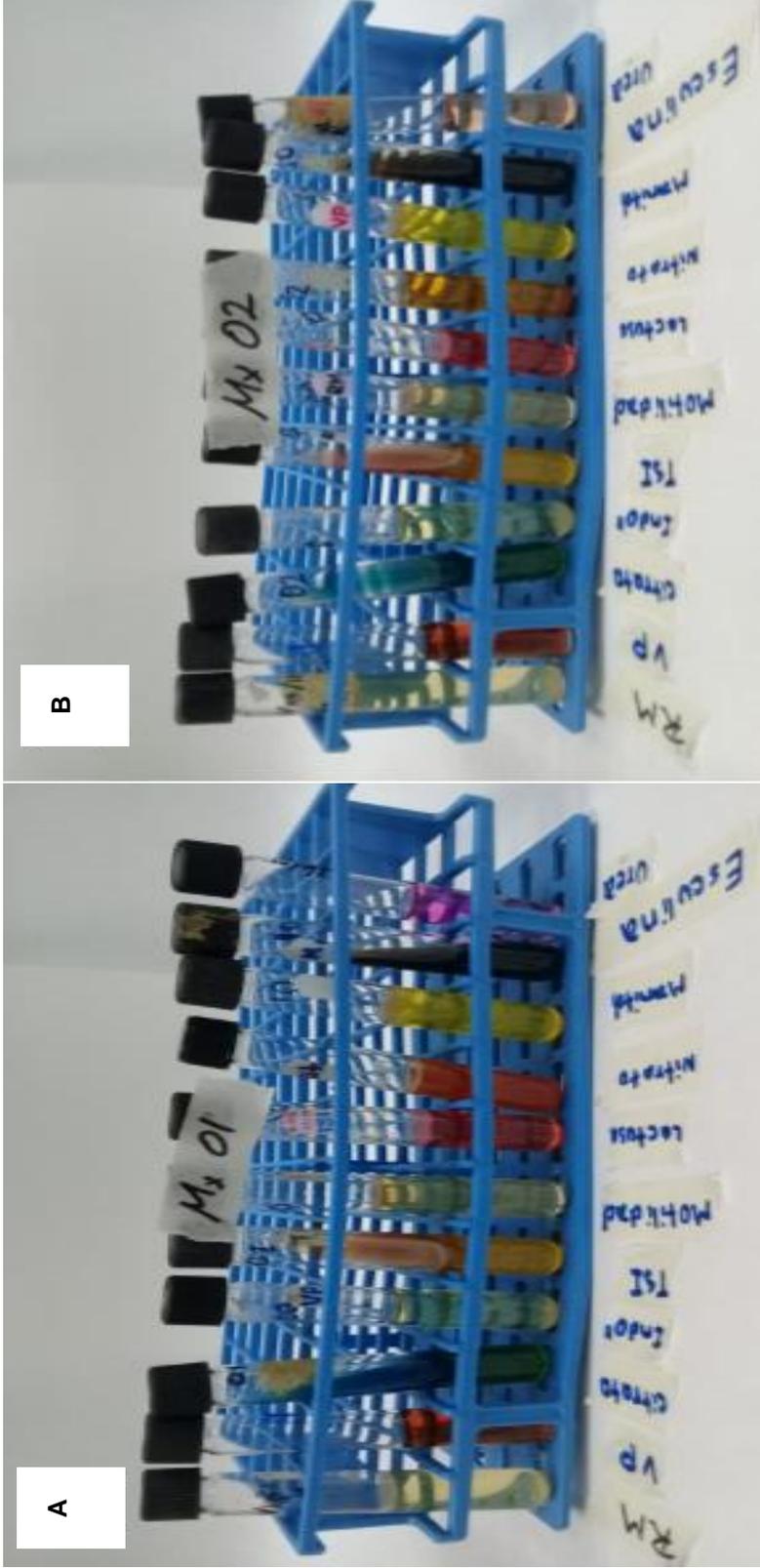
CÓDIGO DE AISLADO	TINCIÓN DE GRAM	ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	CONCLUSIÓN
26		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	No Conforme
27		Esporas elipsoidales centrales que no deforman el cuerpo bacteriano	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	No conforme

### 5.2.3 Identificación bioquímica.

Posterior al análisis morfológico, se realizó la identificación bioquímica, en la cual, cada bacilo aislado se sometió a un set de once pruebas bioquímicas (Ver Figura N°13).

De todos los bacilos aislados, el 22.2% cumplió con todo el perfil bioquímico establecido para *Bacillus subtilis* (60), siendo estas seleccionadas para realizar las pruebas de caracterización microbiológica y para determinar la actividad antifúngica contra *Hemileia vastatrix*.

En la Tabla N° 5 se pueden observar los resultados obtenidos para las 18 cepas estudiadas.



**Figura N°13.** Pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos aislados 01 y 02. De izquierda a derecha: Rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP), citrato, indol, hierro tres azúcares (TSI, Siglas en inglés), Motilidad, fermentación de lactosa, reducción de nitratos, fermentación de manitol, hidrólisis de esculina y prueba de ureasa. A: Prueba de ureasa positiva; B: Prueba de ureasa negativa.

**Tabla N°5.** Resultados de las pruebas bioquímicas de los bacilos aislados

Prueba/MX	Resultado	01	02	03	04	05	08	10	14	15
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Rojo de metilo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
VP	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Motilidad	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+), H <sub>2</sub> S	(+)	(+)	(+)	(+)
Citrato	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+),d	(+)	(+)	(-)	(+)
Indol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Azúcar	(variable/A)	(K/A)	(K/A)	(A/A)	(A/A)	(A/A)	(K/A)	(K/A)	(A/	(A/A)
H <sub>2</sub> S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)
CO <sub>2</sub>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Motilidad	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+),H <sub>2</sub> S	(+)	(+)	(+)	(+)
Lactosa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Nitrato	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Manitol	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Esculina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Urea	Variable	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Cepa Candidata	-----	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO

**Tabla N°5. Continuación**

Prueba/MX	Resultado	16	17	20	21	22	24	25	26	27
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Rojo de metilo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
VP	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Motilidad	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Citrato	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+), d	(-)	(-)	(+)
Indol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Azúcar	(variable/A)	(A/A)	(A/A)	(A/A)	(K/A)	(K/A)	(K/A)	(A/A)	(K/A)	(K/A)
H <sub>2</sub> S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CO <sub>2</sub>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Motilidad	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Lactosa	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Nitrato	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
Manitol	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Esculina	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+),d	(+)	(+)	(+)
Urea	Variable	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Cepa Candidata	-----	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI

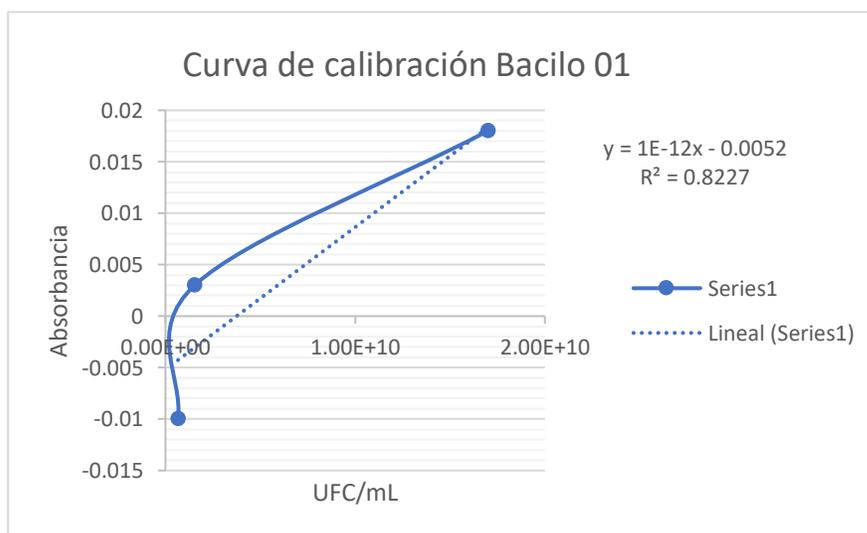
### 5.3 Caracterización de las cepas candidatas características pertenecientes a *Bacillus subtilis*.

#### 5.3.1 Conteo de la cepa bacteriana

Se realizó el recuento en placa de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de las diluciones  $10^{-5}$  a la  $10^{-8}$ . (Ver Anexos N°22 y N°23). Se elaboraron las curvas de calibración utilizando el programa Microsoft Office 2013, relacionando la absorbancia de cada dilución con cada valor obtenido del recuento en placa (Ver tablas N°6 a N°9), para posteriormente, determinar la ecuación de la recta para cada cepa en estudio (Ver Figuras N°14 a N°17).

**Tabla N° 6.** Conteo y absorbancias del Bacilo 01

BACILO 01				
Dilución	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Absorbancia	-----	0.01	0.003	0.018
UFC/mL	-----	$6.62 \times 10^8$	$1.54 \times 10^9$	$1.70 \times 10^{10}$



**Figura N° 14.** Curva de calibración de Bacilo 01

Ecuación de la recta del Bacilo 01:

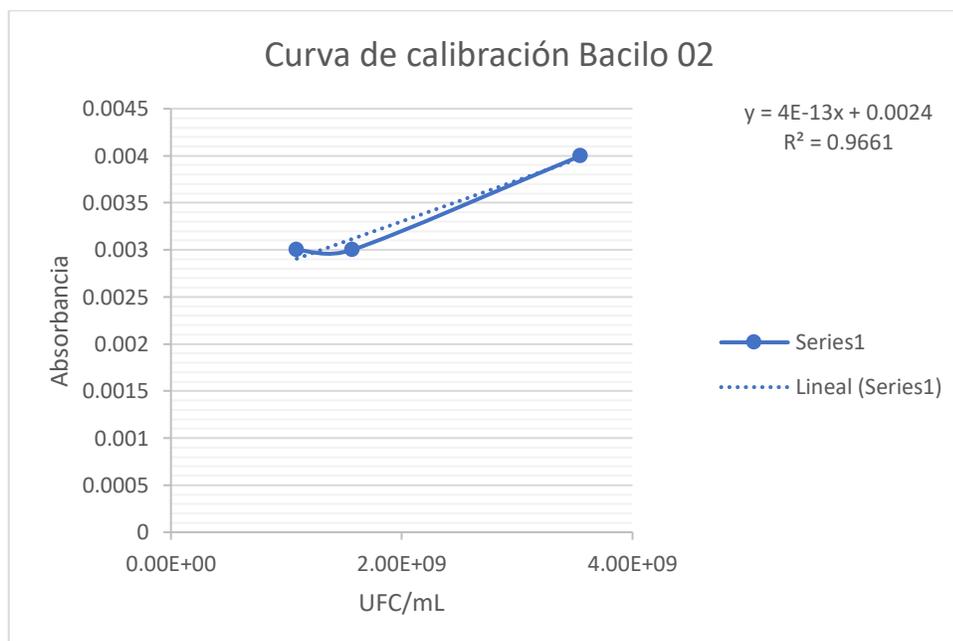
$$Y_{abs} = 1.00 \times 10^{-12} X_{UFC/mL} - 0.0052_{abs}$$

Absorbancia suspensión madre: 1.603

Concentración suspensión madre:  $1.61 \times 10^{12}$  UFC/mL

**Tabla N°7.** Conteo y absorbancias del Bacilo 02

BACILO 02				
Dilución	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Absorbancia	-----	0.003	0.003	0.004
UFC/mL	-----	$1.09 \times 10^9$	$1.57 \times 10^9$	$3.55 \times 10^9$



**Figura N° 15.** Curva de calibración de Bacilo 02

Ecuación de la recta del Bacilo 02:

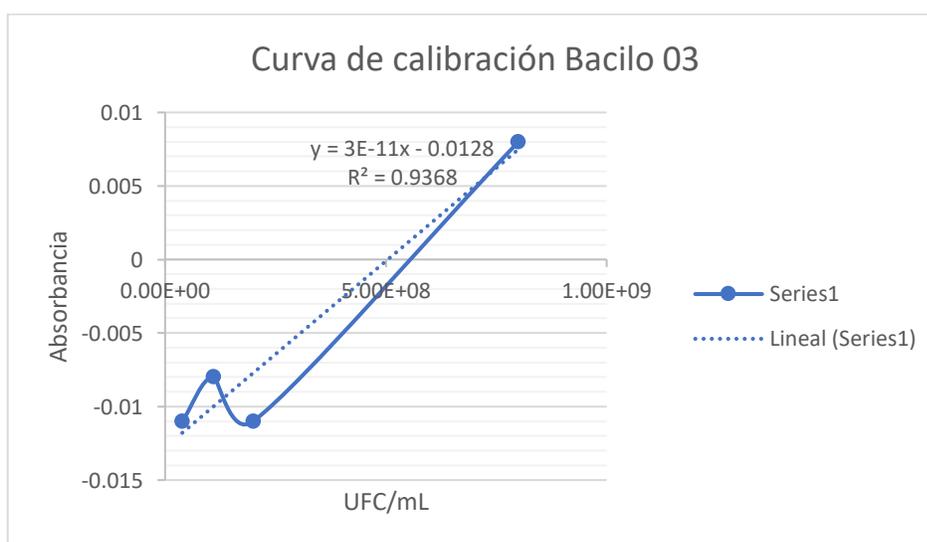
$$Y_{abs} = 4.00 \times 10^{-13} X_{UFC/mL} + 0.0024_{abs}$$

Absorbancia suspensión madre: 0.84

Concentración suspensión madre:  $2.09 \times 10^{12}$  UFC/mL

**Tabla N°8.** Conteo y absorbancias del Bacilo 03

BACILO 03				
Dilución	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Absorbancia	-0.011	-0.008	-0.011	0.008
UFC/mL	$3.88 \times 10^7$	$1.10 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$



**Figura N° 16.** Curva de calibración de Bacilo 03

Ecuación de la recta del Bacilo 03:

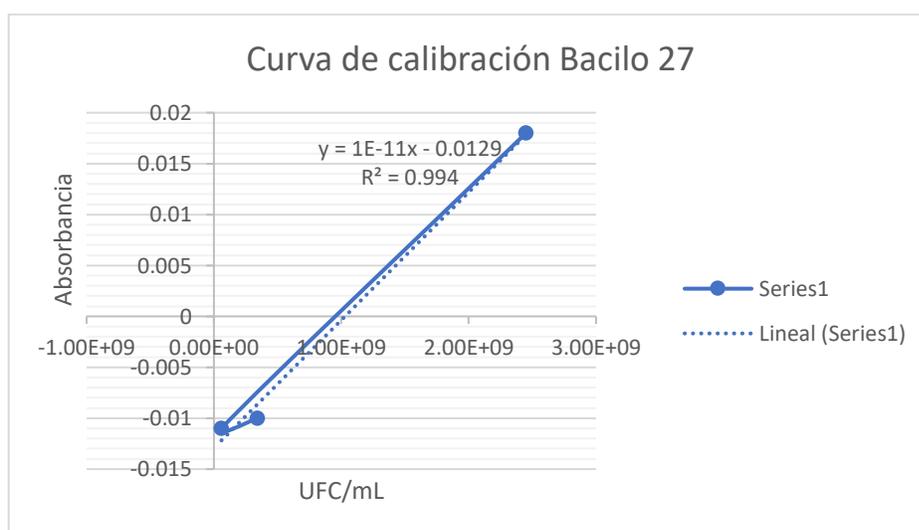
$$Y_{abs} = 3.00 \times 10^{-11} X_{UFC/mL} - 0.0128_{abs}$$

Absorbancia suspensión madre: 2.217

Concentración suspensión madre:  $7.43 \times 10^{10}$  UFC/mL

**Tabla N°9:** Conteo y absorbancias del Bacilo 27

BACILO 27				
Dilución	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Absorbancia	_____	-0.011	-0.010	0.018
UFC/mL	_____	$5.90 \times 10^7$	$3.40 \times 10^8$	$2.45 \times 10^9$



**Figura N° 17.** Curva de calibración de Bacilo 27

Ecuación de la recta del Bacilo 27:

$$Y_{abs} = 1.00 \times 10^{-11} X_{UFC/mL} - 0.0129_{abs}$$

Absorbancia suspensión madre: 1.040

Concentración suspensión madre:  $1.53 \times 10^{11}$  UFC/mL

De acuerdo con los datos obtenidos, se logró determinar, a través del coeficiente de regresión, que las curvas de calibración de las cuatro cepas a estudiadas tienden a la linealidad, lo que indica que las concentraciones encontradas no varían conjuntamente con respecto a la absorbancia obtenida en cada dilución, permitiendo conocer cierto valor de UFC/mL a una determinada absorbancia. Aplicando este principio, se logró determinar que las concentraciones de las suspensiones madre para las cuatro cepas comprenden valores entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  UFC/mL (ver Tabla N°8).

**TABLA N°10:** Concentración (UFC/mL) de la suspensión madre de cada cepa en estudio.

Número de Muestra	Bacilo 01	Bacilo 02	Bacilo 03	Bacilo 27
Concentración	$1.61 \times 10^{12}$ UFC/mL	$2.09 \times 10^{12}$ UFC/mL	$7.43 \times 10^{10}$ UFC/mL	$1.53 \times 10^{11}$ UFC/mL

### 5.3.2 Cinética de crecimiento

Posteriormente se realizó la determinación de la cinética de crecimiento de cada cepa estudiada, para ello, cada bacteria se incubó a 37° C, a los siguientes tiempos de incubación: 0, 4, 24, 48, 72, 96 y 196 horas.

Se realizó la lectura de las absorbancias de cada muestra utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a 550 nm de acuerdo a cada tiempo de incubación (Ver Anexo N°24).

Los resultados obtenidos se sustituyeron en la ecuación de la curva de calibración para determinar la concentración a cada tiempo de muestreo (Ver Anexo N°25).

Cada concentración obtenida fue promediada de acuerdo con el tiempo de incubación, según la cepa estudiada (Ver Tabla N°11).

**Tabla N°11.** Concentraciones de las suspensiones de las cepas de *Bacillus subtilis* por tiempo de incubación

HORA	Concentración (UFC/mL)			
	Bacilo 01	Bacilo 02	Bacilo 03	Bacilo 27
0	$1.45 \times 10^{10}$	$2.33 \times 10^9$	$7.04 \times 10^8$	$2.79 \times 10^9$
4	$7.20 \times 10^9$	$3.17 \times 10^9$	$7.60 \times 10^8$	$3.16 \times 10^9$
24	$2.02 \times 10^{11}$	$4.44 \times 10^{11}$	$3.29 \times 10^{10}$	$5.10 \times 10^{10}$
48	$1.62 \times 10^{11}$	$5.33 \times 10^{11}$	$1.18 \times 10^{10}$	$2.98 \times 10^{10}$
72	$1.39 \times 10^{11}$	$3.22 \times 10^{11}$	$9.34 \times 10^9$	$9.89 \times 10^{10}$
96	$3.43 \times 10^{11}$	$3.32 \times 10^{11}$	$2.54 \times 10^{10}$	$7.88 \times 10^{10}$
196	$2.63 \times 10^{11}$	$6.49 \times 10^{11}$	$2.63 \times 10^{10}$	$7.46 \times 10^{10}$

Con el fin de obtener las curvas de crecimiento microbiano de cada cepa en estudio, de los valores presentados anteriormente, se procedió a calcular el logaritmo de cada uno (Ver Anexo N°25) y elaborar sus respectivas gráficas (Ver Tabla N°12).

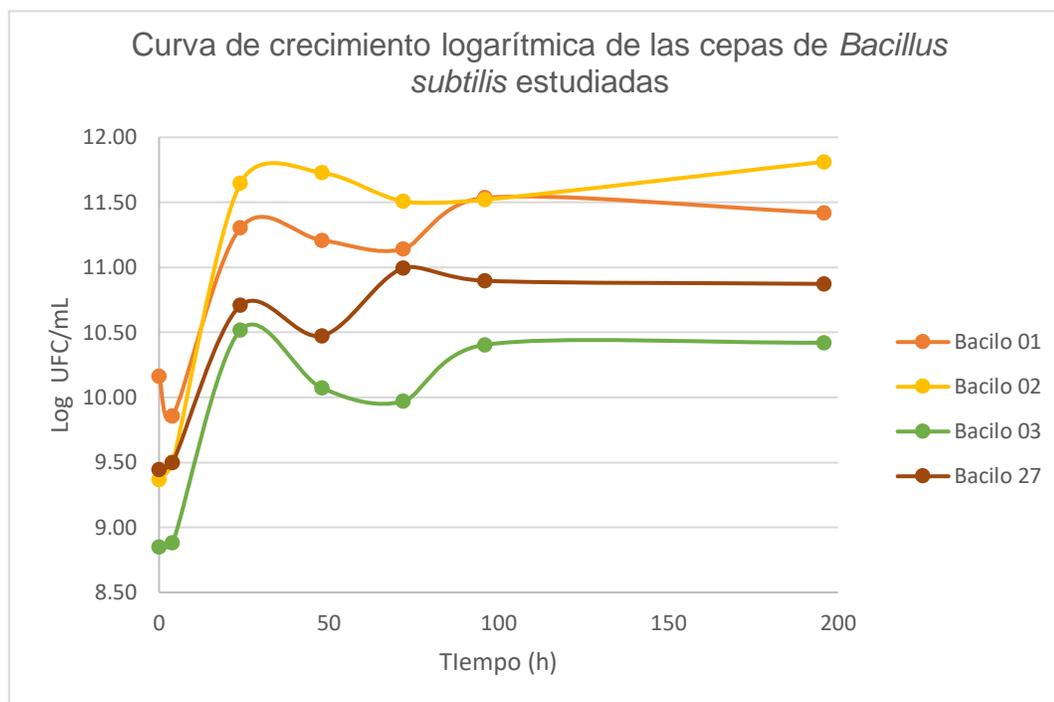
**Tabla N°12.** Logaritmos de las concentraciones microbianas obtenidas en la cinética de crecimiento.

HORA	Bacilo 01	Bacilo 02	Bacilo 03	Bacilo 27
0	10.16	9.37	8.85	9.45
4	9.86	9.50	8.88	9.50
24	11.30	11.65	10.52	10.71
48	11.21	11.73	10.07	10.47
72	11.14	11.51	9.97	11.00
96	11.54	11.52	10.40	10.90
196	11.42	11.81	10.42	10.87

En la cinética de crecimiento, se observa que los bacilos 02, 03 y 27 presentan crecimiento exponencial a partir de las cero horas, mientras que el bacilo 01 presentó una fase *Lag* de reducción de las UFC/mL, esta reducción indica que la bacteria se encuentra en un periodo de adaptación al medio de cultivo empleado.

Asimismo, este resultado puede estar asociado a la acción de las autolisinas, siendo este grupo enzimático el responsable de la degradación de la pared celular de este género de bacterias, generando un proceso de muerte celular.

Dicha fase *Lag* logra superarse de las 4 h en adelante, presentándose la fase de crecimiento exponencial hasta las 24 h. A partir de las 24 h, las cuatro cepas presentan fluctuaciones en sus concentraciones hasta las 96 h, las cuales pueden asociar de igual forma a las autolisinas (Ver Figura N°18).



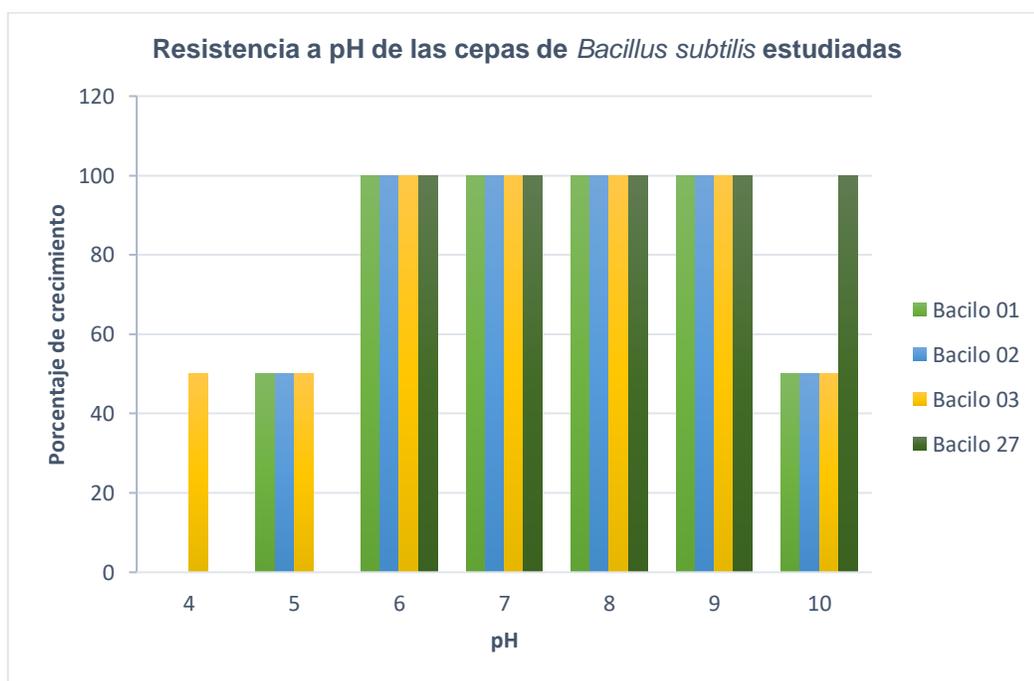
**Figura N° 18.** Curvas de crecimiento microbiano de las cepas de *Bacillus subtilis* en estudio.

La fase estacionaria de los bacilos 03 y 27 se presentó a las 96 h, la cual permaneció constante hasta el final del estudio, comprobándose con la lectura a las 196h. En el caso del bacilo 02, se observa la formación de una nueva fase exponencial desde las 96h hasta las 196h, mientras que en el bacilo 01 se observa el decrecimiento de las UFC/mL durante el mismo período de tiempo, dando inicio a su fase de muerte.

### 5.3.3 Prueba de tolerancia a pH

Con el fin de obtener los datos necesarios para determinar la resistencia de las bacterias con características positivas a *Bacillus subtilis*, cada cepa en estudio fue inoculada en caldos a distintos niveles de pH, comprendidos en el rango de 4 a 10. Posteriormente, se llevaron a incubación por 48 a 37° C (Ver Anexo N°26).

Las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas, poseen mejor resistencia a niveles de pH neutros o ligeramente alcalinos. Como se puede observar en la figura N°24, todas las cepas en estudio (01, 02, 03 y 27), presentan 100% de resistencia a los niveles de pH de 6 a 9, mientras que únicamente la cepa 27 posee un 100% de resistencia a pH 10 (Ver Figura N°19).



**Figura N° 19.** Resistencia a pH distintos por cepa de *Bacillus subtilis* estudiada.

Con ésta prueba, se espera determinar la capacidad de supervivencia de las cepas en estudio a las condiciones ambientales a las que estará expuestas al aplicarse sobre los arbustos de café. Al inocular *Bacillus subtilis* en su forma vegetativa este se encontrará en contacto directo con las lesiones provocadas por *Hemileia vastatrix* sobre los folíolos de cafeto, por lo que su resistencia al pH

de crecimiento del hongo, se vuelve un factor importante para realizar de manera efectiva su actividad antifúngica.

Los hongos se desarrollan en su mayoría, a niveles de pH entre 5.6 - 6.8, la incidencia y la severidad de la roya anaranjada se ha relacionado con suelos cuyo pH se encuentre entre 4.7 y 6.5 y posean contenidos en materia orgánica inferiores a 3% (7). Los suelos ácidos por lo general poseen elementos tóxicos como aluminio (Al), manganeso (Mn) y hierro (Fe), en concentraciones que pueden perjudicar el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas (42)

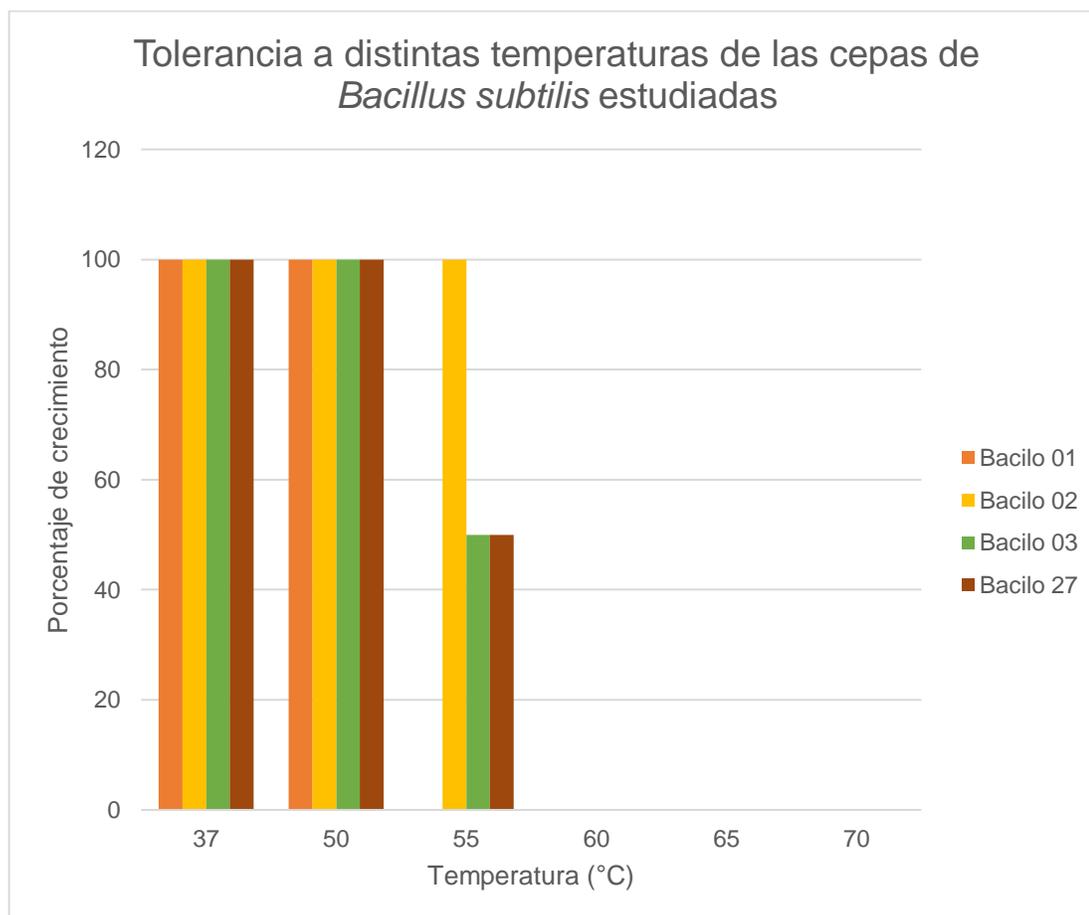
La bibliografía (57) menciona que la capacidad de resistencia de *Bacillus subtilis* hacia los distintos valores de pH, dependerá de la capacidad individual de cada cepa bacteriana en estudio. Las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas, poseen mejor resistencia a niveles de pH ligeramente ácidos, neutros y alcalinos. Como se puede observar en la figura N°24, todas las cepas en estudio (01, 02, 03 y 27), presentan 100% de resistencia a los niveles de pH de 6 a 9, lo anterior indica que las cepas bacterianas aisladas poseen baja resistencia a pH ácido. Sin embargo, *Bacillus subtilis* posee potencial como bioremediador de suelos ácidos, al provocar su alcalinización, disminuir la concentración de aluminio y aumentar la concentración de fósforo libre, mejorando la nutrición general y permitiendo una mayor resistencia al ataque de patógenos, incluyendo *Hemileia vastatrix* (1).

#### 5.3.4 Prueba de tolerancia a temperaturas. (56)

Para determinar la resistencia térmica, cada cepa en estudio se incubó durante un periodo de 24 – 48 horas, a las siguientes temperaturas: 37°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C y 70°C (Ver Anexo N°26).

En la prueba de resistencia térmica, se observó una tolerancia del 100%, de todas las cepas estudiadas, a las temperaturas de 37 y 50°C. Al mismo tiempo, a la temperatura de 55°C, la cepa 02 presentó el 100% de tolerancia, mientras que las cepas 03 y 27 soportaron esa temperatura en un 50%. Los resultados

anteriores indican que las cepas caracterizadas, poseen la capacidad de crecimiento únicamente a temperaturas menores a 55°C (Ver Figura N°20).

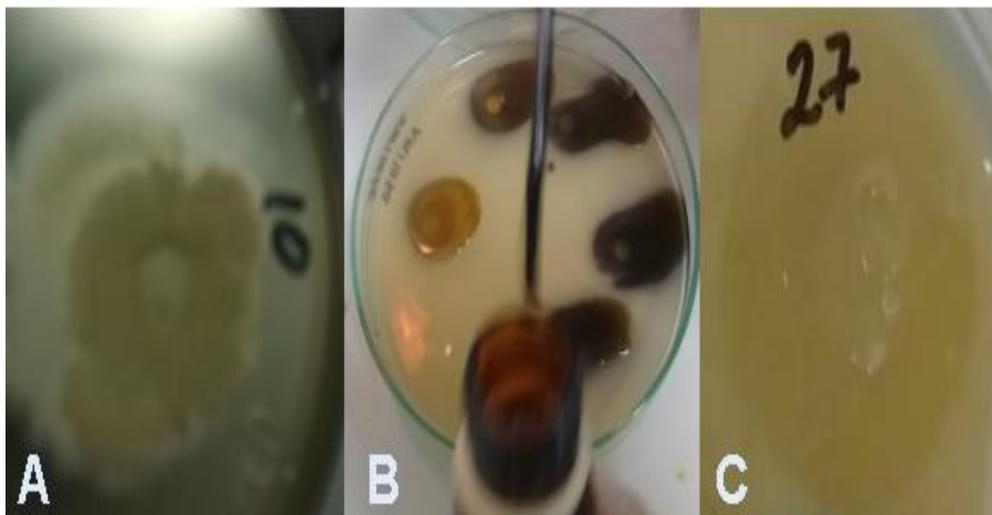


**Figura N°20.** Resistencia a temperaturas distintas por cepa de *Bacillus subtilis* estudiada.

Si bien, las cepas aisladas no poseen capacidad de crecimiento a altas temperaturas, no se puede afirmar que las cepas analizadas no poseen resistencia a temperaturas mayores a 55°C, ya que, tal como se comprobó en el proceso de aislamiento, todas las cepas, lograron soportar la temperatura de ebullición mientras se encontraban en su forma esporulada.

### 5.3.5 Pruebas enzimáticas

Se realizó este ensayo para determinar la producción de amilasa, lipasa, proteasa y gelatinasa, las cuales son exoenzimas bacterianas producidas por *Bacillus subtilis*, que tienen la capacidad para degradar los distintos sustratos presentes en el medio de cultivo (Ver Figura N°21)



**Figura N°21.** Pruebas de actividad enzimática. A:Gelatinasa, B:Amilasa, C: Proteasa.

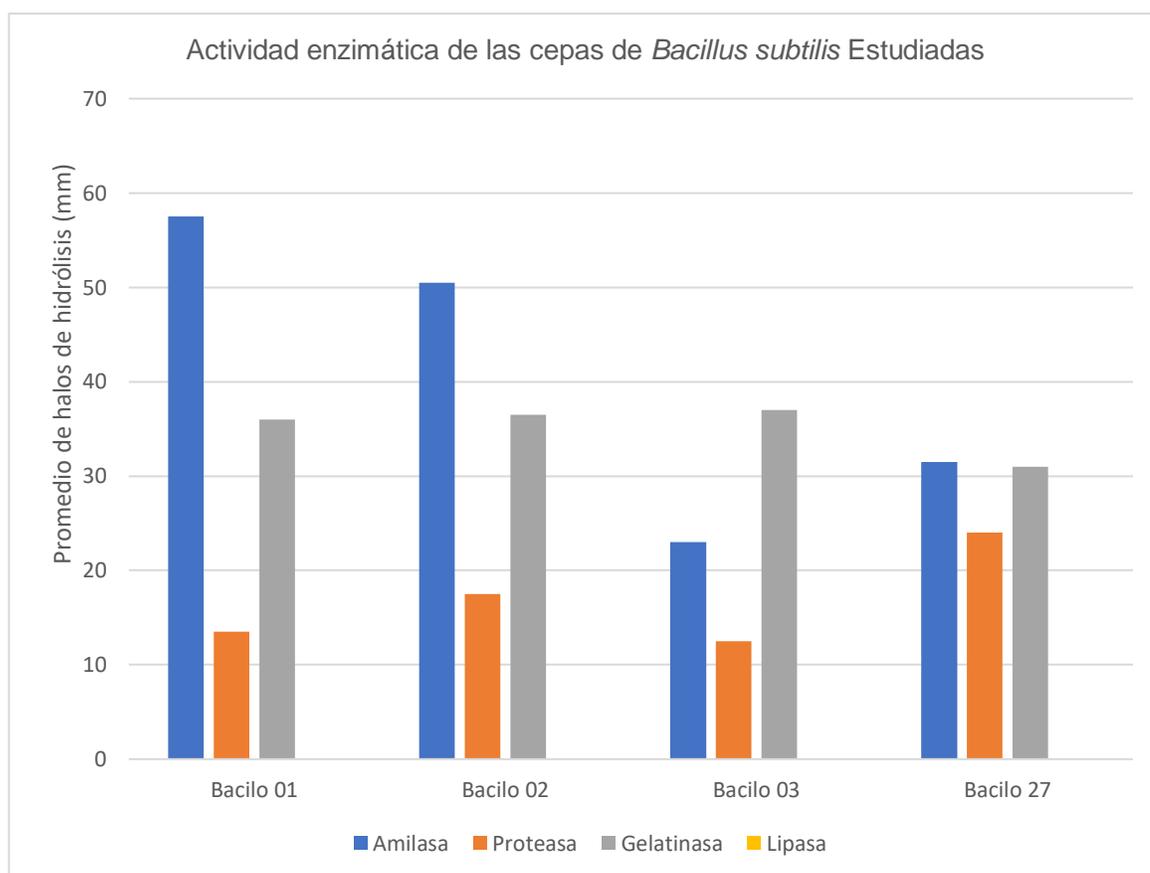
Posterior al tiempo de incubación, se midieron los halos formados alrededor de cada cepa bacteriana en estudio (Ver Anexo N°27)

Se puede observar que todas las cepas en estudio presentaron la capacidad de producir amilasa, siendo las mejores productoras las cepas 01 y 02.

De igual forma, se puede observar que todas presentan la capacidad de hidrolizar la caseína, siendo la mejor la cepa 27. En el caso de la producción de gelatinasa, se puede observar que la cepa 03 posee mayor capacidad de metabolizar la gelatina, seguida de las cepas 01, 27 y 02 (Ver Figura N°22).

Ya que la caseína es una proteína más compleja que la gelatina, los resultados indican que cada cepa de *Bacillus subtilis* metaboliza en mayor medida la gelatina que la caseína.

Asimismo, se verificó que ninguna de las cepas analizadas presentó producción de lipasa; Aunque la bibliografía (28) establece que *Bacillus subtilis* posee la capacidad de producir lipasas, esta requiere de un enriquecimiento previo en medios de cultivo, por lo que estos deben ser suplementados previamente con lípidos para estimular la producción de estas enzimas (Ver Figura N°22).

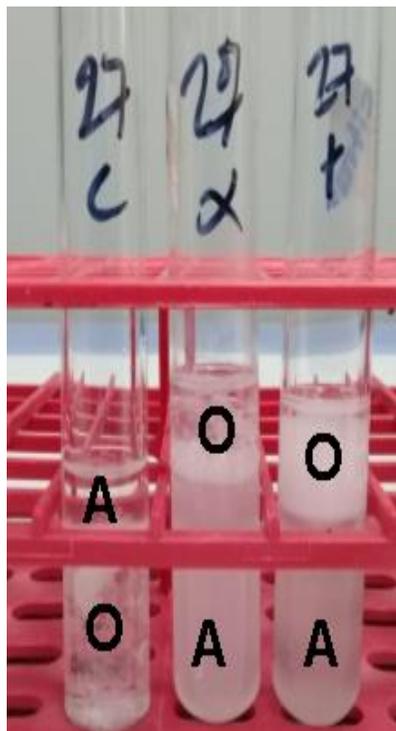


**Figura N°22.** Actividad enzimática de las cepas estudiadas.

### 5.3.6 Prueba de adhesión bacteriana a solventes orgánicos

Esta prueba permite determinar la capacidad de la célula bacteriana de adherirse a las distintas superficies. Para ello, se elaboran suspensiones bacterianas con una absorbancia conocida, y sobre esta, se agrega uno de los solventes orgánicos en estudio (Xileno, Tolueno o Cloroformo) (Ver Figura N°23),

posteriormente, se determinan los porcentajes de adherencia para cada cepa bacteriana en estudio (Ver Anexo N°28).

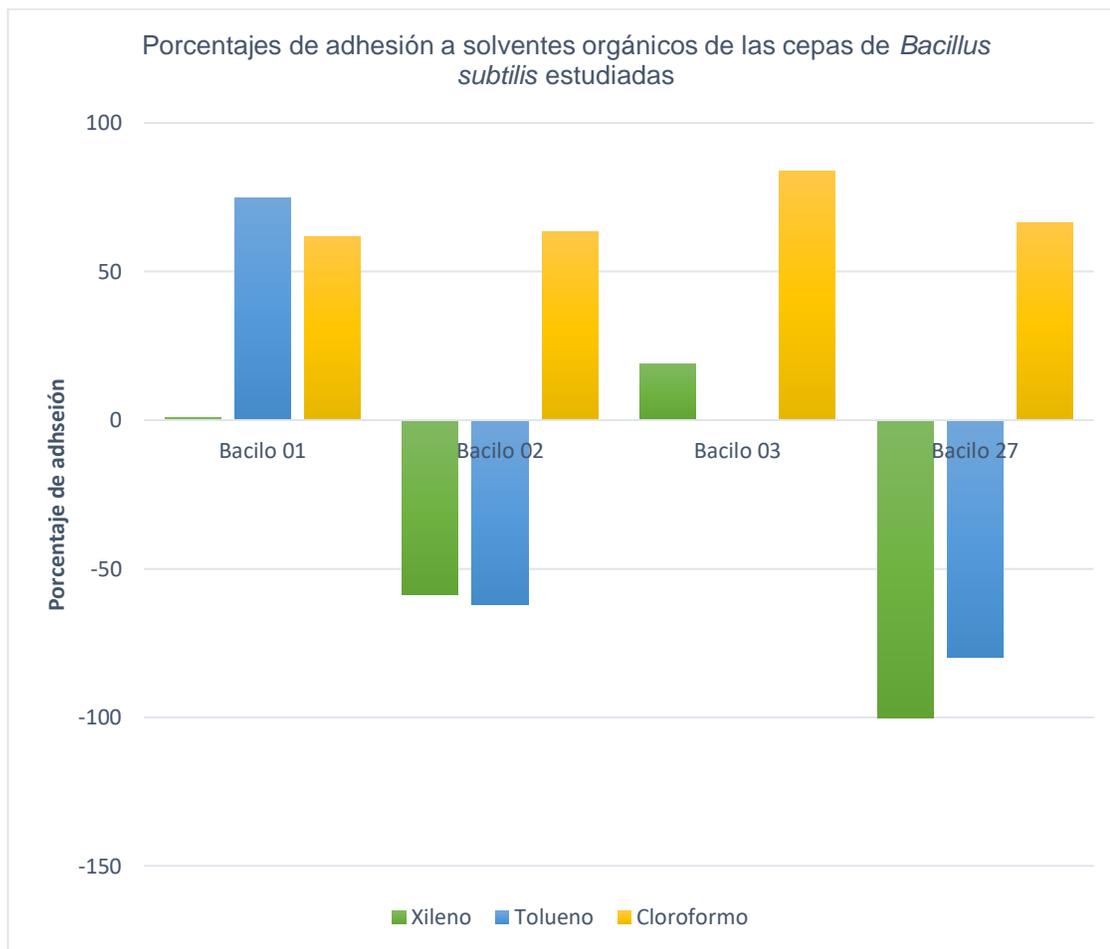


**Figura N°23.** Tubos incubados a temperatura ambiente para separación de las fases orgánica (O) y acuosa (A). De izquierda a derecha: Cloroformo (C), Xileno (X), Tolueno (T).

Se puede observar, que las cuatro cepas estudiadas presentaron porcentajes de adherencia bajos frente al xileno, lo que indica una baja hidrofobicidad, por lo tanto, una baja capacidad de adherencia física hacia las distintas superficies, lo anterior es consistente a lo mencionado en la bibliografía <sup>(29)</sup>, en donde se establece que *Bacillus subtilis* posee una baja persistencia sobre las hojas.

Por otro lado, sólo el bacilo 01 presentó un porcentaje alto frente al tolueno mientras que los demás bacilos no presentaron adherencia significativa a este solvente. Al mismo tiempo, todas las cepas en estudio presentaron un alto porcentaje de adherencia frente al cloroformo, esto se debe a la presencia de

distintos grupos funcionales con carácter polar en la pared celular de estas bacterias (Ver Figura N°24)



**Figura N°24.** Porcentajes de adhesión a solventes orgánicos de las cepas estudiadas.

La adhesión al cloroformo indica la capacidad de la membrana celular de donar electrones lo que indica que, aunque posea una baja adherencia física, las cepas en estudio se adhieren fuertemente a las distintas superficies por medio de enlaces covalentes.

#### **5.4 Actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* contra el hongo *Hemileia vastatrix*.**

- **Preparación de suspensiones bacterianas de *Bacillus subtilis*.**

La concentración inicial y la concentración final de las suspensiones bacterianas fueron determinadas mediante la lectura de las absorbancias en el día 0 y día 27, y su posterior sustitución en las ecuaciones obtenidas en el conteo de las cepas de *Bacillus subtilis* (Ver Tabla N°13)

**TABLA N°13.** Concentraciones, en UFC/mL, de las suspensiones de las cepas de *Bacillus subtilis* en estudio

Bacilo	Concentración inicial (Día cero)	Concentración final (Día 14)
01	2.92E+10	5.72E+11
02	5.65E+10	5.27E+11
03	1.63E+09	1.81E+10
27	3.69E+09	4.33E+10

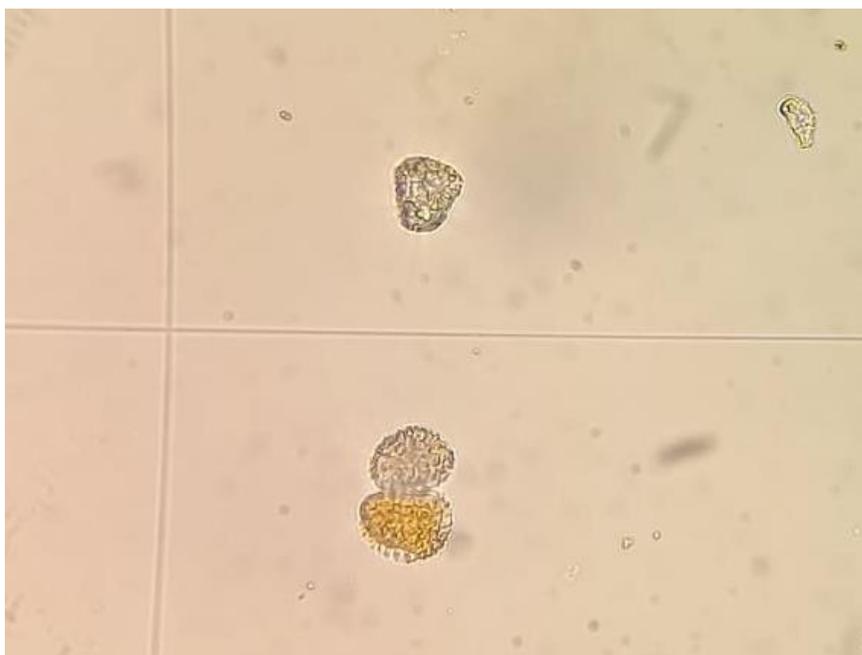
- **Determinación de la concentración antifúngica eficaz de *Bacillus subtilis* contra *Hemileia vastatrix*.**

Se colectaron y trasladaron al laboratorio, folíolos que presentaran pústulas anaranjadas en el envés de las hojas, características del *Hemileia vastatrix* (ver Figura N°25.)



**Figura N° 25.** Folíolos infectados con roya

Se elaboraron suspensiones de esporas, y se realizaron las lecturas en cámara de Neubauer y microscopio óptico compuesto al objetivo 40x (Ver Figura N° 26), para determinar la concentración de la suspensión de esporas (Ver Tabla N°14).



**Figura N°26.** Recuento en cámara de Neubauer de las esporas de *Hemileia vastatrix* al 40x.

**Tabla N°14.** Recuento de suspensión de esporas.

Cuadrante	Recuento
N°1	14 esporas
N°2	17 esporas
N°3	16 esporas
N°4	19 esporas
<b>Sumatoria</b>	<b>66 esporas</b>

Se procedió al cálculo de la concentración de la suspensión de esporas empleando la siguiente ecuación <sup>(15)</sup>:

$$\text{Concentración suspensión esporas} = \frac{(\text{Suma esporas} \times 10,000)}{\text{N}^\circ \text{ cuadros contados}}$$

Sustituyendo:

$$\text{Concentración suspensión esporas} = \frac{(66 \text{ esporas} \times 10,000)}{4 \text{ cuadros}}$$

$$\text{Concentración suspensión de esporas} = 1.7 \times 10^5 \text{ Esporas/mL}$$

La suspensión fue utilizada para determinar la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* sobre *Hemileia vastatrix*.

Concomitantemente, se realizó el ensayo del control positivo el cuál consistió en una solución de Sulfato de Cobre Pentahidratado al 1% P/V y el control negativo al cual no se le aplicó tratamiento alguno.

Posterior al tratamiento, se realizó el conteo de las esporas del hongo, tanto las germinadas, como las no germinadas, utilizando un microscopio estereoscópico (Ver Anexo N°29).

Para la interpretación de los resultados, la presencia de tubos germinales (Ver Figura N°27) se empleó como indicador de la efectividad antifúngica de la suspensión de *Bacillus subtilis* estudiada, esperándose como resultado un crecimiento limitado o la ausencia de estas.



**Figura N°27.** Esporas del *Hemileia vastatrix* observadas al microscopio estereoscópico a las 48 horas de incubación. Nótese la formación de los tubos germinales (señalados con flechas) desde las esporas.

De la misma forma, se obtuvieron los resultados de los controles positivo y negativo (Ver Anexo N°27).

Posterior a la tabulación de datos, se calcularon los porcentajes de crecimiento e inhibición de cada uno de los ensayos realizados. Las concentraciones inhibitorias para las cuatro cepas bacterianas en estudio presentaron el siguiente comportamiento:  $10^{10} > 10^8 > 10^6 > 10^4$  (Ver Tabla N°15).

**Tabla N°15.** Porcentajes de inhibición y germinación de *Hemileia vastatrix* frente a las suspensiones de *Bacillus subtilis* estudiadas.

Porcentajes	Inhibición de germinación de esporas				Germinación de esporas			
Bacilo \ Concentración <i>Bacillus subtilis</i>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>10</sup>
01	37.26	68.79	73.89	91.40	46.90	20.42	22.84	6.51
02	54.14	71.34	74.52	85.67	35.73	17.51	20.20	10.51
03	61.46	66.56	70.70	81.21	56.02	35.23	42.59	26.58
27	65.61	76.75	79.62	83.12	45.57	35.27	26.45	29.45
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 1% P/V	70.78				29.22			

De lo anterior se infiere que el bacilo 01 la que presenta el porcentaje de inhibición más alto obteniéndose 91.4% de inhibición para la concentración 10<sup>10</sup>.

**- Análisis estadístico de la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* sobre *Hemileia vastatrix*.**

Para determinar la efectividad de los tratamientos, se compararon los resultados, con el porcentaje de inhibición obtenido con el control negativo, consistente en una solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1%. Para realizar dicha comparación se realizó la prueba de t de student, para el análisis estadístico se utilizó el programa de Microsoft Excel 2010 (Ver Anexo N°30).

A partir de este estudio se plantearon las dos hipótesis de estudio:

- **Hipótesis nula o  $H_0$ :** No existe diferencia significativa entre el tratamiento con sulfato de cobre y el tratamiento con *Bacillus subtilis*.
- **Hipótesis alternativa o  $H_1$ :** Existe diferencia significativa entre el tratamiento con sulfato de cobre y el tratamiento con la cepa de *Bacillus subtilis en estudio*.

Si el valor absoluto de la t experimental (estadístico t) obtenido, es menor que la T de tablas, se aprueba la hipótesis nula, es decir, se puede afirmar que no hay diferencia significativa entre los tratamientos bacteriano y sulfato de cobre al 1%, y se dictamine que ambos tratamientos poseen similar eficacia contra el *Hemileia vastatrix*.

Si, por el contrario, la t experimental obtenida es mayor que la t de tablas, se puede afirmar que existe diferencia entre ambos tratamientos sea necesario evaluar su eficacia a través de los porcentajes de inhibición.

**Tabla N° 16.** Análisis estadístico de resultados Bacilo 01

Concentración	Criterio de aceptación	Resultado	Análisis del resultado
$10^{10}$	T experimental < 2,920	3.859 > 2.920	Existe diferencia significativa entre ambos tratamientos
$10^8$	T experimental < 2,920	0.658 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^6$		0.002 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^4$		2.746 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**Tabla N° 17.** Análisis estadístico de resultados Bacilo 02.

Concentración	Criterio de aceptación	Resultado	Análisis del resultado
$10^{10}$	T experimental < 2,920	2,881 < 2.920	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^8$	T experimental < 2,920	0,664 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^6$		0,415 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^4$		1,521 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**Tabla N° 18.** Análisis estadístico de resultados Bacilo 03.

Concentración	Criterio de aceptación	Resultado	Análisis del resultado
$10^{10}$	T experimental < 2,920	1,137 < 2.920	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^8$	T experimental < 2,920	0,180 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^6$		0,310 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
$10^4$		1,020 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**Tabla N° 19.** Análisis estadístico de resultados Bacilo 27.

Concentración	Criterio de aceptación	Resultado	Análisis del resultado
10 <sup>10</sup>	T experimental < 2,920	1.799 < 2.920	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
10 <sup>8</sup>	T experimental < 2,920	1.016 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
10 <sup>6</sup>		1.168 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
10 <sup>4</sup>		0.441 < 2.92	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

En este estudio se observó que para la muestra 01, concentración 10<sup>10</sup>, que la t experimental obtenida excede el valor de t de tablas, por lo tanto existe diferencia significativa entre ambos tratamientos, siendo de mayor efectividad el tratamiento con *Bacillus subtilis*. Para las concentraciones 10<sup>8</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>4</sup>, se observa que no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

En el caso de las cepas 02, 03 y 27, se puede verificar que para las cuatro concentraciones en estudio, el análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control positivo, por lo que se puede afirmar que las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas, inhiben la germinación de esporas de *Hemileia vastatrix*, tan eficazmente como el control positivo, por lo que pueden ser considerados como biocontroladores potenciales para el tratamiento de la enfermedad de la roya en el café.

Se emitieron los respectivos informes de resultados (Ver Anexo N°31) con el fin de presentar dichos resultados de forma puntual (Ver Cuadro N°7).

**Cuadro N°7.** Resumen de resultados de los análisis realizados a cepas candidatas

PRUEBAS		BACILOS			
		01	02	03	27
Tinción Gram		Bacilos Gram positivos, bordes redondos.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos.
Tinción de esporas		Esporas esféricas paracentrales que deforman al bacilo.	Esporas elipsoidales centrales, que no deforman al bacilo.	Esporas elipsoidales centrales, que no deforman al bacilo.	Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.
Pruebas Bioquímicas	Catalasa	+	+	+	+
	Nitratos	+	+	+	+
	Motilidad	+	+	+	+
	VP	+	+	+	+
	Rojo de metilo	-	-	-	-
	Citrato	+	+	+	+
	TSI	K/A	K/A	A/A	K/A
	Hidrolisis glucosa	+	+	+	+
	Hidrolisis manitol	+	+	+	+
	Hidrolisis lactosa	-	-	-	-
	Indol	-	-	-	-
	Esculina	+	+	+	+
	Urea	+	-	-	+

Cuadro N°7. Continuación

PRUEBAS		BACILOS				
		01	02	03	27	
Cuento UFC/mL (Dil. 10 <sup>-8</sup> )		1.70 x 10 <sup>10</sup>	3.55 x 10 <sup>9</sup>	8.00 x 10 <sup>8</sup>	2.45 x 10 <sup>9</sup>	
Cinética de crecimiento (Logaritmo en fase estacionaria presente desde las 96 h)		10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	
Tolerancia a pH		6-9	6-9	6-9	6-10	
Tolerancia a altas temperaturas		37°C-50°C	37°C-55°C	37°C-50°C	37°C-50°C	
Actividad enzimática	Amilasa	57.5 mm	50.5 mm	23 mm	31.5 mm	
	Proteasa	13.5 mm	17.5 mm	12.5 mm	24 mm	
	Gelatinasa	36 mm	19 mm	37 mm	31 mm	
	Lipasa	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	
Adhesión a solventes	% de adhesión a cloroformo	0.71	-58,75	18,88	-100.27	
	% de adhesión a tolueno	74.8	-62,08	-0,13	-79.68	
	% de adhesión a xileno	61.72	63,48	83,37	66.31	
Actividad antifúngica	% de inhibición	UFC/mL				
		10 <sup>4</sup>	37,26	54,14	61,46	65,61
		10 <sup>6</sup>	68,79	71,34	66,56	76,75
		10 <sup>8</sup>	73,89	74,52	70,7	79,62
		10 <sup>10</sup>	91,4	85,67	81,21	83,12

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. El macerado de folíolos de cafeto a 100° C y la adición de un antifúngico caldo utilizado, permiten el efectivo aislamiento de *Bacillus subtilis*, gracias a su tolerancia a temperaturas elevadas, sin la presencia de mohos y levaduras.
2. Por medio de la identificación bioquímica de las bacterias aisladas, se determinó que de las 18 muestras colectadas, el 22.2% corresponden a *Bacillus subtilis*, cantidad equivalente a cuatro bacterias.
3. Las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas, poseen crecimiento favorables a niveles de pH neutros y ligeramente alcalinos (6-9), y a temperaturas menores a 55° C en su forma vegetativa y fase estacionaria a partir de las 96 horas.
4. Las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas poseen la capacidad de producir enzimas extracelulares que coadyuvan al control de enfermedades en cultivos, tales como la amilasa, proteasa y gelatinasa.
5. El principal mecanismo de adhesión de las bacterias aisladas, a las superficies, es por medio de enlaces covalentes.
6. Las cuatro cepas caracterizadas en este estudio mostraron un alto potencial para uso como agente controlador de *Hemileia vastatrix* en cafeto, siendo estadísticamente similares al control de la enfermedad producido por Sulfato de cobre al 1%.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 6.0 RECOMENDACIONES

1. Para futuras investigaciones, realizar diluciones seriadas del caldo de enriquecimiento para mejorar el aislamiento de *Bacillus subtilis*.
2. Que en futuras investigaciones se apliquen otros métodos de recuento para ampliar las opciones con las que se puedan determinar las concentraciones de suspensiones bacterianas.
3. Que se realicen las lecturas de la actividad antifúngica contra *Hemileia vastatrix* en un periodo máximo de 48 horas para evitar la incubación ulterior de otro tipo de mohos que puedan interferir con las lecturas.
4. Que en futuras investigaciones se realice el recuento en placa de las pruebas de pH y temperatura para confirmar la supervivencia del *Bacillus subtilis* según la prueba realizada.
5. Que se Utilicen distintas concentraciones bacterianas empleadas en este ensayo *in vitro*, para observar el efecto de *Bacillus subtilis* sobre los arbustos de cafeto (*In vivo*).
6. Que se lleve a cabo, en el futuro, este tipo de investigaciones junto a entidades gubernamentales, tales como PROCAFE y el Ministerio de Agricultura y Ganadería, para brindar a los agricultores nuevas alternativas para el manejo de enfermedades en los cultivo, y de esta forma, mejorar la producción agrícola en El Salvador.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, G., & Ramírez, R. (2010). Evaluación de los cambios en *Bacillus subtilis* algunas propiedades físicas y químicas de un ultisol por efecto de. Revista Colombiana de biotecnología., 203-213.
2. American Society of Microbiology. (Noviembre 2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. Recuperado el 14 de junio de 2018 de <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3776;jsessionid=7j6Uw8zcTQmOZqtWYpeFfcas.x-asm-books-live-01>
3. Alemán, U. (29 de Mayo de 2017). El Mundo. Obtenido de <http://elmundo.sv/analizan-nuevas-variedades-de-cafe-resi+stentes-a-roya-y-clima/>
4. Alimentos, P. M. (2013). Evaluación rápida sobre el efecto de la roya del café en poblaciones vulnerables dependientes del sector en El Salvador.
5. Alvarado Dimas, D. J., Evangelista Méndez, R. E., & Mejía Figueroa, K. L. (Diciembre de 2004). Identificación de territorios de café (*Coffea arabica*) de calidad en El Salvador. San Salvador, El Salvador.
6. Ariza Y., S. L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* Nova, 135-250.
7. Avelino, J., & Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto.
8. Bailón Lira, L., González Meléndez, R. C., & Cervantes Sandoval, A. (2003). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Mexico: Universidad Autónoma de Mexico.

9. BAM R11: Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (2013, febrero). [en línea] Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm061208.htm> [Recuperado el 28 / 04 / 2018]
10. Barros, F. F., Quadros, C. P., Júnior, M. R., & Pastore, G. M. (2007). Surfactina: propiedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 409-414.
11. Café, C. S.). Consejo Salvadoreño del Café. Obtenido de Estadísticas Cafetaleras. Producción: <http://www.csc.gob.sv/estadisticas/> [Recuperado el 30 de Abril de 2017]
12. Calderón Santoyo M., Lomelí González L., Luna Solano G., Ragazzo-Sánchez J.A. y Robles Cabrera A., (2011) Selección De Cepas De *Bacillus spp.* Productoras De Antibióticos Aisladas De Frutos Tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17 (Especial 1), 5-11
13. Camarena-Gutiérrez G., de la Torre Almaráz R. (2007), Resistencia Sistémica Adquirida en Plantas: Estado Actual, *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13 (2), 157-162.
14. Carvalho CR, Fernandes RC, Carvalho GMA, Barreto RW y Evans HC (2011) Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE* 6(11): e26387. doi:10.1371/journal.pone.0026387
15. Castañeda A. E., S. L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *NOVA*, 53-65.
16. CENTA., D. d. (13 de Julio de 2017). CENTA. Recuperado el 2018, de <http://www.centa.gob.sv>

17. Chidoko P., Mahoya C., Maneji B.T., Mudyiwa R.M. y Mwatsiya N. (2017). Evaluation of Different Botanicals for the Control of Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome). International Journal of Plant & Soil Science. 14 (6): 1-8. DOI: 10.9734/IJPSS/2017/28252
18. Consejo Salvadoreño del Café. (s.f.). Historia del café. Recuperado el 6 de Septiembre de 2017, de <http://www.csc.gob.sv/historia/>
19. C. M. Zuluaga, P. B.-M. (2009). Generalidades de los uredinales (fungi: basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. Acta biológica Colombiana, Vol. 14, No. 1, 1900 - 1649.
20. Daivasikamani S. y Rajanaika (2009). Biological control of coffee leaf rust pathogen, *Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Biopesticides 2 (1): 94-98 DOI: 10.1155/2015/820575
21. Departamento de Biología Vegetal I. (2009). Guión de prácticas de la asignatura de Fisiopatología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad Complutense. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2(3): 146-166.
22. Dewi. R.T.K., Mubarik N.R., Suhartono M.T. Medium Medium optimization of  $\beta$ -glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen DOI:10.9755/ejfa.2015-05-195
23. Endospore Staining: Principle, Procedure and Results (2015, mayo). [en línea] Disponible en: <https://microbeonline.com/endospore-staining-principle-procedure-results/> [recuperado el 10/04/2018]
24. Ferro, C. M. (2017). Impacto ambiental de la aplicación de plaguicidas en siete modelos socio-productivos hortícolas del Cinturón Verde de Mendoza.

25. Fujimoto A., Kupper K.C. (Noviembre 2016). Production of antifungal compounds and hydrolitic enzymes by *Bacillus sp.* as mechanism of action against *Phyllostic citricarpa*. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 9(11), 19-27.
26. G. Mizubuti Eduardo S., Haddad F., Maffia Luis A., Romeiro Reginaldo S. y Saravia Rodrigo M., (2013) Antifungal compounds as a mechanism to control *Hemileia vastatrix* by antagonistic bacteria. Tropical Plant Pathology, 38 (5), 398-405
27. García, J. C., Alvarado García, J. A., & García Dubón, E. A. (1980). Efecto de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.) sobre la rentabilidad del cultivo del café, y sus implicaciones económicas y sociales en El Salvador. Boletín de Ciencias Economicas y Sociales, 146-148.
28. Gobierno invierte para controlar la roya en cafetales. Obtenido de Transparencia Activa: <https://www.transparenciaactiva.gob.sv/gobierno-invierte-para-controlar-roya-en-cafetales> [Recuperado el 05 de Marzo de 2013]
29. Gong A. D, L. H. (2015). Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. PLoS ONE.
30. Hamley Ian W. (2015), Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. Chem. Commun, 51, 8574-8583. DOI: 0.1039/c5cc01535a
31. Hernández, M. M. (Junio de 2011). *Bacillus subtilis*: Producción de fracciones peptídicas antimicrobianas y promoción de crecimiento vegetal de tomate. Tesis de maestría. Saltillo, Coahuila, Mexico: Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.

32. Hruska A. J., R. C. (2015). Memorias del seminario científico internacional manejo agroecológico de la roya del café., (págs. 26 - 34).
33. Lee Li Pin, Karbul Hudzaifah Mohamed, Citartan Marimuthu, y otros (2015). Lipase-screening *Bacillus* Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Straining to Alleviate Oil Pollution. BioMed Research International. 2015, (820575).
34. Lozada, J. P. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp.* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana.
35. Mardanova, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnullina, L.F., Gilyazeva, A.G., Bogomolnaya, L.M. and Sharipova, M.R. (2017) *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. Agricultural Sciences, 8, 1-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/as.2017.81001>
36. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (21 de Junio de 2014). MAG entrega agroquímicos para controlar la roya del café. Recuperado el 6 de Septiembre de 2017, de <http://www.mag.gob.sv/mag-entrega-agroquimicos-para-controlar-roya-de-cafe/>
37. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (10 de Septiembre de 2014). MAG lanza la división CENTA - CAFÉ. Recuperado el 6 de Agosto de 2017, de <http://www.mag.gob.sv/mag-lanza-la-division-centa-cafe/>
38. Missouri Botanical Garden. (16 de Enero de 2018). Tropicos. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/27900016>
39. Ondarza-Beneitez, M. A. (2017 ). Biopesticidas: tipos y aplicaciones en el control de plagas agrícolas. Agroproductividad Vol. 10, 31-36.
40. Organización Internacional del Café. (s.f.). Recuperado el 8 de Septiembre de 2017, de [http://www.ico.org/es/botanical\\_c.asp#pla](http://www.ico.org/es/botanical_c.asp#pla)

41. Ortíz, A. C. (Diciembre de 2015). Evaluación del potencial probiótico de bacterias aisladas del tracto digestivo de la almeja Pata de Mula *Anadara tuberculosa* en el cultivo de invertebrados marinos de importancia comercial. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
42. Ortíz, R., Braeuner, M., & MacVean, C. Acidez del suelo como causa del "Mal de Viñas" del café (*Coffea arabica* L.) en Guatemala: un estudio de invernadero. Guatemala.
43. Pal K. K, M. G. (2006). Biological control of plant pathogens. The Plant Health.
44. Pareja, E. I. (febrero de 2018). Universidad de Granada. Obtenido de Sitio web para la consulta de Microbiología general, Licenciatura de Biología, Universidad de Granada:[https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#\\_Toc59451624](https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451624)
45. Pila, F. E. (s.f.). Importancia de los lipopeptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico. Ecuador: Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay.
46. Portillo Cuéllar, J. E., & Ramirez Martínez, A. L. (Mayo de 2009). Obtención de amilasa por cinética de crecimiento con el microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando como medio de cultivo cáscara de papa. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.
47. Programa Mundial de Alimentos. (2013). Evaluación rápida sobre el efecto de la roya del café en poblaciones vulnerables dependientes del sector en El Salvador.
48. Promecafé. (2016). El impacto de la roya de café en el sector cafetalero de América Central.

49. Ramos, O. (Septiembre de 2010). Guia de Innovación de la caficultura. Recuperado el 8 de Septiembre de 2017, de Fundesyram: [www.fundesyram.info](http://www.fundesyram.info)
50. Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Bogotá, D.C. , Colombia: Instituto Nacional de Salud.
51. Roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome Ficha Técnica N°. 40. (Abril 2016). México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en: [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215909/26\\_Ficha\\_Tcnica\\_-\\_Roya\\_del\\_cafeto.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215909/26_Ficha_Tcnica_-_Roya_del_cafeto.pdf) [ 2017, 20 de mayo].
52. Sánchez Lilian, Tromps Jeannette (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico. Rev. Salud Anim. 36 (2) 124-129
53. Sujata S. J, S. J. (2016). Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. Brazilian journal of microbiology, 955-964.
54. Torres, F. J. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
55. Transparencia Activa. (05 de Marzo de 2013). Obtenido de Transparencia Activa: <https://www.transparenciaactiva.gob.sv/gobierno-invierte-para-controlar-roya-en-cafetales>
56. Triola, M.F. (2009). Estadística. México: Pearson Educación de México, S.A de C.V.

57. Universidad Pública de Navarra. Glosario botánico. Obtenido de [http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/glosario\\_bot.htm](http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/glosario_bot.htm)
58. Variedad Vegetal (recuperado el 07 de julio de 2019) de <https://dej.rae.es/lema/variedad-vegetal>
59. Virginio Filho E., Astorga Domian C., (Noviembre 2015). Prevención y control de la roya del café: manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
60. Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., y otros. (1992). Koneman. Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica Panamericana.
61. Zuñiga, D. C. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Lima, Perú.: Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina.

## GLOSARIO. (57)

**Biopesticida:** Tipo de pesticidas derivados de materiales naturales, tales como animales, plantas, bacterias y ciertos minerales. Juegan un papel importante al proveer herramientas al manejo de plagas en áreas donde existe una resistencia a los pesticidas químicos. (37).

**Cepa:** Organismo que presenta un fenotipo característico reproducible de una generación a la otra.

**Colonia:** Grupo de organismos unicelulares que viven en asociación, a menudo derivado de una sola célula.

**Endosporas:** Células diferenciadas formadas dentro de ciertas bacterias gram positivas; son formas de resistencia. Ej: *Clostridium*, *Bacillus*.

**Folíolos:** Cada uno de los elementos individuales en los que se divide el limbo de una hoja compuesta.

**Limbo:** Parte laminar de la hoja; sinónimo de lámina.

**Pecíolo:** Parte de la hoja que une el limbo al tallo.

**Termófilo:** Organismo adaptado a temperaturas altas, como las que se alcanzan en aguas termales y geysers, en fuentes hidrotermales submarinas, y en las tuberías domésticas de agua caliente. Existe una gran diversidad de bacterias, hongos, plantas y animales inferiores que pueden crecer a temperaturas de hasta 50 °C, y en ocasiones, superiores.

**Unidad formadora de colonia:** Célula bacteriana viva y aislada que en las condiciones adecuadas da lugar a la producción de una colonia de bacterias.

**Uredosporas:** Esporas generadas a partir de la mitosis de micelio dicariótico y que son típicamente repetitivas, dando lugar a nuevas uredosporas o teliosporas.

**Variedad vegetal:** Cada una de las unidades en las que genéticamente se subdivide una especie vegetal. (58).

## **ANEXOS**

ANEXO N°1

MAPA GEORREFERENCIADO DEL SITIO DE MUESTREO



Figura N°28. Mapa georreferenciado del sitio de muestreo

ANEXO N°2

CROQUIS DE TAREA Y NUMERACIÓN DE LOS EJEMPLARES A  
MUESTREAR

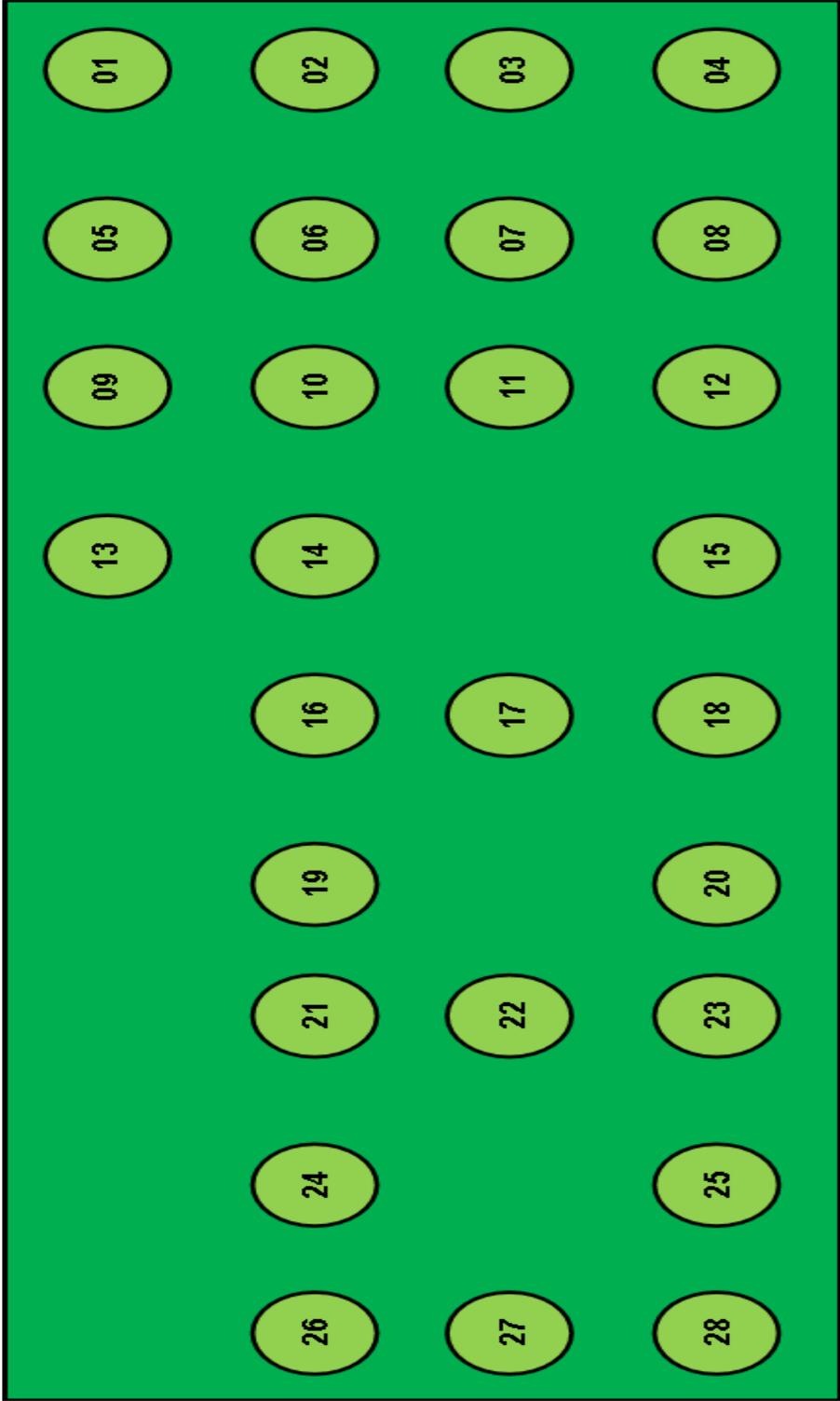


Figura N°29. Croquis de la tarea a muestrear

ANEXO N°3

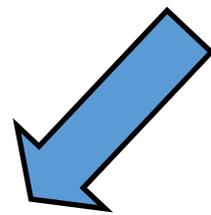
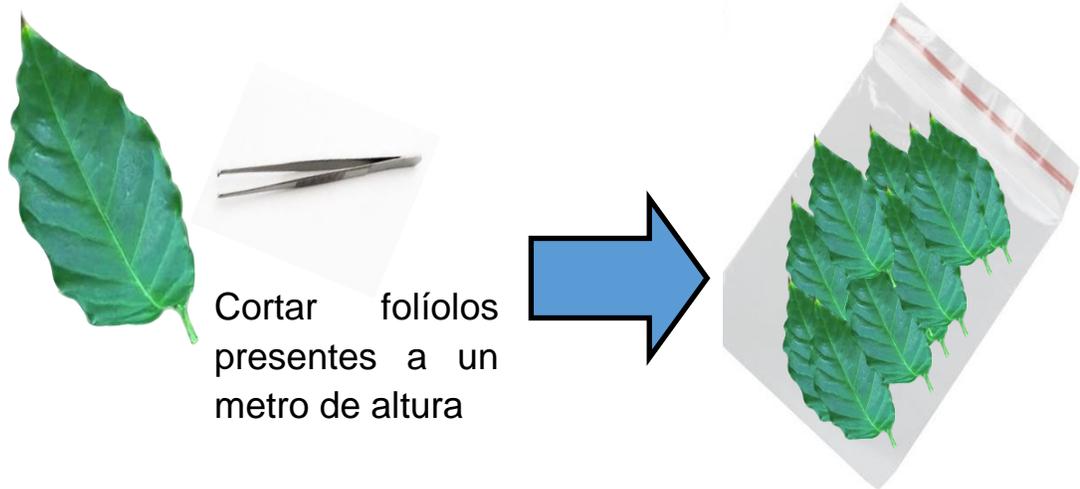
TABLA DE NÚMEROS ALEATORIOS CON LOS NÚMEROS DE MUESTRA  
SELECCIONADOS. (56)

## TABLA DE NÚMEROS ALEATORIOS. (56)

70558	82866	16430	37001	34053	76832	82929	77679	62749	95765
74604	15703	48745	85224	13248	27475	53003	70379	24854	97798
40081	27953	56742	55681	77852	75291	36750	99760	61997	71756
25027	57701	95858	57653	86553	29710	48489	60812	64269	58387
83574	93702	87408	21044	27159	82046	18815	93411	29926	84112
26646	13470	45498	21697	22294	33797	18882	72872	37910	47832
16948	39526	85289	52067	87433	85454	44063	89117	45621	21323
29008	77721	35994	46824	11468	34794	57584	63096	57861	77188
64720	49064	48729	58997	37314	38361	39443	63352	50183	88052
87480	57256	54005	33333	97180	13218	22153	29607	72194	70670
84805	31215	83122	67363	79349	31770	44812	79063	17212	95344
82822	42347	14261	59066	40475	30403	79589	86796	37902	63346
18145	12877	77661	36983	11582	32947	23689	71505	36917	24645
46825	39462	16549	90604	29520	30427	38938	43267	46846	17475
86750	62003	30226	37656	90760	14617	37124	36522	68914	95643
84416	80200	37014	41288	15048	38668	84883	70446	67205	70997
65426	23188	18416	81981	62785	82964	53046	19672	94463	94353
11976	71890	25881	43293	79508	72287	94848	33020	65153	53105
71370	55944	45800	62366	29748	83079	99018	90263	80889	46690
55449	83929	26903	19717	58249	83982	65691	17591	56077	36622
12103	89764	16181	21650	63356	53746	60989	54083	64493	57384
80503	10489	68214	15148	28852	61088	71748	10789	54834	45723
23868	46475	51049	27522	58632	84137	89916	12228	53082	29943

ANEXO N°4

ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN Y TRASLADO DE  
MUESTRAS



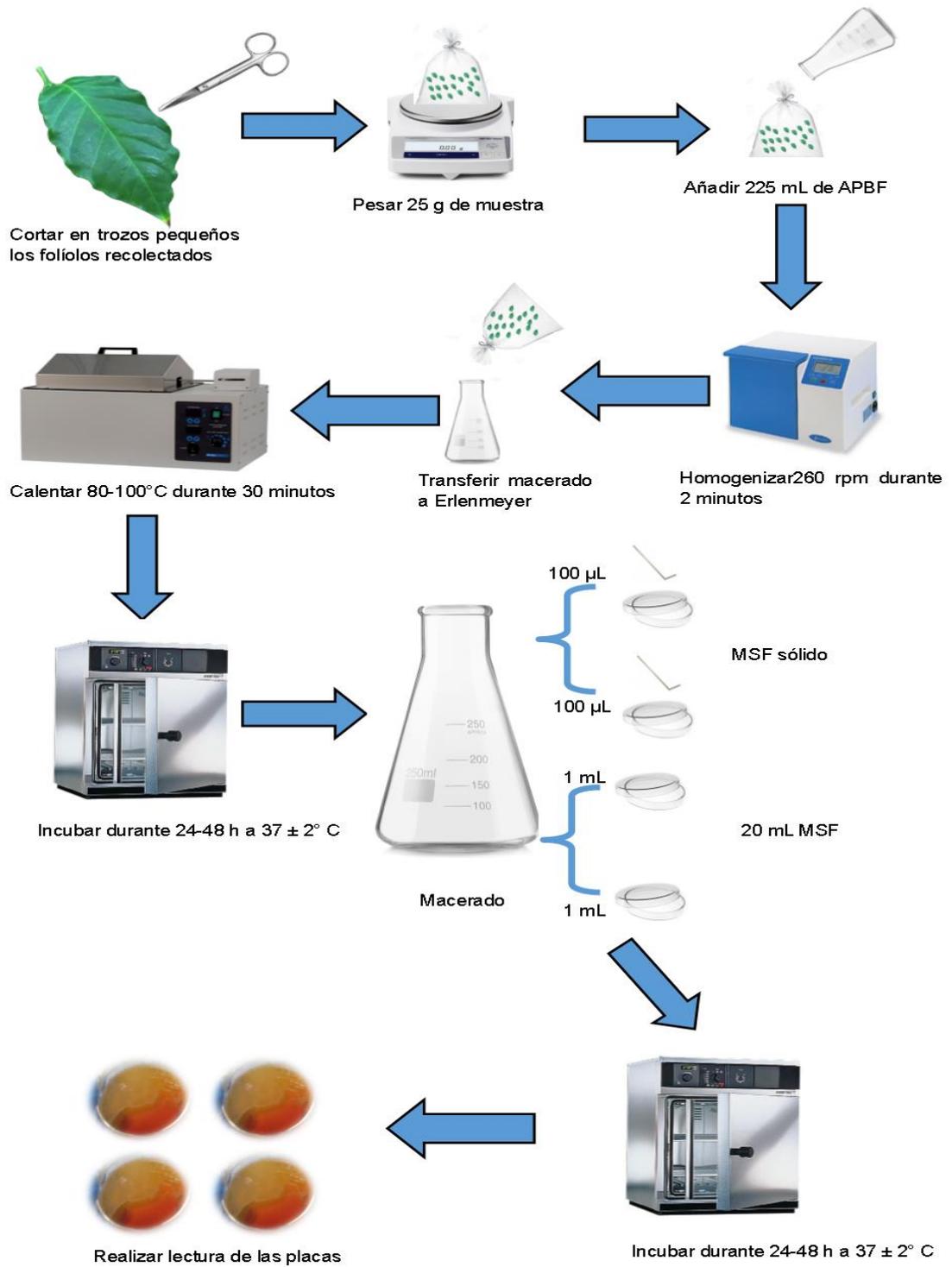
Trasladar las muestras al laboratorio



**Figura N°30.** Esquema de Procedimiento de recolección y traslado de muestras

ANEXO N°5

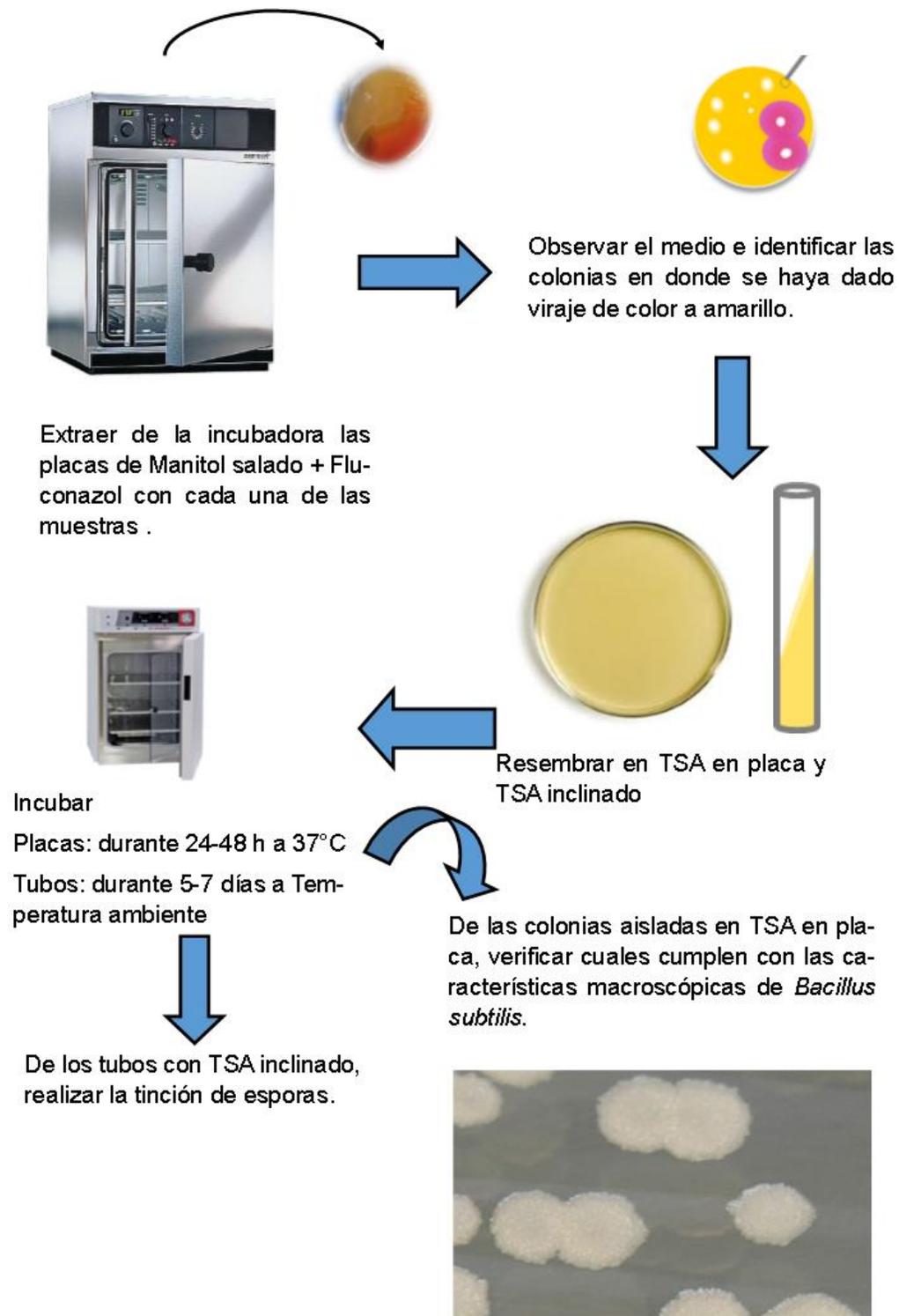
ESQUEMA DE TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE FOLIOLOS DE  
CAFETO



**Figura N°31.** Esquema de procedimiento de tratamiento de las muestras de folíolos de cafeto.

ANEXO N°6

ESQUEMA DE PURIFICACION DE AISLADOS Y VERIFICACION DE  
MORFOLOGIA MACROSCOPICA



**Figura N°32.** Purificación de aislados y verificación de morfología macroscópica de *Bacillus* sp.

ANEXO N°7

ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO DE TINCION DE GRAM

Agregar sobre un portaobjeto una gota de solución salina



Tomar con un asa en anillo estéril, una de las colonias características de *B. subtilis*



Inocular la colonia bacteriana en la solución salina.



Agregar lugol (mordiente) hasta cubrir el inculo y dejar reposar por 1 minuto. Retirar con agua destilada



Agregar cristal violeta hasta cubrir el inculo y dejar reposar por 1 minuto. Retirar con agua destilada



Fijar la bacteria flameando el portaobjeto con el inculo bacteriano



Lavar con alcohol-acetona y retirar inmediatamente con agua destilada



Agregar Solución de Safranina hasta cubrir el inculo y dejar reposar por 1 minuto. Retirar con agua destilada



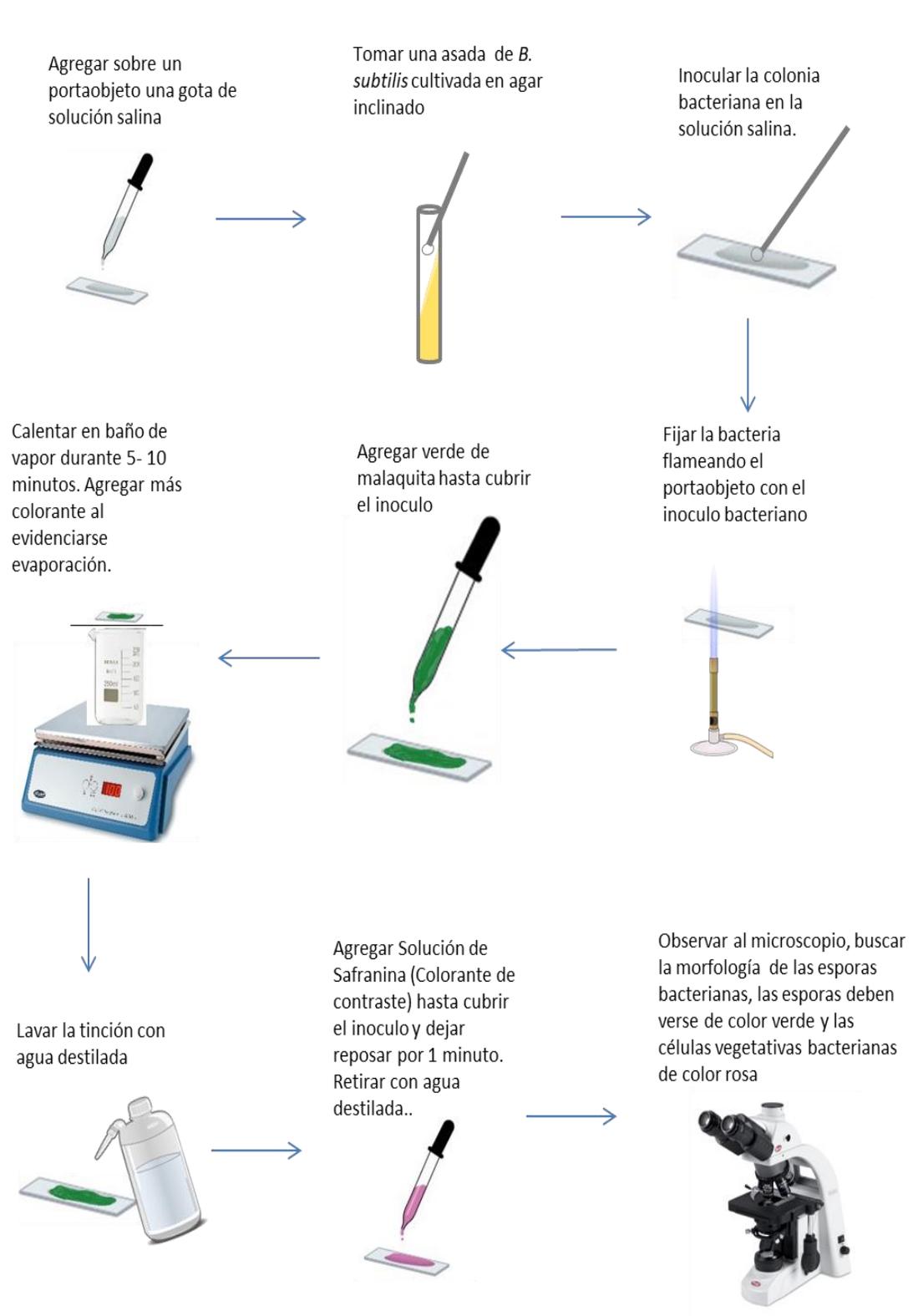
Observar al microscopio



Figura N°34. Esquema de procedimiento para la tinción de Gram

ANEXO N°8

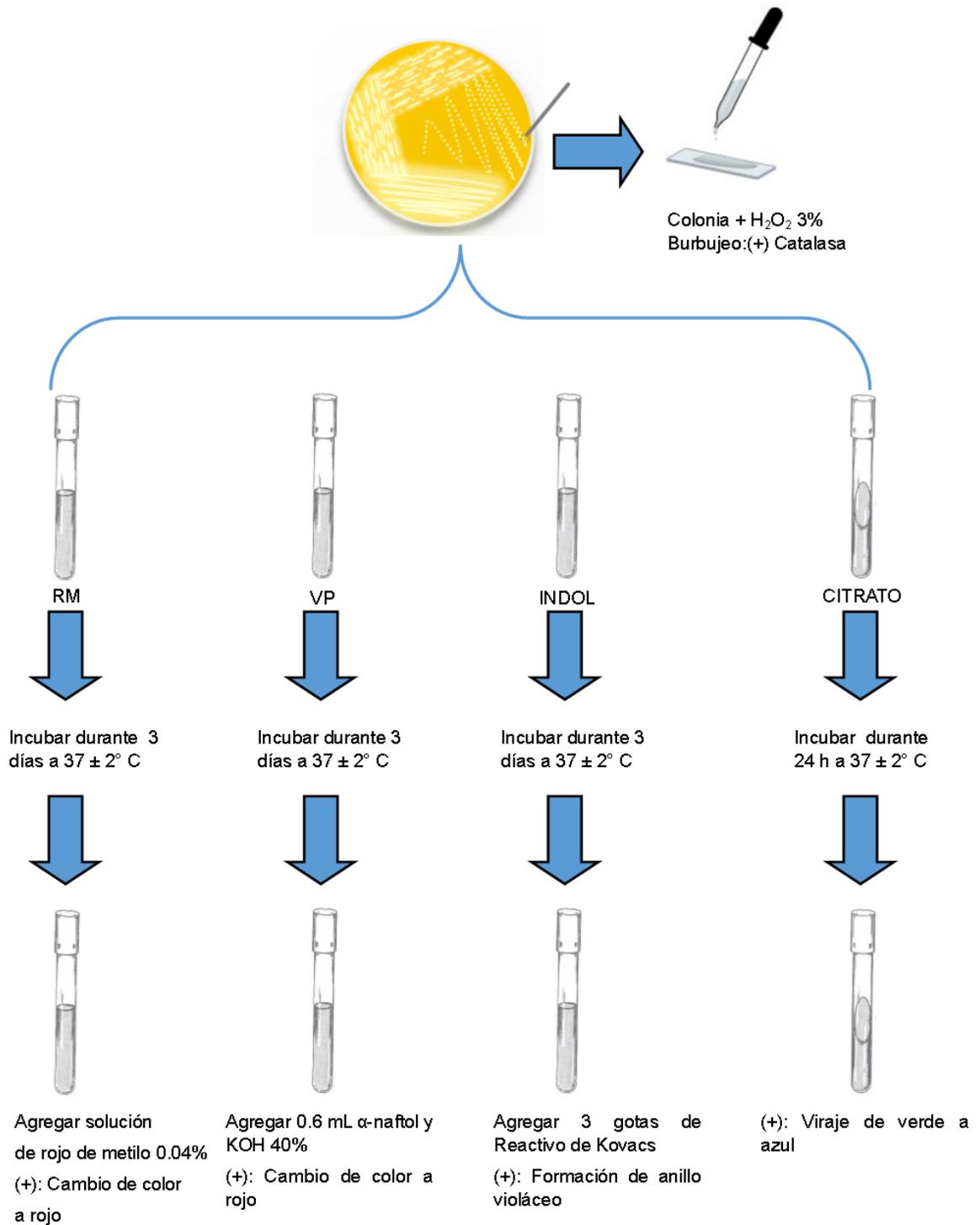
ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO DE TINCION DE ESPORAS.



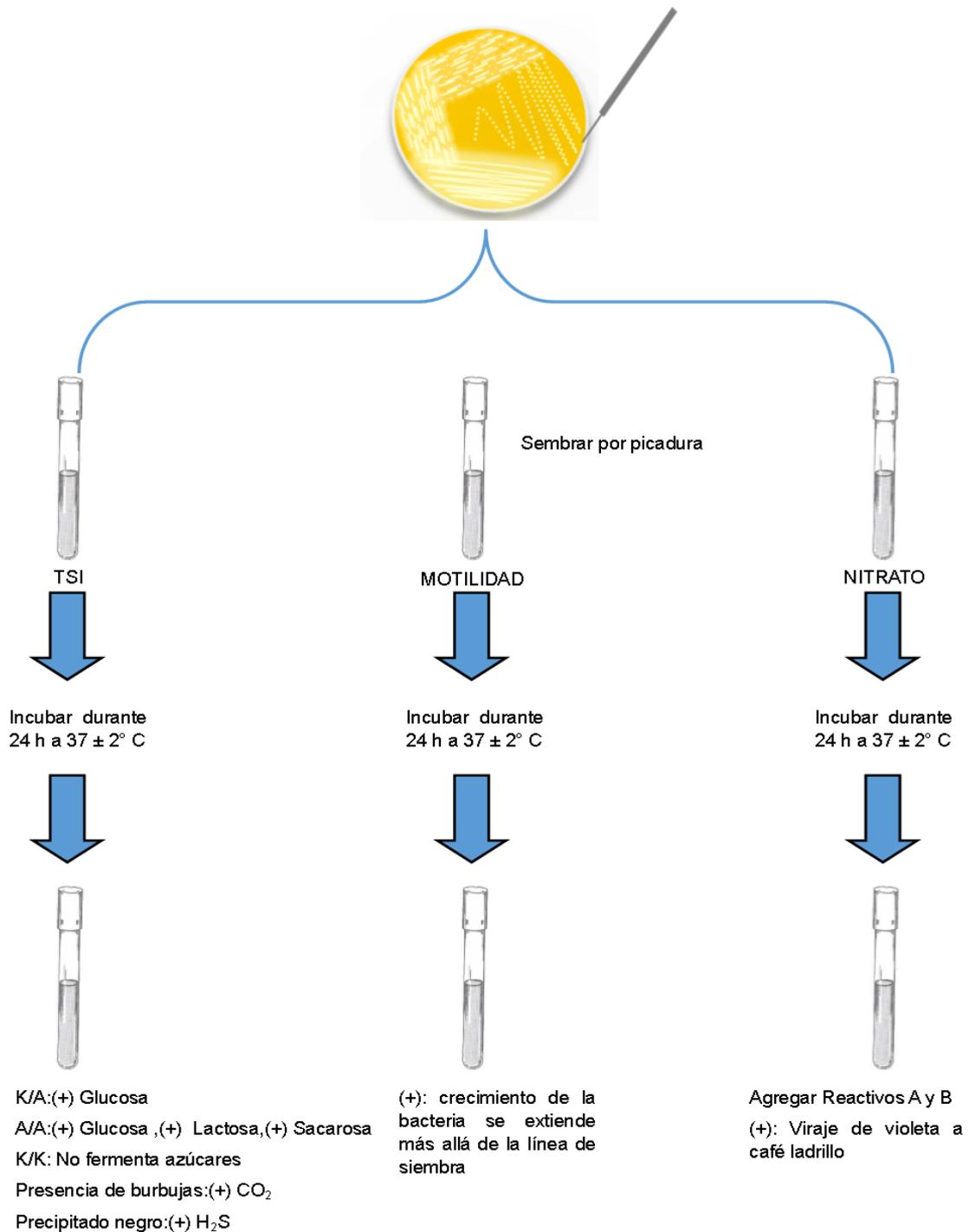
**Figura N°35.** Esquema de procedimiento para tinción de esporas.

ANEXO N°9

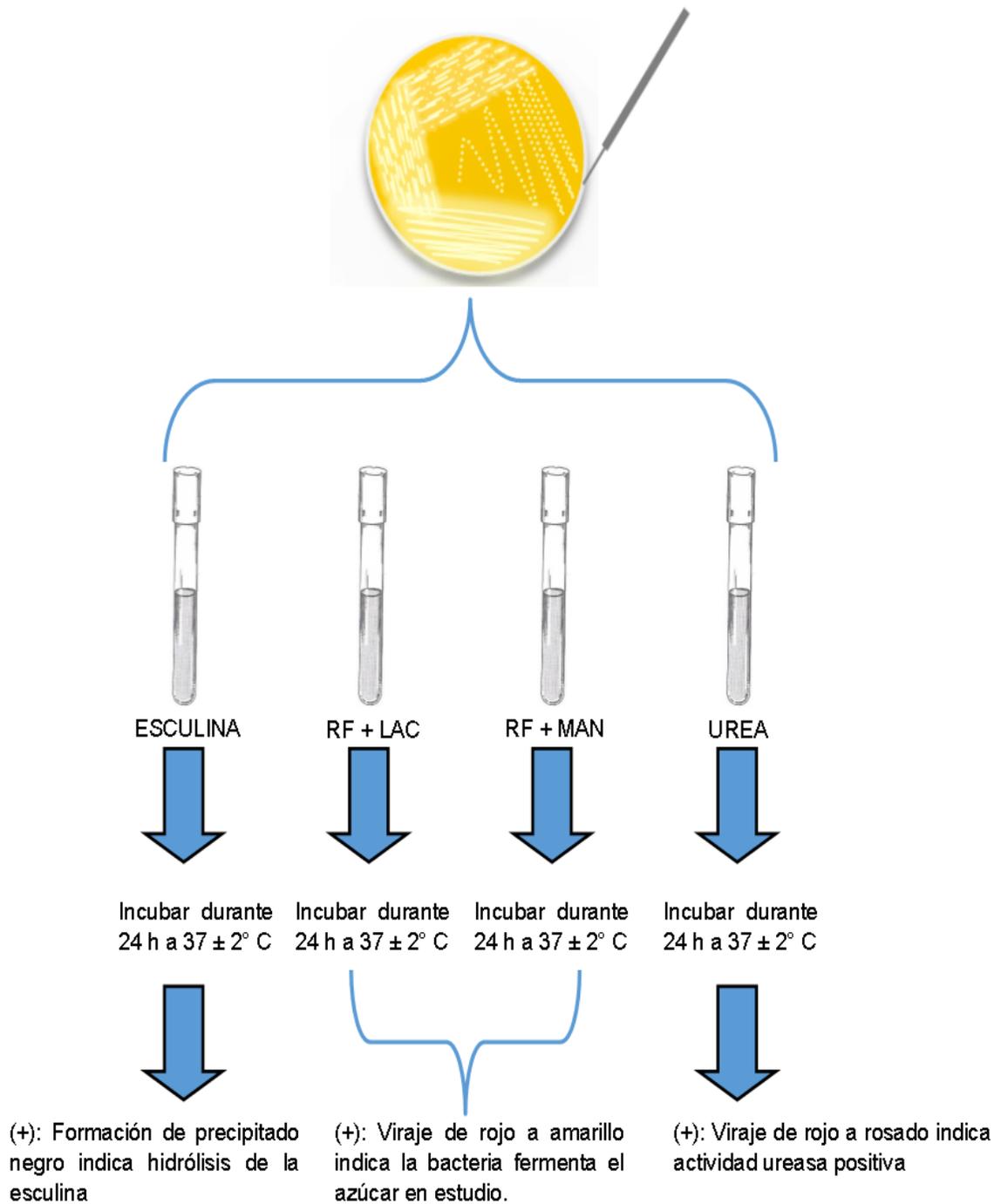
ESQUEMAS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS



**Figura N° 36.** Inoculación de pruebas bioquímicas: Catalasa, rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP), indol y citrato



**Figura N° 37.** Inoculación de pruebas bioquímicas: Hierro tres azúcares (TSI), motilidad, reducción de nitratos.



**Figura N° 38.** Inoculación de pruebas bioquímicas: Esculina, caldo rojo de fenol + lactosa (RF+LAC), caldo rojo de fenol + manitol (RF+MAN), urea.

ANEXO N°10

ESQUEMA DE COSECHA DE *Bacillus sp.*

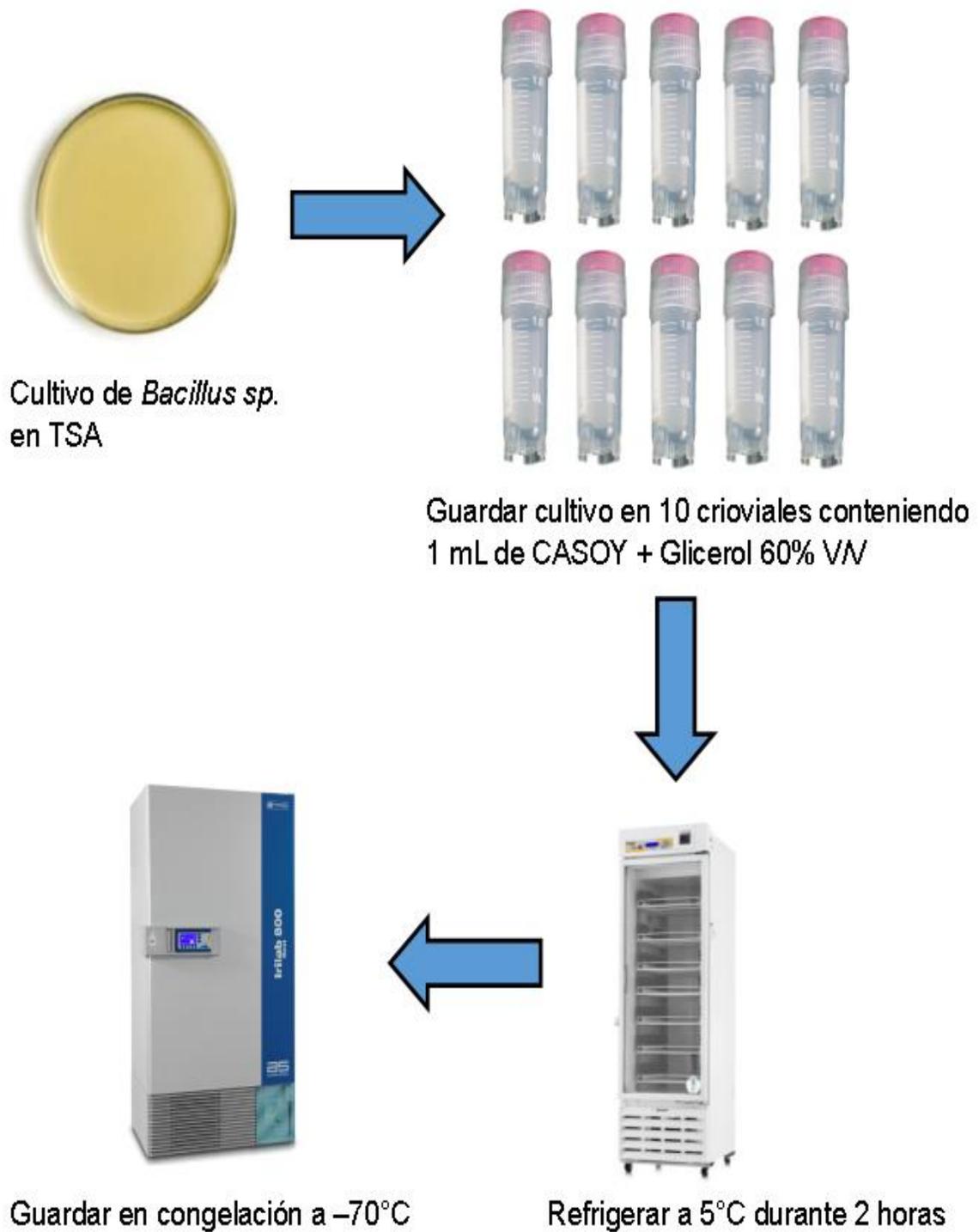
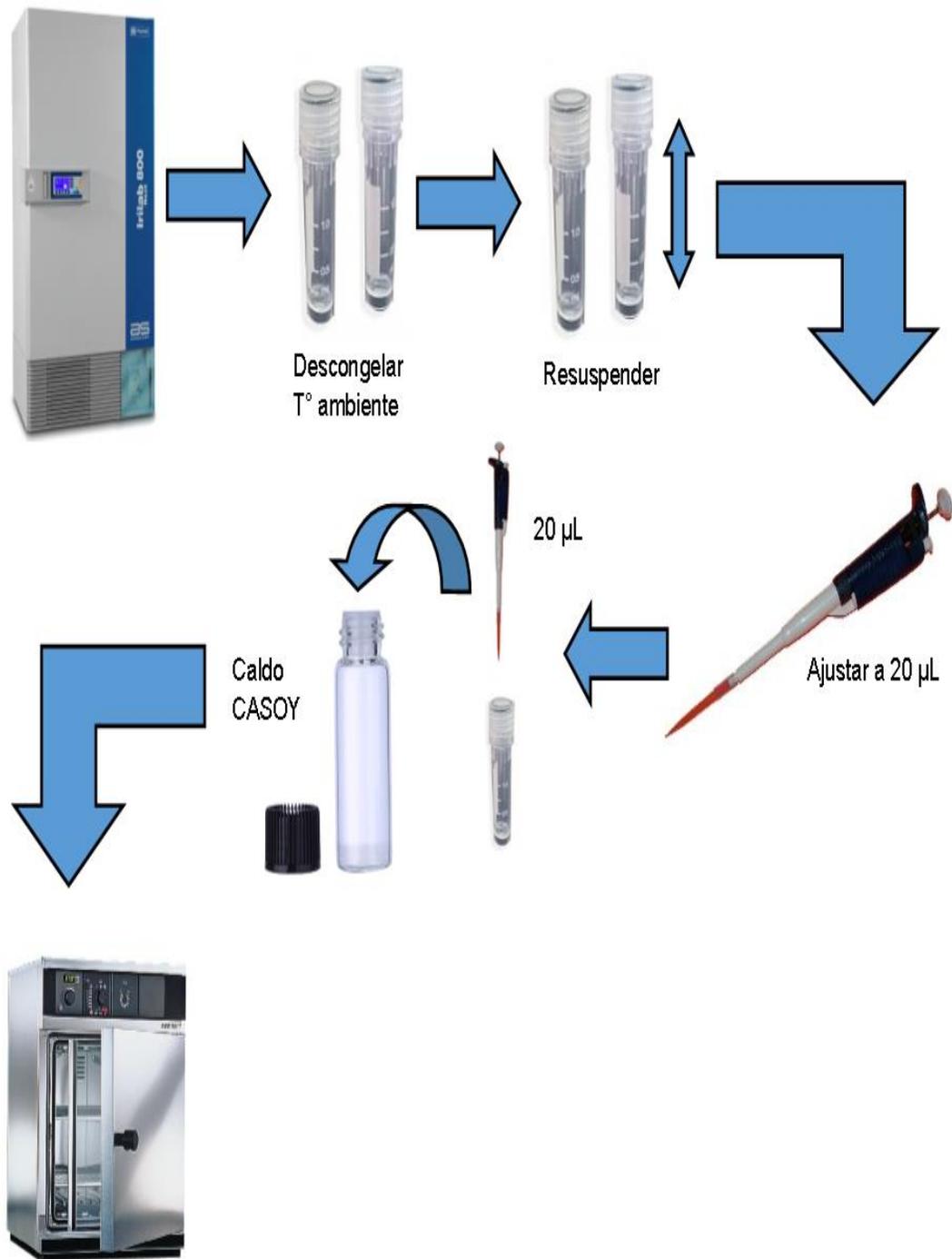


Figura N°33. Esquema de procedimiento de cosecha de *Bacillus sp.*

ANEXO N°11

ESQUEMA DE REANIMACION DE CEPAS DE *Bacillus subtilis*.

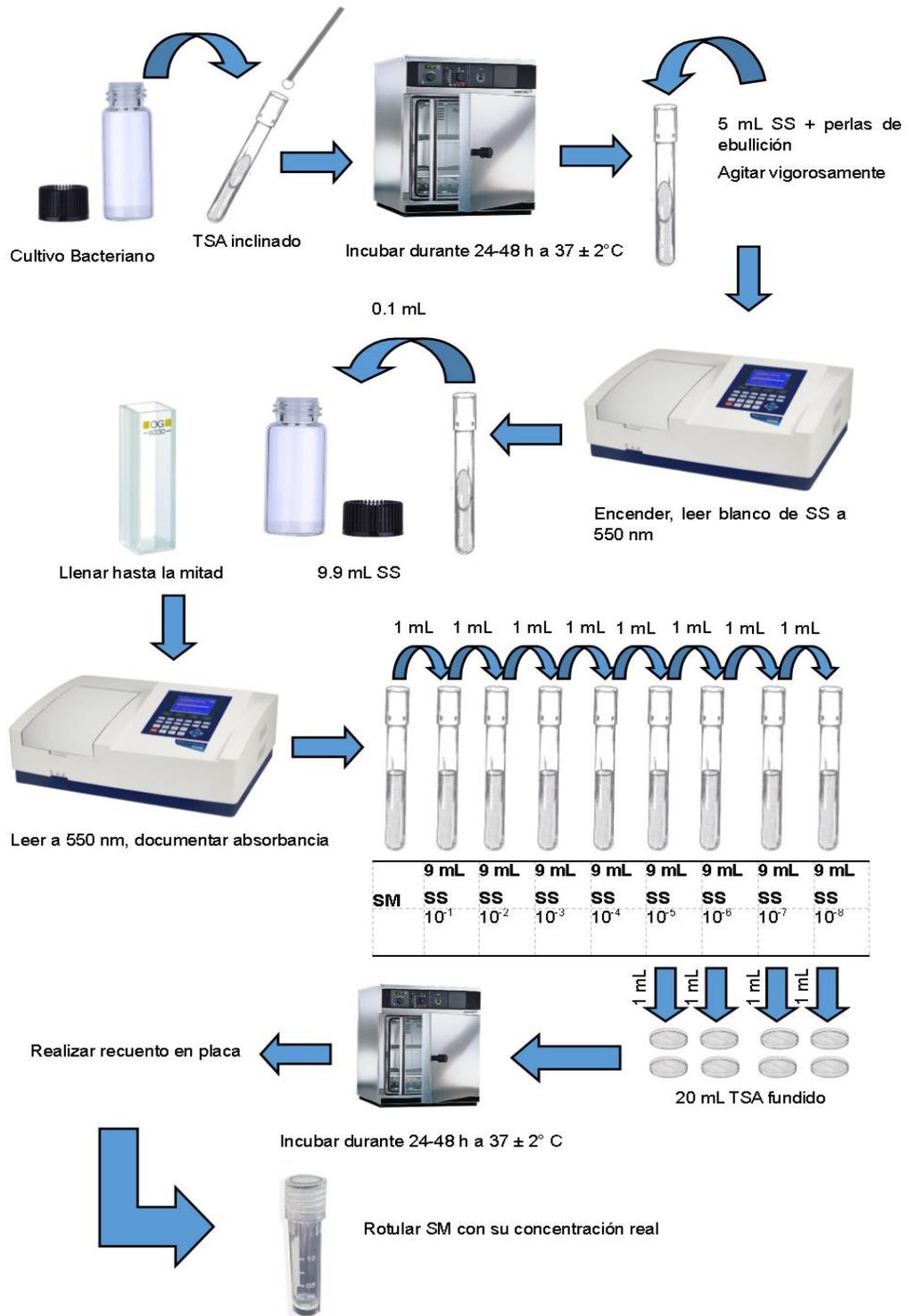


Incubar durante 24-48 h a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$

**Figura N° 39.** Reanimación de cepas de *Bacillus subtilis*.

ANEXO N°12

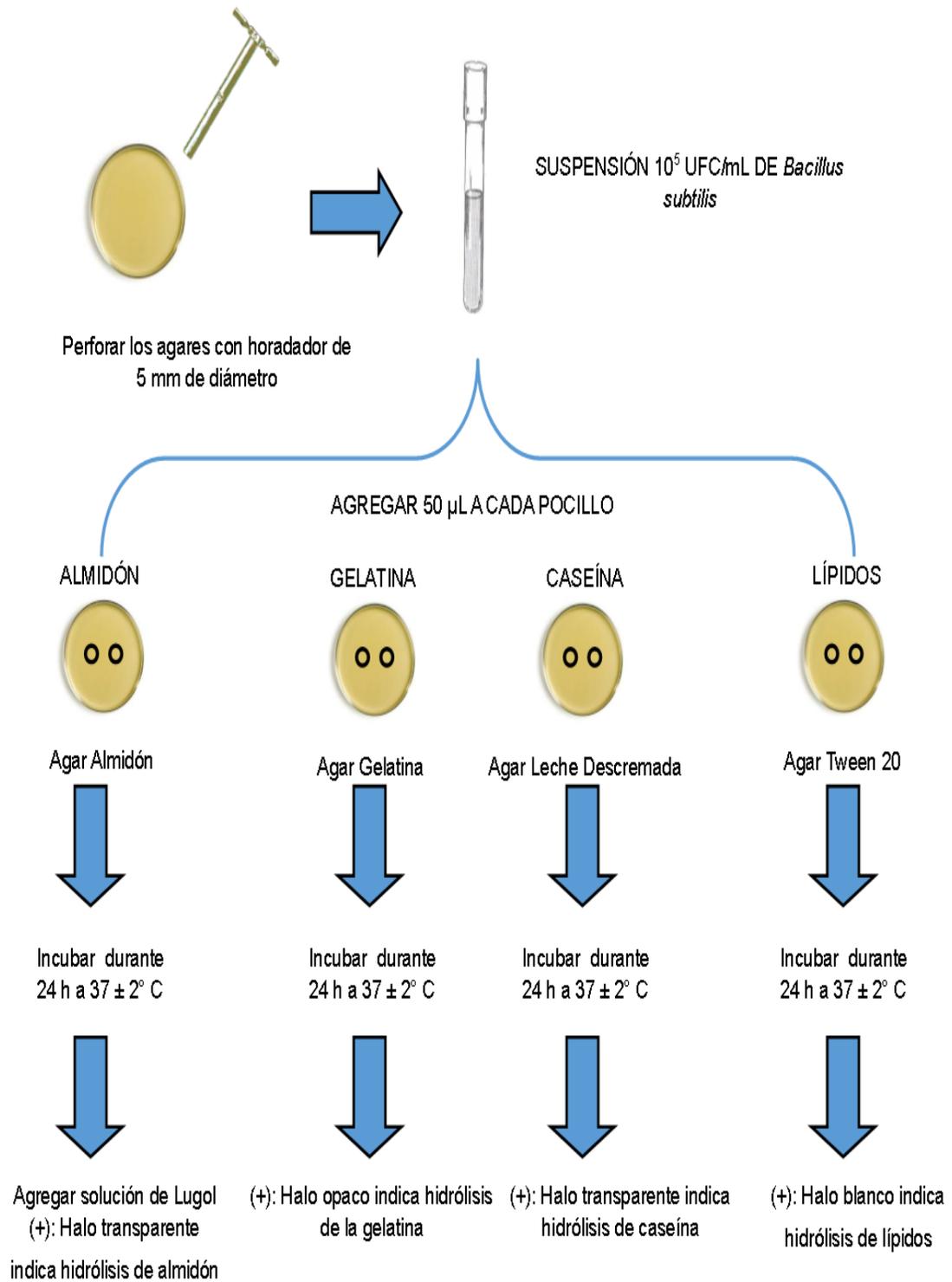
ESQUEMA DE SIEMBRA Y CONTEO DE LAS CEPAS BACTERIANAS.



**Figura N° 40.** Esquema de procedimiento de siembra y conteo de la cepas bacterianas.

ANEXO N°13

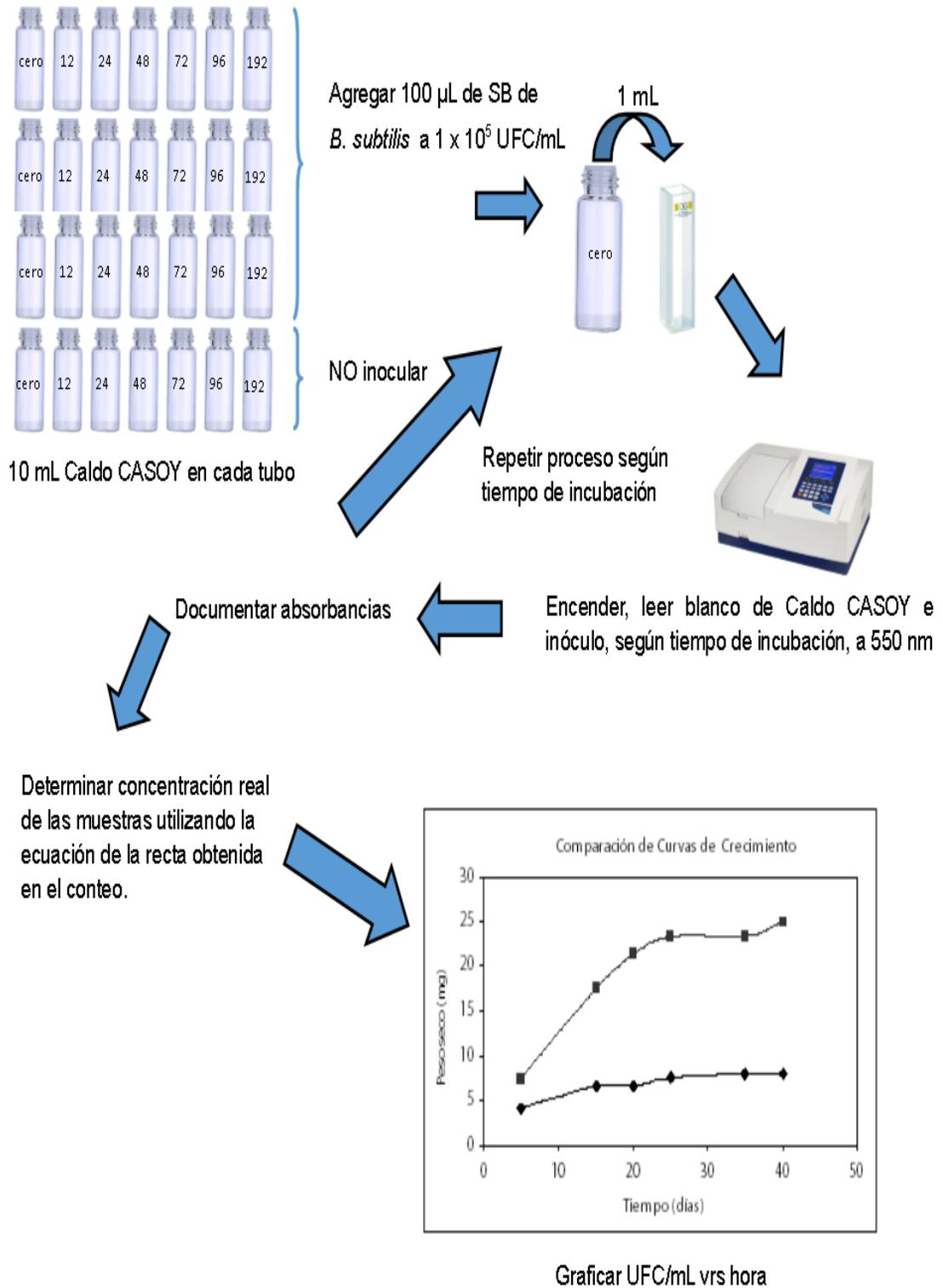
ESQUEMA DE PRUEBAS ENZIMATICAS



**Figura N° 41.** Esquema de procedimiento para pruebas enzimáticas.

ANEXO N°14

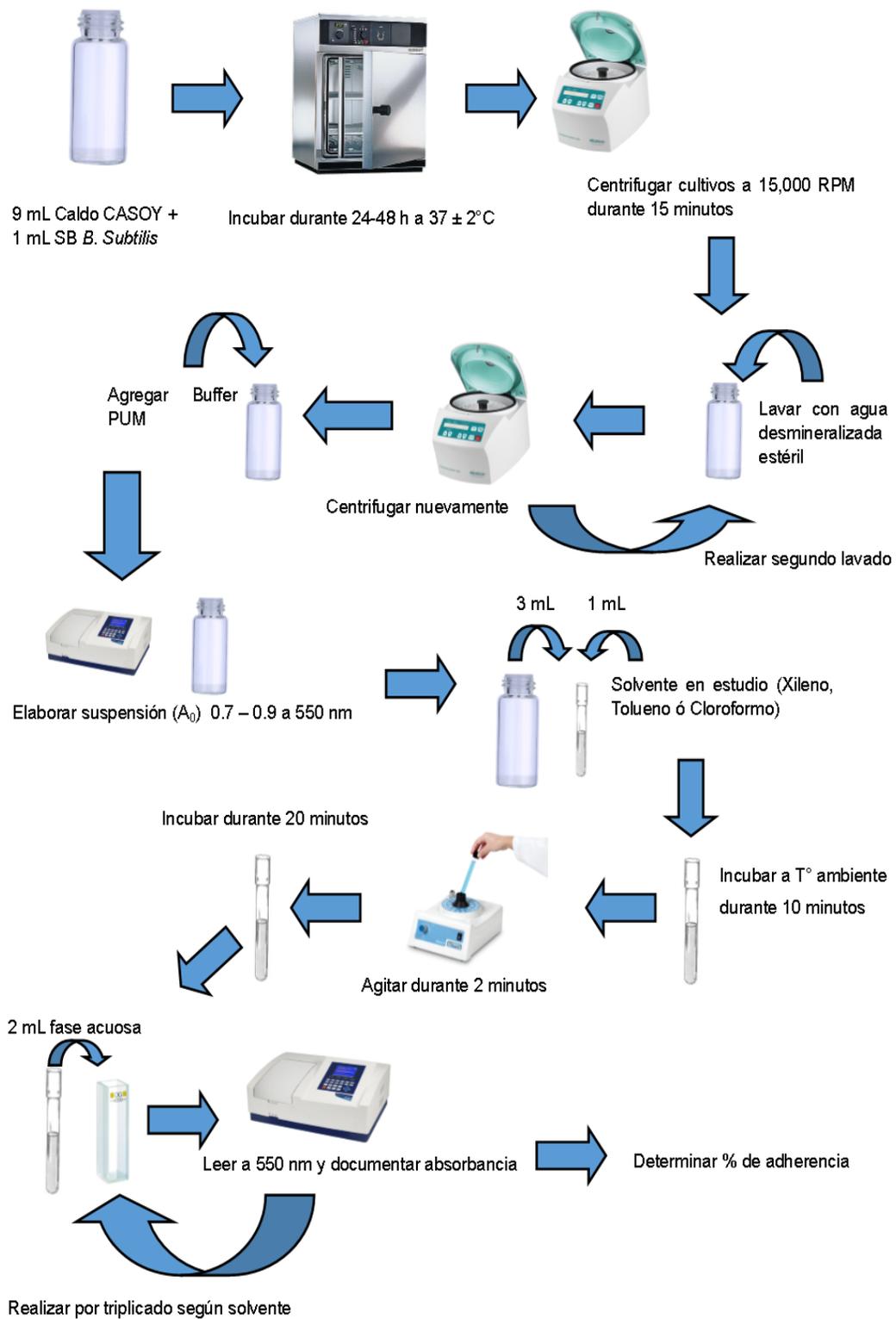
ESQUEMA DE CINETICA DE CRECIMIENTO.



**Figura N° 42.** Procedimiento para cinética de crecimiento

ANEXO N°15

ESQUEMA DE PRUEBA DE ADHESION A SOLVENTES ORGANICOS.



**Figura N° 43.** Prueba de adhesión a solventes orgánicos.

ANEXO N°16

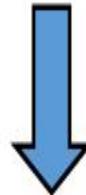
ESQUEMA DE PRUEBA DE TOLERANCIA A pH.



Agregar 10  $\mu$ L de SB de  
*B. subtilis*



Incubar durante 24-48 h a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$

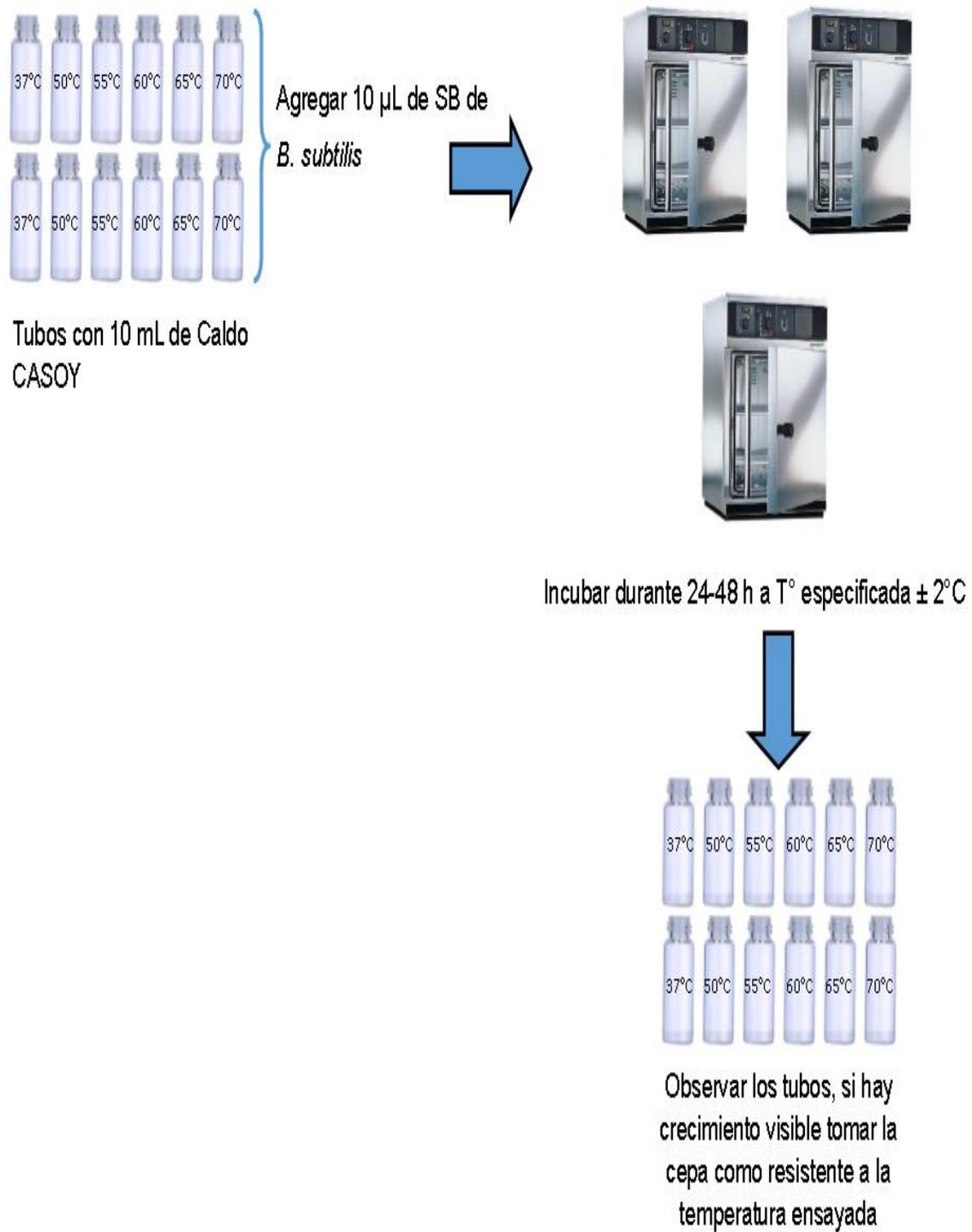


Observar los tubos, si hay  
crecimiento visible tomar la  
cepa como tolerante a ese  
nivel de pH.

**Figura N° 44.** Esquema de procedimiento para prueba de tolerancia a pH

ANEXO N°17

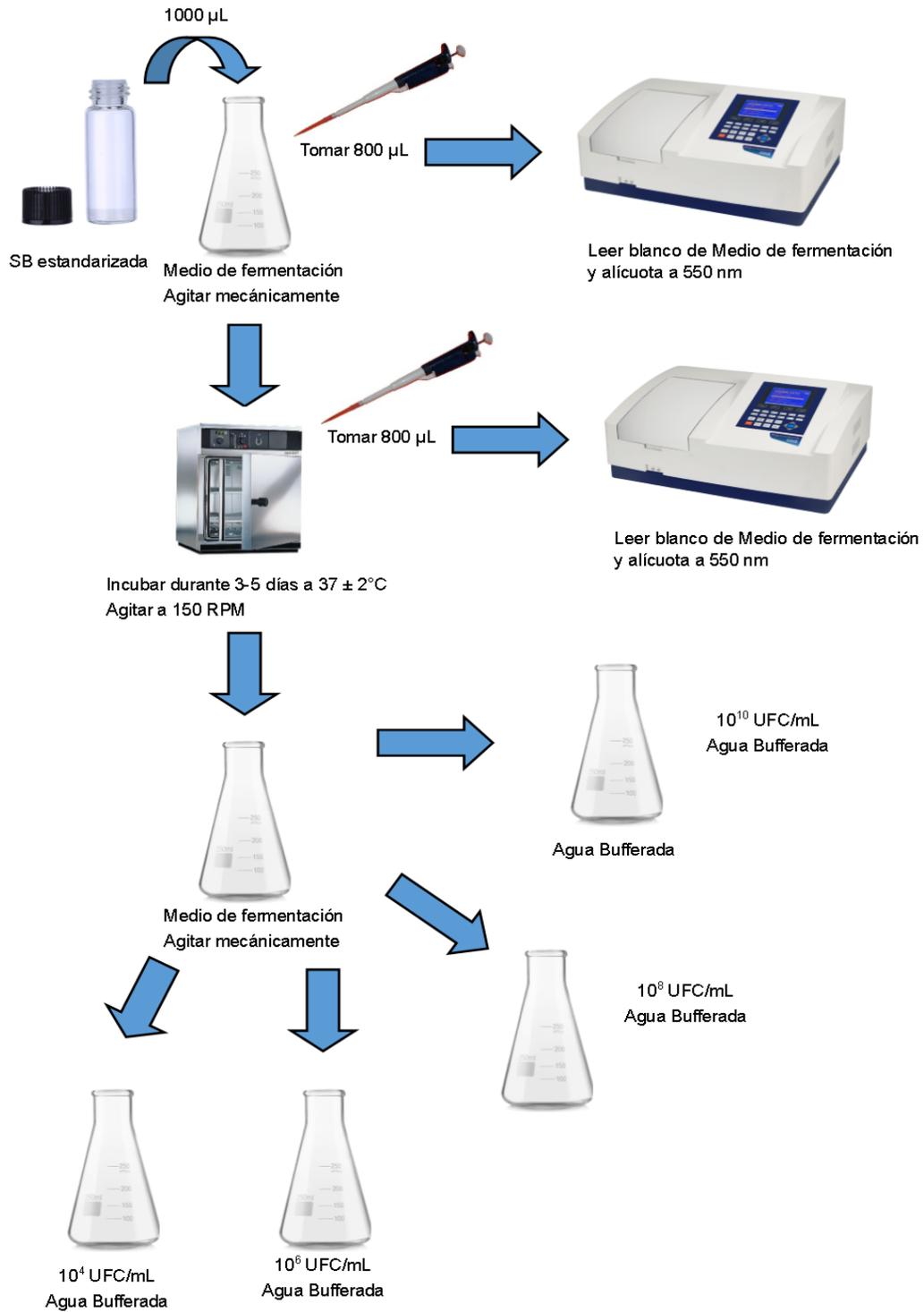
ESQUEMA DE PRUEBA DE TOLERANCIA A TEMPERATURAS



**Figura N° 45.** Esquema de procedimiento para prueba de tolerancia a temperatura

ANEXO N° 18

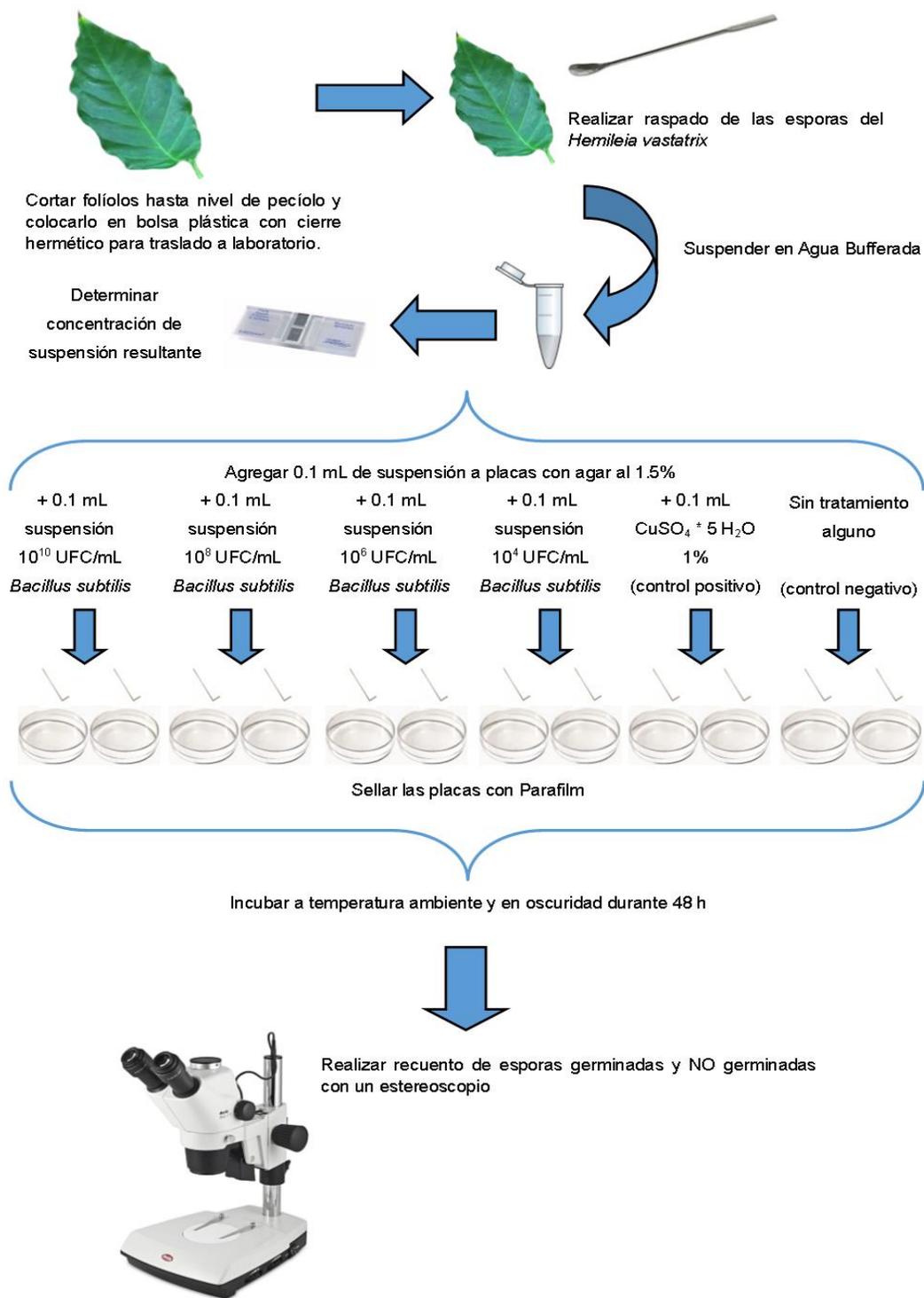
ESQUEMA DE PREPARACION DE SUSPENSIONES BACTERIANAS DE  
*Bacillus subtilis*.



**Figura N° 46.** Esquema de procedimiento de preparación de suspensiones bacterianas de *Bacillus subtilis*

ANEXO N° 19

ESQUEMA DE COMPROBACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE  
*Bacillus subtilis* CONTRA *Hemileia vastatrix*.



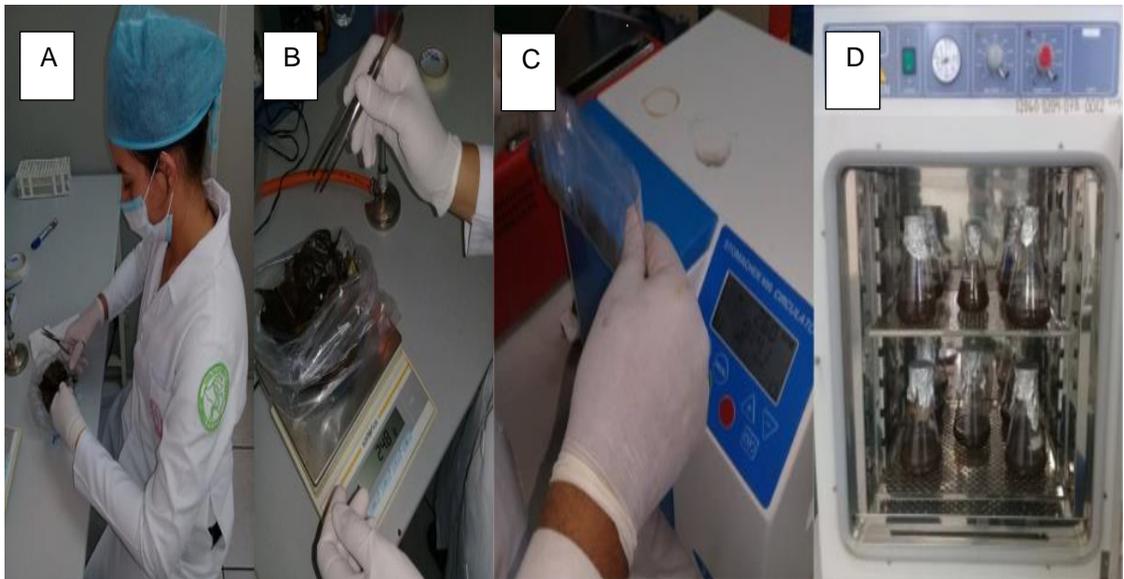
**Figura N° 47.** Esquema de procedimiento de comprobación de la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* contra *Hemileia vastatrix*

ANEXO N°20

FIGURAS DE RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.



**Figura N°48.** Procedimiento de recolección de hojas de café.



**Figura N°49.** Procedimiento de macerado de hojas. A) Corte, B) Pesado, C) Homogenizado con APBF, D) Calentamiento a 100°C.

ANEXO N°21

FIGURAS DE AISLAMIENTO DE *Bacillus sp.*

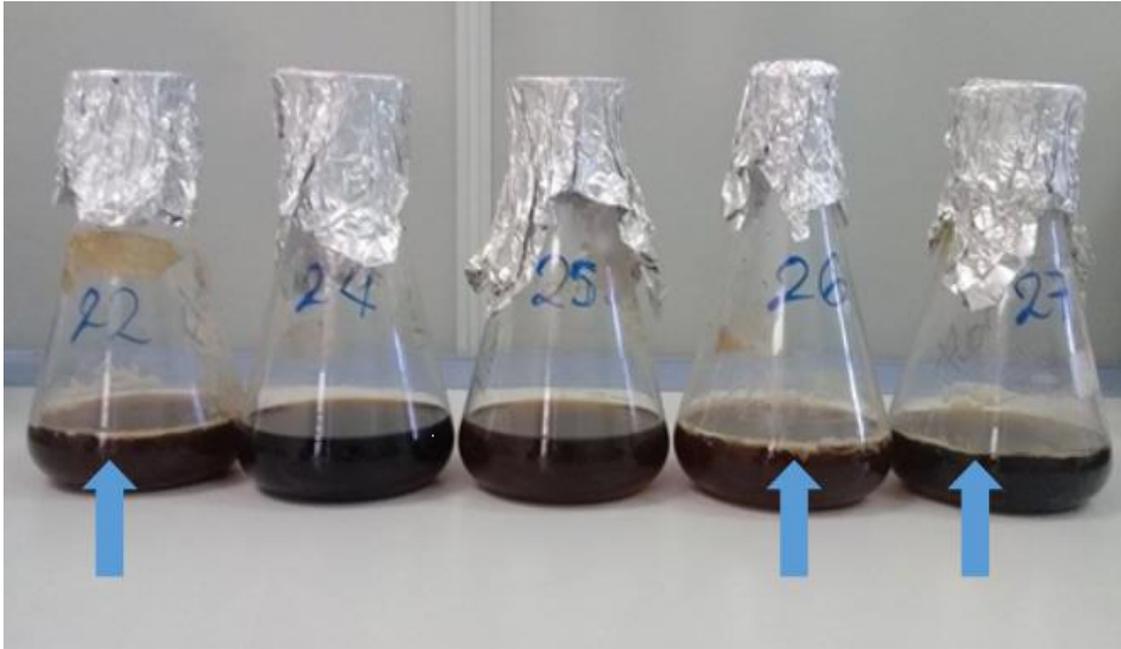


Figura N°50. Películas sobrenadantes fácilmente observables

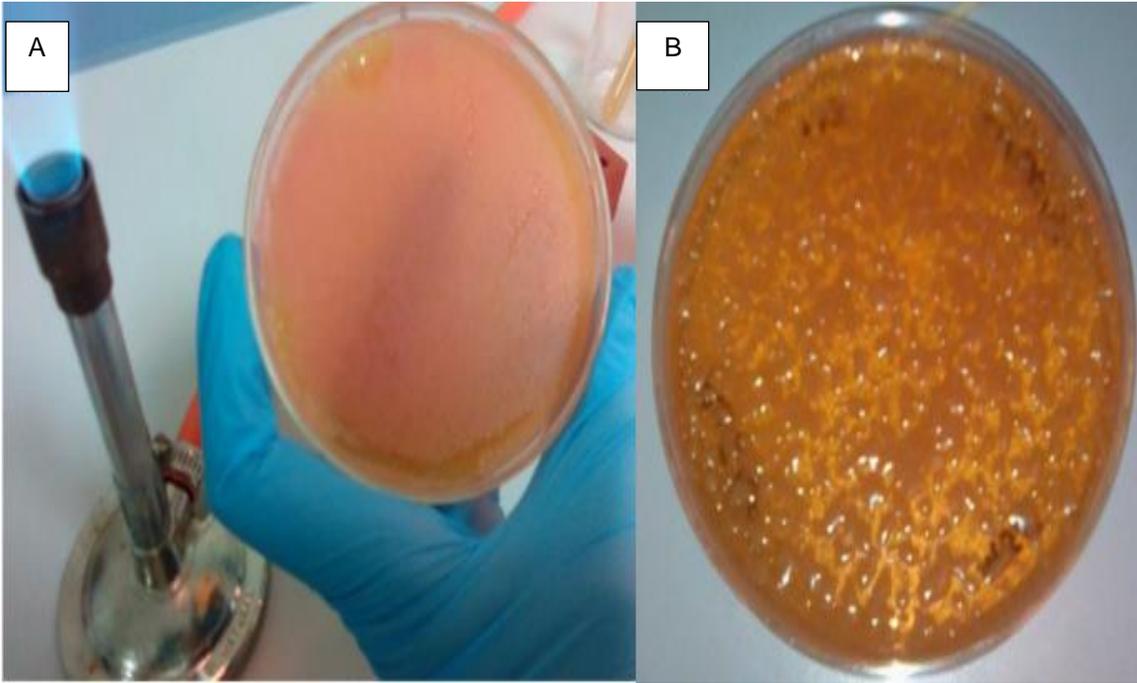
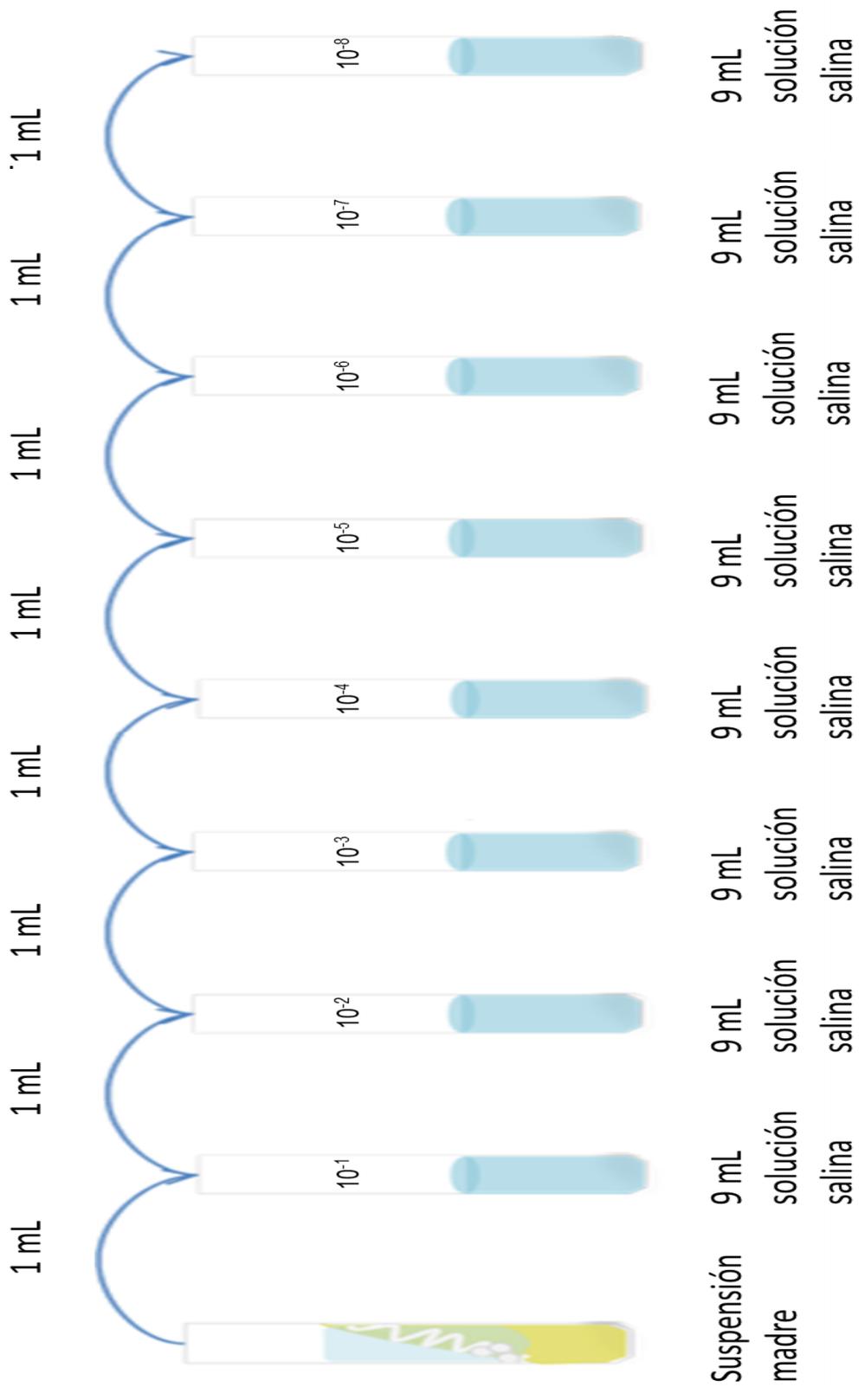


Figura N°51. Morfología macroscópica de los aislados de *Bacillus* en medio MSAF. Nótese la consistencia seca (A) y viscosa (B)

ANEXO N°22

ESQUEMA DE CASCADA DE DILUCIÓN EMPLEADO EN CONTEO DE  
CEPAS BACTERIANAS



**Figura N°52.** Cascada de dilución empleada en el conteo de cepas de *Bacillus subtilis* estudiadas

ANEXO N°23

RESULTADOS OBTENIDOS EN CONTEO DE CEPAS BACTERIANAS

**Tabla N°20. Resultados conteo de cepas en estudio**

Dilución		10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-7</sup>		10 <sup>-8</sup>	
Factor de Dilución		100,000		1,000,000		10,000,000		100,000,000	
Bacilo 01	Conteo	DNPC	DNPC	856	468	1600	1480	1920	1472
	UFC/mL	-----	-----	8.56 x 10 <sup>8</sup>	4.68 x 10 <sup>8</sup>	1.60 x 10 <sup>9</sup>	1.48 x 10 <sup>9</sup>	1.92 x 10 <sup>10</sup>	1.43 x 10 <sup>10</sup>
	Promedio	-----	-----	6.62 x 10 <sup>8</sup>		1.54 x 10 <sup>9</sup>		1.70 x 10 <sup>10</sup>	
Bacilo 02	Conteo	DNPC	DNPC	624	1472	140	174	37	34
	UFC/mL	-----	-----	6.24 x 10 <sup>8</sup>	1.47 x 10 <sup>9</sup>	1.40 x 10 <sup>9</sup>	1.74 x 10 <sup>9</sup>	3.70 x 10 <sup>9</sup>	3.40 x 10 <sup>9</sup>
	Promedio	-----	-----	1.09 x 10 <sup>9</sup>		1.57 x 10 <sup>9</sup>		3.55 x 10 <sup>9</sup>	
Bacilo 01	Conteo	388	388	139	80	25	15	7	9
	UFC/mL	3.88 x 10 <sup>7</sup>	3.88 x 10 <sup>7</sup>	1.40 x 10 <sup>8</sup>	8.08 x 10 <sup>7</sup>	2.50 x 10 <sup>8</sup>	1.50 x 10 <sup>8</sup>	7.00 x 10 <sup>8</sup>	4.60 x 10 <sup>8</sup>
	Promedio	3.88 x 10 <sup>7</sup>		1.10 x 10 <sup>8</sup>		2.00 x 10 <sup>8</sup>		8.00 x 10 <sup>8</sup>	
Bacilo 02	Conteo	DNPC	DNPC	76	42	24	44	14	35
	UFC/mL	-----	-----	7.60 x 10 <sup>7</sup>	4.20 x 10 <sup>7</sup>	2.40 x 10 <sup>8</sup>	4.40 x 10 <sup>8</sup>	1.40 x 10 <sup>9</sup>	3.50 x 10 <sup>9</sup>
	Promedio	-----	-----	5.90 x 10 <sup>7</sup>		3.40 x 10 <sup>8</sup>		2.45 x 10 <sup>9</sup>	

ANEXO N°24

RESULTADOS OBTENIDOS EN CINÉTICA DE CRECIMIENTO

**Tabla N°21.** Absorbancias de cinética de crecimiento bacilo 01

HORA	ABS1	ABS2	ABS3	ABS PROM
0	0.019	0.005	0.004	0.009
4	0.003	0.001	0.002	0.002
24	0.215	0.212	0.162	0.196
48	0.187	0.137	0.145	0.156
72	0.135	0.138	0.127	0.133
96	0.771	0.127	0.115	0.338
196	0.056	0.46	0.257	0.258

**Tabla N°22.** Concentraciones de cinética de crecimiento bacilo 01

HORA	C1	C2	C3	C PROM
0	$2.42 \times 10^{10}$	$1.02 \times 10^{10}$	$9.20 \times 10^9$	$1.45 \times 10^{10}$
4	$8.20 \times 10^9$	$6.20 \times 10^9$	$7.20 \times 10^9$	$7.20 \times 10^9$
24	$2.20 \times 10^{11}$	$2.17 \times 10^{11}$	$1.67 \times 10^{11}$	$2.02 \times 10^{11}$
48	$1.92 \times 10^{11}$	$1.42 \times 10^{11}$	$1.50 \times 10^{11}$	$1.62 \times 10^{11}$
72	$1.40 \times 10^{11}$	$1.43 \times 10^{11}$	$1.32 \times 10^{11}$	$1.39 \times 10^{11}$
96	$7.76 \times 10^{11}$	$1.32 \times 10^{11}$	$1.20 \times 10^{11}$	$3.43 \times 10^{11}$
196	$6.12 \times 10^{10}$	$4.65 \times 10^{11}$	$2.62 \times 10^{11}$	$2.63 \times 10^{11}$

**Tabla N°23.** Absorbancias de cinética de crecimiento bacilo 02

HORA	ABS1	ABS2	ABS3	ABS PROM
0	0.005	0.003	0.002	0.003
4	0.001	0.005	0.005	0.004
24	0.15	0.205	0.185	0.180
48	0.117	0.392	0.138	0.216
72	0.125	0.149	0.12	0.131
96	0.117	0.218	0.07	0.135
196	0.056	0.17	0.56	0.262

**Tabla N°24.** Concentraciones de cinética de crecimiento bacilo 01

HORA	C1	C2	C3	C PROM
0	$6.50 \times 10^9$	$1.50 \times 10^9$	$-1.00 \times 10^9$	$2.33 \times 10^9$
4	$-3.50 \times 10^9$	$6.50 \times 10^9$	$6.50 \times 10^9$	$3.17 \times 10^9$
24	$3.69 \times 10^{11}$	$5.07 \times 10^{11}$	$4.57 \times 10^{11}$	$4.44 \times 10^{11}$
48	$2.87 \times 10^{11}$	$9.74 \times 10^{11}$	$3.39 \times 10^{11}$	$5.33 \times 10^{11}$
72	$3.07 \times 10^{11}$	$3.67 \times 10^{11}$	$2.94 \times 10^{11}$	$3.22 \times 10^{11}$
96	$2.87 \times 10^{11}$	$5.39 \times 10^{11}$	$1.69 \times 10^{11}$	$3.32 \times 10^{11}$
196	$1.34 \times 10^{11}$	$4.19 \times 10^{11}$	$1.39 \times 10^{12}$	$6.49 \times 10^{11}$

**Tabla N°25.** Absorbancias de cinética de crecimiento bacilo 03

HORA	ABS1	ABS2	ABS3	ABS PROM
0	0.004	0.015	0.006	0.0083
4	0.007	0.01	0.013	0.0100
24	1.001	0.865	1.06	0.9753
48	0.335	0.332	0.358	0.3417
72	0.271	0.269	0.262	0.2673
96	1.109	0.696	0.442	0.7490
196	0.806	0.542	0.985	0.7777

**Tabla N°26.** Concentraciones de cinética de crecimiento bacilo 03

HORA	C1	C2	C3	CPROM
0	$5.60 \times 10^8$	$9.27 \times 10^8$	$6.27 \times 10^8$	$7.04 \times 10^8$
4	$6.60 \times 10^8$	$7.60 \times 10^8$	$8.60 \times 10^8$	$7.60 \times 10^8$
24	$3.38 \times 10^{10}$	$2.93 \times 10^{10}$	$3.58 \times 10^{10}$	$3.29 \times 10^{10}$
48	$1.16 \times 10^{10}$	$1.15 \times 10^{10}$	$1.24 \times 10^{10}$	$1.18 \times 10^{10}$
72	$9.46 \times 10^9$	$9.39 \times 10^9$	$9.16 \times 10^9$	$9.34 \times 10^9$
96	$3.74 \times 10^{10}$	$2.36 \times 10^{10}$	$1.52 \times 10^{10}$	$2.54 \times 10^{10}$
196	$2.73 \times 10^{10}$	$1.85 \times 10^{10}$	$3.33 \times 10^{10}$	$2.63 \times 10^{10}$

**Tabla N°27.** Absorbancias de cinética de crecimiento bacilo 03

HORA	ABS1	ABS2	ABS3	ABS PROM
0	0.009	0.021	0.015	0.015
4	0.02	0.019	0.017	0.019
24	0.442	0.537	0.512	0.497
48	0.53	0.228	0.098	0.285
72	0.812	1.016	1.1	0.976
96	1.071	1.19	0.064	0.775
196	0.958	1.222	0.02	0.733

**Tabla N°28.** Concentraciones de cinética de crecimiento bacilo 03

HORA	C1	C2	C3	CPROM
0	$2.19 \times 10^9$	$3.39 \times 10^9$	$2.79 \times 10^9$	$2.79 \times 10^9$
4	$3.29 \times 10^9$	$3.19 \times 10^9$	$2.99 \times 10^9$	$3.16 \times 10^9$
24	$4.55 \times 10^{10}$	$5.50 \times 10^{10}$	$5.25 \times 10^{10}$	$5.10 \times 10^{10}$
48	$5.43 \times 10^{10}$	$2.41 \times 10^{10}$	$1.11 \times 10^{10}$	$2.98 \times 10^{10}$
72	$8.25 \times 10^{10}$	$1.03 \times 10^{11}$	$1.11 \times 10^{11}$	$9.89 \times 10^{10}$
96	$1.08 \times 10^{11}$	$1.20 \times 10^{11}$	$7.69 \times 10^9$	$7.88 \times 10^{10}$
196	$9.71 \times 10^{10}$	$1.23 \times 10^{11}$	$3.29 \times 10^9$	$7.46 \times 10^{10}$

ANEXO N°25

EJEMPLOS DE CÁLCULOS REALIZADOS EN CINÉTICA DE  
CRECIMIENTO

EJEMPLO DE CÁLCULO DE UFC/mL A PARTIR DE CURVA DE CALIBRACIÓN

$$Y_{abs} = 1.00 \times 10^{-12} \frac{abs}{UFC \cdot mL^{-1}} X_{UFC/mL} - 0.0052_{abs}$$

$$X_{\frac{UFC}{mL}} = \frac{(Y_{abs} + 0.0052_{abs})}{1.00 \times 10^{-12} \frac{abs}{UFC \cdot mL^{-1}}}$$

$$X_{UFC/mL} = \frac{(0.212 + 0.0052)}{1.00 \times 10^{-12}} = 2.17 \times 10^{11} UFC/mL$$

EJEMPLO DE CÁLCULO DE VALORES LOGARÍMICOS PARA CURVA DE CRECIMIENTO

$$\text{Log} \left( \frac{UFC}{mL} \right) = \text{Log} \left( 2.02 \times 10^{11} \frac{UFC}{mL} \right) = 11.30$$

ANEXO N°26

RESULTADOS DE PRUEBAS DE TOLERANCIA A pH y TEMPERATURAS

**Tabla N°29.** Tabla de resultados de resistencia a distintos pH por cepa de *Bacillus subtilis* estudiada.

Número de tubos positivos							
Nivel de pH Muestra	4	5	6	7	8	9	10
Bacilo 01	0	1	2	2	2	2	1
Bacilo 02	0	1	2	2	2	2	1
Bacilo 03	1	1	2	2	2	2	1
Bacilo 27	0	1	2	2	2	2	2

**Tabla N°30.** Tabla de resultados de resistencia a distintas temperaturas, por cepa de *Bacillus subtilis* estudiada.

Número de tubos positivos						
Temperatura Muestra	37°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
Bacilo 01	2	2	0	0	0	0
Bacilo 02	2	2	2	0	0	0
Bacilo 03	2	2	1	0	0	0
Bacilo 27	2	2	1	0	0	0

ANEXO N°27

RESULTADOS DE PRUEBAS ENZIMÁTICAS

**Tabla N°31.** Halos de hidrólisis formados por cada cepa de *Bacillus subtilis* según sustrato

BACILO 01				
Prueba	d1	d2	promedio	Desviación Estándar
Amilasa	60	55	57.5	3.54
Proteasa	16	11	13.5	3.54
Gelatinasa	36	36	36	0.00
Lipasa	0	0	0	0.00
BACILO 02				
Prueba	d1	d2	promedio	Desviación Estándar
Amilasa	60	41	50.5	13.44
Proteasa	15	20	17.5	3.54
Gelatinasa	38	35	36.5	2.12
Lipasa	0	0	0	0
BACILO 03				
Prueba	d1	d2	promedio	Desviación Estándar
Amilasa	20	26	23	4.24
Proteasa	14	11	12.5	2.12
Gelatinasa	39	35	37	2.83
Lipasa	0	0	0	0
BACILO 27				
Prueba	d1	d2	promedio	Desviación Estándar
Amilasa	35	28	31.5	4.95
Proteasa	25	23	24	1.41
Gelatinasa	32	30	31	1.41
Lipasa	0	0	0	0

ANEXO N°28

RESULTADOS DE PRUEBA DE ADHESION A SOLVENTES ORGÁNICOS

**Tabla N°32.** Porcentajes de adherencia por solvente de las cepas de *Bacillus subtilis* estudiadas.

Bacilo	% Adherencia xileno	% Adherencia tolueno	% Adherencia cloroformo
01	0.71 (Baja)	74.80 (Alta)	61.72 (Alta)
02	-58.75 (Baja)	-62.08 (Baja)	63.48 (Alta)
03	18.88 (Baja)	-0.13 (Baja)	83.87 (Alta)
27	-100.27 (Baja)	-79.68 (Baja)	66.31 (Alta)

ANEXO N°29

RESULTADOS DE RECuento DE ESPORAS DE *Hemileia vastatrix* EN  
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

**Tabla N°33.** Resultados actividad antifúngica

BACILO	CONCENTRACIÓN SUSPENSIÓN DE <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/mL)	ESPORAS <i>Hemileia vastatrix</i>		
		GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTALES
01	10 <sup>10</sup>	14	184	198
		13	204	217
	10 <sup>8</sup>	33	142	175
		49	135	184
	10 <sup>6</sup>	48	217	265
		50	165	215
	10 <sup>4</sup>	114	99	213
		83	124	207
02	10 <sup>10</sup>	23	206	229
		22	177	199
	10 <sup>8</sup>	30	123	153
		50	193	243
	10 <sup>6</sup>	42	221	263
		48	203	251
	10 <sup>4</sup>	84	169	253
		60	90	150
03	10 <sup>10</sup>	44	72	116
		15	91	106
	10 <sup>8</sup>	32	81	113
		60	43	103
	10 <sup>6</sup>	46	93	139
		59	100	159
	10 <sup>4</sup>	54	36	90
		67	59	126

**Tabla N°33.** Continuación

BACILO	CONCENTRACIÓN SUSPENSIÓN DE <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/mL)	ESPORAS <i>Hemileia vastatrix</i>		
		GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTALES
27	10 <sup>10</sup>	35	52	87
		18	76	94
	10 <sup>8</sup>	18	65	83
		46	113	159
	10 <sup>6</sup>	42	104	146
		31	30	61
	10 <sup>4</sup>	52	60	112
		35	52	87

**Tabla N°34.** Recuento de esporas de los grupos control.

CONTROL	TRATAMIENTO	ESPORAS GERMINADAS	ESPORAS NO GERMINADAS	ESPORAS TOTALES
POSITIVO	Solución CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O 1%	26	84	110
		38	71	109
NEGATIVO	Sin tratamiento	159	93	252
		155	78	233

ANEXO N°30  
RESULTADOS DE ANALISIS ESTADISTICO

**Tabla N°35.** Análisis estadístico muestra 01.

Bacilo 01	Concentraciones				Sulfato de cobre
	10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	
Media	91,401	73,885	68,790	37,261	68,780
Varianza	0,203	51,929	0,811	194,937	68,531
Observaciones	2	2	2	2	2
Grados de libertad	2	2	2	2	No aplica
Estadístico t	3,859	0,658	0,002	-2,746	No aplica

**TABLA N°36.** Análisis estadístico muestra 02.

Bacilo 02	Concentraciones				Sulfato de cobre
	10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	
Media	85,669	74,522	71,338	54,140	68,780
Varianza	0,203	81,139	7,303	116,840	68,531
Observaciones	2	2	2	2	2
Grados de libertad	2	2	2	2	No aplica
Estadístico t	2,881	0,664	0,415	-1,521	No aplica

**TABLA N°37.** Análisis estadístico muestra 03.

Bacilo 03	<i>Bacillus</i> 03				Sulfato de cobre
	10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	
Media	81,210	70,701	66,561	61,465	68,780
Varianza	170,595	159,033	34,281	34,281	68,531
Observaciones	2	2	2	2	2
Grados de libertad	2	2	2	2	No aplica
Estadístico t	1,137	0,180	-0,310	-1,020	No aplica

**TABLA N°38.** Análisis estadístico muestra 27.

Bacilo 27	Concentraciones				Sulfato de cobre
	10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	
Media	83,121	79,618	76,752	72,293	68,780
Varianza	58,623	159,033	24,545	58,623	68,531
Observaciones	2	2	2	2	2
Grados de libertad	2	2	2	2	No aplica
Estadístico t	1,799	1,016	1,168	0,441	No aplica

ANEXO N°31

INFORMES DE RESULTADOS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



<b>Microorganismo: Bacilo 01</b>			
IDENTIFICACIÓN			
PARÁMETRO EVALUADO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Morfología macroscópica	Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoide o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias irregulares, planas, bordes irregulares, color crema, superficie mate, opacas, de consistencia quebradiza.	CONFORME
Morfología microscópica	Bacilos Gram positivos con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales o paracentrales que no deforman el soma bacteriano.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos. Esporas esféricas paracentrales que deforman al bacilo.	NO CONFORME
Identificación bioquímica	Catalasa	+	+
	Nitratos	+	+
	Motilidad	Variable	+
	VP	+	+
	Rojo de metilo	-	-
	Citrato	+	+
	TSI	V/A	K/A
	Hidrolisis glucosa	+	+
	Hidrolisis manitol	+	+
	Hidrolisis lactosa	-	-
	Indol	-	-
	Esculina	+	+
	Urea	Variable	+
			CONFORME



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



CARACTERIZACIÓN				
Cinética de crecimiento	Inicio de fase estacionaria menor o igual a 96 horas, manteniéndose al menos hasta las 196 horas.	Inicio de fase estacionaria a las 96 horas, se mantiene hasta las 196 horas.	CONFORME	
Tolerancia a pH	Crecimiento microbiano a todos los valores de pH en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	pH	%	CONFORME
		4	0	
		5	50%	
		6	100%	
		7	100%	
		8	100%	
		9	100%	
Tolerancia a temperatura	Crecimiento microbiano a todos los valores de temperatura en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	T (°C)	%	CONFORME
		37	100	
		50	100	
		55	0	
		60	0	
		65	0	
		70	0	
Amilasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	57.5 mm	CONFORME	
Proteasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	13.5 mm	CONFORME	
Gelatinasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	36 mm	CONFORME	
Lipasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	0 mm	NO CONFORME	
Adhesión a xileno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	0.71	BAJA	
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			
Adhesión a tolueno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	74.8	ALTA	
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



CONTINUACION CARACTERIZACIÓN			
Adhesión a cloroformo (capacidad donadora de e-)	Baja: 0 % - 29 %	61.72	ALTA
	Media: 30% - 50%		
	Alta: 51% - 100%		
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA			
ESPECIFICACIÓN	RESULTADO		CONCLUSIÓN
No existe diferencia significativa entre los tratamientos si:  T exp < t de tablas (2.92 al 95% de confianza)	10 <sup>10</sup>	3.859	Existe diferencia significativa entre ambos tratamientos
	10 <sup>8</sup>	0.658	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>6</sup>	0.002	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>4</sup>	2.746	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**-FIN DEL INFORME-**



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



<b>Microorganismo: Bacilo 02</b>			
IDENTIFICACIÓN			
PARÁMETRO EVALUADO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Morfología macroscópica	Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias irregulares, elevadas, borde ondulado, color blanco, superficie brillante, opacas, de consistencia untuosa.	CONFORME
Morfología microscópica	Bacilos Gram positivos con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales o paracentrales que no deforman el soma bacteriano.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos. Esporas elipsoidales centrales, que no deforman al bacilo.	NO CONFORME
Identificación bioquímica	Catalasa	+	+
	Nitratos	+	+
	Motilidad	Variable	+
	VP	+	+
	Rojo de metilo	-	-
	Citrato	+	+
	TSI	V/A	K/A
	Hidrolisis glucosa	+	+
	Hidrolisis manitol	+	+
	Hidrolisis lactosa	-	-
	Indol	-	-
	Esculina	+	+
	Urea	Variable	-
			CONFORME



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



CARACTERIZACIÓN				
Cinética de crecimiento	Inicio de fase estacionaria menor o igual a 96 horas, manteniéndose al menos hasta las 196 horas.	No se percibe fase estacionaria durante el tiempo en el que se realizó el estudio.		NO CONFORME
Tolerancia a pH	Crecimiento microbiano a todos los valores de pH en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	pH	%	CONFORME
		4	0	
		5	50	
		6	100	
		7	100	
		8	100	
		9	100	
Tolerancia a temperatura	Crecimiento microbiano a todos los valores de temperatura en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	T (°C)	%	CONFORME
		37	100	
		50	100	
		55	100	
		60	0	
		65	0	
		70	0	
Amilasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	50.5 mm		CONFORME
Proteasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	17.5 mm		CONFORME
Gelatinasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	19 mm		CONFORME
Lipasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	0 mm		NO CONFORME
Adhesión a xileno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	-58.75	BAJA	
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			
Adhesión a tolueno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	-62.08	ALTA	
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



CONTINUACION CARACTERIZACIÓN			
Adhesión a cloroformo (capacidad donadora de e-)	Baja: 0 % - 29 %	63.48	ALTA
	Media: 30% - 50%		
	Alta: 51% - 100%		
ACTIVIDAD ANTI FÚNGICA			
ESPECIFICACIÓN	RESULTADO		CONCLUSIÓN
No existe diferencia significativa entre los tratamientos si:  T exp < t de tablas (2.92 al 95% de confianza)	10 <sup>10</sup>	2,881	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>8</sup>	0,664	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>6</sup>	0,415	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>4</sup>	1,521	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**-FIN DEL INFORME-**



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



<b>Microorganismo: Bacilo 03</b>			
IDENTIFICACIÓN			
PARÁMETRO EVALUADO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Morfología macroscópica	Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.	Colonias irregulares, elevadas, borde ondulado, color blanco, superficie brillante, opacas, de consistencia untuosa.	CONFORME
Morfología microscópica	Bacilos Gram positivos con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales o paracentrales que no deforman el soma bacteriano.	Bacilos Gram positivos, bordes redondos. Esporas elipsoidales centrales, que no deforman al bacilo.	NO CONFORME
Identificación bioquímica	Catalasa	+	+
	Nitratos	+	+
	Motilidad	Variable	+
	VP	+	+
	Rojo de metilo	-	-
	Citrato	+	+
	TSI	V/A	A/A
	Hidrolisis glucosa	+	+
	Hidrolisis manitol	+	+
	Hidrolisis lactosa	-	-
	Indol	-	-
	Esculina	+	+
	Urea	Variable	-
			CONFORME



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



CARACTERIZACIÓN				
Cinética de crecimiento	Inicio de fase estacionaria menor o igual a 96 horas, manteniéndose al menos hasta las 196 horas.	Inicio de fase estacionaria a las 96 horas, se mantiene hasta las 196 horas.	CONFORME	
Tolerancia a pH	Crecimiento microbiano a todos los valores de pH en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	pH	%	CONFORME
		4	50	
		5	50	
		6	100	
		7	100	
		8	100	
		9	100	
Tolerancia a temperatura	Crecimiento microbiano a todos los valores de temperatura en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	T (°C)	%	CONFORME
		37	100	
		50	100	
		55	50	
		60	0	
		65	0	
Amilasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	23 mm		CONFORME
Proteasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	12.5 mm		CONFORME
Gelatinasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	37 mm		CONFORME
Lipasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	0 mm		NO CONFORME
Adhesión a xileno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	18.88		BAJA
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			
Adhesión a tolueno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	-0.13		BAJA
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			
Adhesión a cloroformo (capacidad donadora de e-)	Baja: 0 % - 29 %	83.37		ALTA
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



ACTIVIDAD ANTI FÚNGICA			
ESPECIFICACIÓN	RESULTADO		CONCLUSIÓN
No existe diferencia significativa entre los tratamientos si:  T exp < t de tablas (2.92 al 95% de confianza)	10 <sup>10</sup>	1,137	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>8</sup>	0,180	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>6</sup>	0,310	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>4</sup>	1,020	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**-FIN DEL INFORME-**



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



Microorganismo: Bacilo 27				
IDENTIFICACIÓN				
PARÁMETRO EVALUADO	ESPECIFICACIÓN		RESULTADO	CONCLUSIÓN
Morfología macroscópica	Colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café, de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.		Colonias irregulares, planas, borde liso, color beige, mate, opacas, de consistencia oleosa.	CONFORME
Morfología microscópica	Bacilos Gram positivos con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales o paracentrales que no deforman el soma bacteriano.		Bacilos Gram positivos, bordes redondos. Esporas esféricas que deforman al cuerpo bacteriano.	NO CONFORME
Identificación bioquímica	Catalasa	+	+	CONFORME
	Nitratos	+	+	
	Motilidad	Variable	+	
	VP	+	+	
	Rojo de metilo	-	-	
	Citrato	+	+	
	TSI	V/A	K/A	
	Hidrolisis glucosa	+	+	
	Hidrolisis manitol	+	+	
	Hidrolisis lactosa	-	-	
	Indol	-	-	
	Esculina	+	+	
	Urea	Variable	+	



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



CARACTERIZACIÓN				
Cinética de crecimiento	Inicio de fase estacionaria menor o igual a 96 horas, manteniéndose al menos hasta las 196 horas.	Inicio de fase estacionaria a las 96 horas, se mantiene hasta las 196 horas.	CONFORME	
Tolerancia a pH	Crecimiento microbiano a todos los valores de pH en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	pH	%	CONFORME
		4	0	
		5	0	
		6	100	
		7	100	
		8	100	
		9	100	
Tolerancia a temperatura	Crecimiento microbiano a todos los valores de temperatura en estudio. (Cada repetición positiva se tomará como 50%)	T (°C)	%	CONFORME
		37	100	
		50	100	
		55	50	
		60	0	
		65	0	
Amilasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	31.5 mm		CONFORME
Proteasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	24 mm		CONFORME
Gelatinasa	Halo de hidrolisis > a 10 mm	31 mm		CONFORME
Lipasa	Halo de hidrolisis > a 20 mm	0 mm		NO CONFORME
Adhesión a xileno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	-100.27		BAJA
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			
Adhesión a tolueno (hidrofobicidad)	Baja: 0 % - 29 %	-79.68		BAJA
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			
Adhesión a cloroformo (capacidad donadora de e-)	Baja: 0 % - 29 %	66.31		ALTA
	Media: 30% - 50%			
	Alta: 51% - 100%			



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA  
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS



ACTIVIDAD ANTI FÚNGICA			
ESPECIFICACIÓN	RESULTADO		CONCLUSIÓN
No existe diferencia significativa entre los tratamientos si:  T exp < t de tablas (2.92 al 95% de confianza)	10 <sup>10</sup>	1.799	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>8</sup>	1.016	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>6</sup>	1.168	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.
	10 <sup>4</sup>	0.441	No existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

**-FIN DEL INFORME-**

ANEXO N°32

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

### **AGAR MANITOL SALADO SUPLEMENTADO CON FLUCONAZOL**

Peptona de caseína	5 g/L
Peptona de carne	5 g/L
Extracto de carne	1 g/L
NaCl	75 g/L
D(-)-Manitol	10 g/L
Rojo de fenol	0.025 g/L
Agar-Agar	12 g/L
Fluconazol	0.5 g/L

### **AGUA PEPTONADA BUFFERADA SUPLEMENTADA CON FLUCONAZOL**

Peptona de caseína	5 g/L
NaCl	5 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	3.5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g/L
Fluconazol	0.5 g/L

### **GLICEROL 60% V/V**

Glicerol	60 mL
Agua desmineralizada	40 mL

### **AGAR LECHE DESCREMADA**

Agar Plate Count	28 g/L
Leche descremada	500 mL/L

Esterilizar Agar Plate Count y leche descremada en recipientes separados.  
Mezclar la leche descremada y el agar antes de verter el medio de cultivo.

### **AGAR ALMIDON**

Agar Plate Count	23 g/L
Almidón soluble	2 g/L

### **AGAR TRIPTONA DE SOYA**

Peptona de caseína	15g/L
Digerido papáico de soya	5g/L
NaCl	5g/L
Agar	1.5g/L

### **AGAR TWEEN 20**

Peptona de carne	10 g/L
NaCl	5 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1 g/L
Tween 20	10 mL/L
Agar	20 g/L

### **AGAR 1.5%**

Agar	15 g/L
Agua destilada	1 L

### **AGAR GELATINA**

Peptona de carne	10 g/L
NaCl	5 g/L

Gelatina	60 g/L
Agar	30g/L

### **SOLUCIÓN TAMPÓN PUM**

$K_2HPO_4$	9.7g/L
$KH_2PO_4$	7.26g/L
$H_2NCONH_2$	1.8g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g/L

### **AGUA BUFFERADA**

$KH_2PO_4$	35 g
Agua destilada	500 mL

#### **Preparación de solución stock**

Ajustar a pH 7.2 con una solución de NaOH 1N. Llevar a volumen de 1 L con agua destilada.

#### **Preparación del medio de dilución**

Tomar una alícuota de 1.25 mL de la solución anterior y llevar a volumen de 1. Dispensar el volumen deseado de la solución resultante en los frascos adecuados. Esterilizar durante 15 minutos a una temperatura de 121°C.

### **MEDIO DE FERMENTACIÓN**

Peptona de carne	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	0.5 g/L