



***AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS  
COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLÓGICO SOBRE LARVAS DE LA  
FAMILIA SCARABAEIDAE: ORDEN COLEÓPTERA***

**Melisa Yineth Beltrán Plaza**

**Diana Paola Cuevas Moreno**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C., 2019**



***AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS  
COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLÓGICO SOBRE LARVAS DE LA  
FAMILIA SCARABAEIDAE: ORDEN COLEÓPTERA***

**Melisa Yineth Beltrán Plaza**

**Diana Paola Cuevas Moreno**

**Martha Lucía Posada Buitrago., PhD**

**Docente del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTÁ D.C., 2019**

## DEDICATORIA

*A Dios, a nuestros padres y hermanas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al amor, comprensión y compañía de nuestros padres, por cada noche en vela que pasaron con nosotras, por cada café de madrugada que alentaba a seguir en el camino, para ellos son todos los esfuerzos y luchas puestas en estas páginas.

A José Camelo Pbro., por ser un papá, por sus noches en vela, por sus esfuerzos físicos en la ardua tarea de la recolección en campo, por todo su apoyo incondicional y por toda la sabiduría brindada en este camino.

Este trabajo de grado fue llevado a cabo gracias a Don Teodomiro González y familia; Andrea Lara y Familia por permitirnos entrar a sus hogares y obtener todos los ejemplares necesarios para el montaje y la realización de los bioensayos.

A la profesora Martha Lucía Posada Buitrago, por aceptar esta idea, por darnos la fortaleza que se requirió en cada obstáculo y enseñarnos que si se propone toda adversidad tiene solución.

Al grupo de investigación Ceparium por abrirnos las puertas a la investigación científica y por cada una de sus orientaciones en las etapas de este proyecto.

A todas las personas que de alguna manera u otra intervinieron para la realización de este trabajo de grado muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	12
<b>Introducción</b>	14
<b>1. OBJETIVOS</b>	16
1.1 Objetivo general	16
1.2 Objetivos específicos	16
<b>2. ANTECEDENTES</b>	17
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	24
<b>3.1 Agricultura en Colombia</b>	24
<b>3.2 Uso de plaguicidas</b>	24
3.2.1 Clasificación de los plaguicidas	25
3.2.2 Problemática de los plaguicidas	27
3.2.3 Efectos secundarios de los plaguicidas	27
<b>3.3 Complejo chisa (Coleóptera: Scarabaeidae)</b>	29
3.3.1 Clasificación taxonómica	29
3.3.2 Generalidades	29
3.3.3 Características morfológicas	29
3.3.4. Biología y ecología	30
3.3.5 Distribución geográfica	31
3.3.6 Importancia económica y daños	32
<b>3.4 Control Biológico</b>	33
3.4.1 Enemigos naturales	33
3.4.2 Entomopatógenos	34
<b>3.5 Enemigos naturales del complejo chisa (Scarabaeidae: Coleóptera)</b>	35
3.5.1 Hongos	35
3.5.2 Nemátodos	36
3.5.3 Rickettsias	36
3.5.4 Virus.	37
3.5.5 Bacterias	37
<b>3.6 Métodos moleculares de identificación</b>	40
3.6.1 PCR	40
3.6.2 Secuenciación por método Sanger	41

<b>4. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	42
<b>4.1 Tipo de estudio</b>	42
<b>4.2 Tipo de investigación</b>	42
<b>5. METODOLOGÍA</b>	44
<b>5.1 Fase pre-experimental</b>	44
5.1.1 Fase de campo	44
5.1.2 Monitoreo de larvas	46
5.1.3 Fase de aislamiento de patógenos bacterianos de larvas enfermas	46
5.1.4 Fase de identificación microbiológica	46
<b>5.2 Fase experimental: pruebas de patogenicidad</b>	47
5.2.1 Fase de campo	47
5.2.2 Monitoreo de larvas	49
5.2.3 Identificación de las larvas	49
5.2.4 Desinfección del sustrato (suelo)	50
5.2.5 Activación de cepas de <i>Bacillus sp.</i> cepario UCMC	50
<b>5.3 Fase de montaje de bioensayos</b>	51
5.3.1 Preparación de tratamientos	51
5.3.2 Inoculación de larvas	51
<b>5.4 Identificación molecular</b>	54
<b>5.5 Análisis estadístico</b>	55
<b>6. RESULTADOS</b>	56
<b>6.1 Fase pre-experimental</b>	56
6.1.1 Monitoreo de larvas	56
6.1.2 Fase de aislamiento de patógenos bacterianos de larvas enfermas	57
6.1.3 Fase de identificación microbiológica	62
6.2.1 Fase experimental: pruebas de patogenicidad	63
6.1.5 Activación de cepas de <i>Bacillus sp.</i> cepario UCMC	68
<b>6.2 Análisis pruebas de patogenicidad</b>	71
<b>7. DISCUSIÓN</b>	78
<b>8. CONCLUSIONES</b>	86
<b>RECOMENDACIONES</b>	93
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	96

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Larva típica de Scarabaeidae. Tomada por las autoras.	30
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Phyllophaga cuyabana</i>	31
Figura 3. Mapa político del municipio de Pasca, Cundinamarca	44
Figura 4. Recolección de larvas en campo.	45
Figura 5. Larvas en cultivo de frijol	45
Figura 6. Colocación de larvas en hilera para su transporte	45
Figura 7. Recolección de larvas en finca La Comadreja.	47
Figura 8. Medición de la temperatura del suelo con termómetro	47
Figura 9. Medición de humedad y temperatura en campo con termohigrometro	48
Figura 10. Cultivo de frijol, finca San Antonio vereda El Retiro	48
Figura 11. Cultivo de papa, finca San Antonio vereda El Retiro	48
Figura 12. Larvas listas para guardar y transportar.	49
Figura 13. Identificación de larvas en el laboratorio 1 de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca mediante estereoscopio.	49
Figura 14. Procedimiento utilizado en el montaje de las pruebas de patogenicidad.	52
Figura 15. Kit de extracción de ADN genómico Wizard utilizado para la obtención de ADN de los aislados bacterianos de larvas enfermas.	54
Figura 16. Larvas enfermas con signos de infección bacteriana	56
Figura 17. Cultivo de las cepas aisladas de larvas enfermas en agar nutritivo y sangre con su respectiva tinción de Gram	59
Figura 18. Cultivo en agar MacConkey: características macroscópicas en agar MacConkey.	61
Figura 19. Muerte de larvas en observación	64
Figura 20. Porcentajes de decesos por cada uno de los diferentes hongos.	65
Figura 21. Distribución de larvas por tribu.	66
Figura 22. Cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> sp en agar BHI con su respectiva tinción de Gram	70
Figura 23. Cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> sp en agar sangre	71
Figura 24. Porcentaje de mortalidad por tratamiento: mortalidad asociada a los 13 inóculos aislados.	71
Figura 25. Mortalidad de larvas por especie	72
Figura 26. Mortalidad causada por los aislamientos bacterianos sobre larvas de la familia Scarabaeidae durante un período de 56 días en condiciones de laboratorio.	73

<i>Figura 27. Porcentaje de mortalidad por tratamiento: mortalidad asociada a los 11 inóculos pertenecientes al género Bacillus spp</i>	74
Figura 28. Corrido electroforético en gel de agarosa de los productos de PCR, correspondientes a los aislados bacterianos de larvas enfermas y/o muertas por infección bacteriana.	76
Figura 29. Secuencia visualizada en Chromas	76

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad,	25
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad.	26
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química	26
Tabla 4. Nomenclatura cepas <i>Bacillus</i> spp	52
Tabla 5. Tratamientos evaluados en el primer ensayo de las pruebas de patogenicidad con larvas sanas en Julio de 2018	55
Tabla 6. Tratamientos evaluados en el segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad con larvas sanas en Julio de 2018	55
Tabla 7. Valores de máster mix utilizados en PCR convencional.	57
Tabla 8. Características de los aislados bacterianos utilizados en los ensayos de patogenicidad.	61
Tabla 9. Pruebas bioquímicas en tubo, kit Gram negativos	62
Tabla 10. Pruebas bioquímicas en tubo, kit Gram positivos	63
Tabla 11. Ejemplares de larvas III instar recolectadas del municipio de Pasca, Cundinamarca, identificadas taxonómicamente.	66
Tabla 12. Larvas de Melolonthidae encontradas en cultivo de Pasto, Papa y frijol en Pasca Cundinamarca.	67
Tabla 13. Porcentaje de mortalidad y número de muertes por tratamiento.	73
Tabla 14. Porcentaje de mortalidad y número de muerte por tratamiento BHF's	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo kit de extracción de ADN Wizard Genomic	98
ANEXO 2. Ráster de las larvas identificadas de la familia Scarabeidae	100
ANEXO 3. Identificación del hongo <i>Metarhizium</i> spp	101
ANEXO 4. Secuencias obtenidas por método sanger	103
ANEXO 5. Análisis ANOVA y prueba Tukey de los bioensayos	109
ANEXO 6. Revisión de mortalidad por semana	119
ANEXO 7. Adultos obtenidos de los bioensayos	120



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**Aislamiento y selección de bacterias entomopatógenas como alternativa  
de control biológico sobre larvas de la familia Scarabaeidae: orden**

**Coleóptera**

**Resumen**

La agricultura es la principal actividad económica en Colombia. Debido a los aspectos geográficos y otras características en el país, existen variedades de clima y microclimas que favorecen la vida de organismos plagas que pudiesen afectar el desempeño y actividad de la producción agrícola, entre ellos, los insectos de la familia Scarabaeidae: Pleurosticti, caracterizados por su voracidad y su amplia distribución. Como alternativa al uso descontrolado de plaguicidas y productos tóxicos se buscan estrategias amigables con el ambiente como el control biológico. El objetivo principal de este trabajo fue seleccionar bacterias entomopatógenas como alternativa para el control de larvas de la familia Scarabaeidae del orden Coleóptera, conocidas en Colombia con el nombre de chisas, mojojays, y/o gallina ciega, considerados como el grupo de seres vivos más diversificados en el ambiente terrestre o aéreo. La metodología se desarrolló en seis fases: recolección, monitoreo de larvas y aislamiento de posibles bacterias entomopatógenas, el montaje de

bioensayos y posterior cálculo de porcentaje de mortalidad e identificación molecular de los aislados bacterianos. Se seleccionaron 13 bacterias y se evaluaron realizando pruebas de patogenicidad con larvas de la familia Scarabaeidae, recolectadas de dos propiedades: San Antonio y La Comadreja ubicadas en el municipio de Pasca, Cundinamarca. Los tratamientos que mejor funcionaron fueron C19 y C34 identificados como *Serratia proteamaculans* con 75% y 69,1% respectivamente, seguido de C24 con 66,6%, y C27 que corresponde a *Xenorhabdus* sp., causando una mortalidad de 63,8% Los resultados se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey.

**Palabras clave:** Scarabaeidae, control biológico, entomopatógenos.

## Introducción

En Colombia, cerca del 50% de la población está asentada en las zonas rurales y, por tanto, sus posibilidades de mejoramiento de calidad de vida derivan del sector agropecuario, el cual se constituye como la principal fuente de empleo en las zonas rurales. En 2013, el 62,6% (2,9 millones) de la población empleada correspondió al sector agropecuario<sup>1</sup>, por lo que actualmente, este sector sigue siendo una de las principales fuentes de ingresos y sostenibilidad de la población colombiana. Sin embargo, la agricultura se ve enfrentada a diferentes dificultades entre las que se destacan los daños ocasionados por plagas y enfermedades que disminuyen la producción, generando pérdidas al cultivador.

El orden Coleóptera es una de las principales plagas de importancia económica de cultivos alimenticios. Estos insectos tienen hábitos masticadores, son polípagos, es decir, no son selectivos con su alimento, atacando una gran variedad de cultivos entre los que se destacan el maíz, sorgo, legumbres, pastos, frutales, café, plátano, papa, yuca y algunas hortalizas. Las larvas al ser de hábitos subterráneos, son las que ocasionan mayores daños a los cultivos en el sistema radicular, tallos o tubérculos en el caso de la papa, siendo más severo cuando se alimentan de plántulas; en estos casos, matan la planta al producir heridas en las raíces, provocando mermas importantes en el cultivo. Cuando las plantas están más desarrolladas, las larvas producen heridas en las raíces al alimentarse de éstas, facilitando el ingreso de bacterias u hongos que pueden finalmente pudrir la planta<sup>2</sup>; además, cuando las larvas consumen la raíz, la planta pierde la capacidad de absorción de agua y nutrientes generando estrés hídrico, marchitamiento y clorosis en las hojas.

Los sistemas fitosanitarios y de vigilancia agrícola no reportan estos coleópteros como plaga importante en la actualidad, aun así, los cultivadores informan que ésta sigue siendo una plaga de importancia económica, ya que ocasiona pérdidas parciales y totales en casos más severos. Las medidas de

control que se tienen son el uso de plaguicidas químicos que siguen siendo una problemática ambiental y sanitaria por la toxicidad que poseen éstos. Es allí donde juega un papel importante el control biológico mediante el empleo de enemigos naturales de estos insectos, entre los que se destacan bacterias como *Serratia* spp, *Pseudomonas* spp, *Enterobacter* spp, *Acinetobacter* spp, las cuales causan infección e inhibición en la alimentación (AFE) en larvas de la familia Scarabaeidae del orden coleóptera<sup>3</sup>; géneros como *Bacillus* spp, poseen toxinas que ocasionan desbalance osmótico, lisis celular y la muerte de la larva, y *Paenibacillus* spp, causante de la enfermedad lechosa<sup>(4)</sup>. Por lo que se hace necesario seguir buscando alternativas de control biológico para el control de esta plaga. Por lo anterior, este proyecto tuvo como objetivo de encontrar posibles biocontroladores, mediante el aislamiento de bacterias de larvas de la familia Scarabaeidae que presenten signos de enfermedad bacteriana y se puedan utilizar como una alternativa de control de estos fitófagos.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo general**

Seleccionar bacterias entomopatógenas como alternativa para el control de larvas de la familia Scarabaeidae del orden Coleóptera.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Identificar las bacterias entomopatógenas aisladas de larvas del complejo chisa (Coleóptera: Scarabaeidae) que presentan enfermedad, mediante técnicas de microbiología convencional y moleculares.
- Determinar la actividad insecticida de los aislados bacterianos seleccionados, mediante bioensayos con larvas de la familia Scarabaeidae.
- Evaluar la acción entomopatógena de las cepas del género *Bacillus* sp con actividad quitinolítica, suministradas por el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mediante pruebas de patogenicidad con larvas de la familia Scarabaeidae.

## 2. ANTECEDENTES

Desde hace muchos años, el estudio de bacterias entomopatógenas ha llevado al perfeccionamiento de técnicas y procesos para el desarrollo de biocontroladores eficaces en el manejo de plagas, teniendo como base organismos enemigos naturales. Se conoce que el mecanismo de patogenicidad de estas bacterias en algunos insectos inicia con la ingestión de la célula bacteriana o de las esporas, produciendo toxinas y otros factores patógenos que interrumpen el epitelio del intestino medio, permitiendo el acceso al hemocele rico en nutrientes, donde proliferan para provocar septicemia y muerte del huésped<sup>5</sup>. Actualmente, el mercado de biocontroladores es liderado por el género *Bacillus sp*, destacando la especie *Bacillus thuringiensis*, productor de toxinas Cry y toxinas Vip. Se ha reportado que las especies *Paenibacillus popilliae* y *Paenibacillus lentimorbus* poseen gran actividad entomopatógena al ser causantes de la enfermedad lechosa en varias especies de larvas del orden Scarabaeidae.

*Bacillus thuringiensis* es el biocontrolador más usado en el mundo por acción de su proteína Cry, una protoxina soluble, el primer reporte de la clonación de toxinas Cry fue en el año 1981 con el gen *cry1A*; desde entonces numerosos estudios se han realizado en torno a estos genes y las variedades asociadas. En 1989 Höfte y Whiteley clasificaron las proteínas por su variedad genética, los 40 genes fueron agrupados en 4 grupos por su similitud genética y especificidad por orden de insecto, Tipo I de 130 kDa activo contra especies de lepidópteros; tipo II de 70 kDa también activo contra lepidópteros y dípteros; tipo III activo contra coleópteros y con un tamaño de 70 kDa y tipo IV que contiene genes de 70 kDa y 130 kDa aislados de la variedad *israelensis* de *B. thuringiensis* altamente activa contra mosquitos y larvas de mosca negra<sup>6</sup>.

En el año 1994 Suzuki, Hori, Tachibana y Asano evaluaron la toxina de *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* (cepa Buibui) específica para larvas de escarabajos, en macetas que contenía larvas de *Anomala cuprea*, demostrando mayor eficacia contra larvas de primer y segundo instar, llevaron el ensayo a parcelas de batatas donde las parcelas tratadas con la toxina

Buibui obtuvieron 31% de daño frente a la parcela control con 69% en una dosis de 100 mg de toxina por miligramos<sup>7</sup>. Más tarde, en Japón, en el año 2003, Asano y colaboradores, aislaron de una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* (SDS-502) genes típicos productores de toxinas cry, cuya homología era sustancialmente igual a la proteína cry 8, esta proteína fue clonada y producida masivamente en *Escherichia coli*, demostrando actividad entomopatógena altamente toxica frente al coleóptero *Anomala cuprea*<sup>8</sup>.

En 1999 Koppenhöfer y colaboradores usaron diferentes entomopatógenos como *Bacillus thuringiensis* subespecie *japonensis*; *Paenibacillus popilliae*, *Steinermia kushidai* y *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de tercer instar de *Cyclocephala hirta* y *Popillia japónica* junto con un organofosforado Diazinón, demostrando que las combinaciones entre los nematodos *S. kushidai* y *H. bacteriophora* y el organofosforado obtuvieron una gran mortalidad entre 14-18 días, con la ventaja de que los nematodos se encuentran presentes en el suelo durante un periodo más largo<sup>9</sup>.

Sezen y colaboradores en el 2005, estudiaron los enemigos naturales de diferentes escarabajos, entre ellos, *Amphimallon solstitiale* y *Melolontha melolontha*, se diferenciaron siete cepas entre los aislamientos bacterianos identificados como *Pseudomonas sp*, *Bacillus cereus*; *Micrococcus luteus* y *Bacillus thuringiensis*; encontrando en los bioensayos una mortalidad para larvas de la especie *A. solstitiale* del 90% con *B. cereus* aislado de *M. melolontha*, y una mortalidad del 100% con *B. cereus* y *B. sphaericus* en combinación; en los bioensayos de proteínas cristalinas, el mayor efecto insecticida fue del 65% con cristales de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* aislados de *M. melolontha* en siete días, demostrando que las infecciones mixtas podrían utilizarse como agentes de control microbiano, ya que tienen un efecto 100% insecticida sobre las larvas de *A. solstitiale*<sup>10</sup>. También realizaron un estudio titulado Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) en el 2007, en el cual aislaron e identificaron siete cepas bacterianas de *M. melolontha* y evaluaron su actividad patogénica durante tres

temporadas de avellana de 2002 a 2004 en larvas de *M. melolonta*, identificadas como *Pseudomonas* sp., *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *B. sphaericus*, *Acinetobacter* sp., y *B. weihenstephanensis*. La actividad insecticida de los aislamientos a una dosis de  $1,8 \times 10^9$  bacterias/ml, dentro de los 10 días en las larvas de *M. melolontha* fueron de 40% para *Pseudomonas* sp., 80% para *Bacillus thuringiensis*, 50% para *Pseudomonas* sp., 20% para *Enterobacter* sp., 60% para *B. sphaericus*, y 80% para *B. weihenstephanensis*. Se purificaron cristales de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* y se probó la actividad insecticida de las proteínas cristalinas en las larvas de *M. melolonta*, el mayor efecto insecticida detectado fue del 70% con cristales de *B. thuringiensis*; concluyendo que los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis* y el cristal de *B. thuringiensis* pueden ser valiosos como agentes de control biológico<sup>11</sup>.

Un estudio realizado en Quebec, Canadá durante el año 1990 por Poprawski y Yule revela los patógenos naturales de *Phyllophaga* spp, bacterias como *Bacillus cereus*, *Bacillus popilliae* Dutky, *Micrococcus nigrofasciens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*, para evaluar la patogenicidad de los aislamientos cada patógeno fue suministrado vía oral o inyectable, los 5 aislamientos fueron patógenos por inyección, pero solo las bacterias que producían esporas fueron patógenas vía oral, además se evaluó un producto comercial de *Bacillus popilliae*, que demostró no tener capacidad infectiva acabando solo con el 7% de los ensayos por lo tanto *Bacillus popilliae* no se consideró como un patógeno prometedor para *Phyllophaga* spp<sup>12</sup>.

En el año 2010 Selvakumar y colaboradores describieron un nuevo patógeno asociado, *Brevibacterium frigoritolerans* en larvas de primer estadio de *Anomala dimidiata* y *Holotrichia longipennis*. El aislado infectó y causó mortalidad de 89 y 74%, en larvas de primer estadio de *A. dimidiata* y *H. longipennis*, respectivamente. Las larvas infectadas exhibieron bacteriemia como síntomas y la mortalidad se produjo entre la segunda y la quinta semana después de la inoculación<sup>13</sup>.

De los patógenos bacterianos Gram negativos reportados se encuentra el estudio de O'Callaghan y Jackson 1993; en el cual se aísla del suelo directo la bacteria *Serratia entomophila* que es patógeno bacteriano de la especie *Costelytra zealandica*, causante de la enfermedad ámbar de la larva del escarabajo conocido como White grub<sup>14</sup>; los síntomas de la enfermedad larval incluyen el cese a la alimentación, aclaramiento del intestino, coloración ámbar y finalmente culmina en la muerte. En el año 2004, Hurst y colaboradores a partir de *Serratia entomophila* y *Serratia proteamaculans* construyen un clon de 47 kb de los genes *sepA*, *sepB* y *sepC* (un plásmido 155 kb *pADAP*), que clonado en *E. coli* o *Serratia* sp ejerce una fuerte actividad antialimentaria y conduce rápidamente a la muerte<sup>15</sup>. Por otro lado, Valdez et al, en el 2007, aislaron una cepa de *Serratia* sp. (cepa Mor4.1) de una larva de *Phyllophaga blanchardi* del tercer instar muerta recogida de un campo de maíz en Tres Marías, Morelos, México. Los bioensayos orales con larvas sanas de *P. blanchardi* alimentadas con el aislado Mor4.1 mostraron que esta cepa podía causar un efecto antialimentario y una pérdida significativa de peso. La mortalidad se observó para *P. blanchardi*, *P. trichodes* y *P. obsoleta* en un experimento multidosis. El aislado Mor4.1 también causó un 100% de mortalidad 24 horas después de la inoculación intracelular de las larvas de *P. blanchardi*, *P. ravidia*, *Anomala donovani* y el insecto lepidóptero *Manduca sexta*. Se realizaron bioensayos orales y por inyección con caldos de cultivo concentrados del aislado Mor4.1 para buscar los síntomas de la enfermedad y la mortalidad causada por las proteínas extracelulares. Los caldos Mor4.1 tratados con proteinasa K perdieron la capacidad de causar síntomas y mortalidad de la enfermedad, tanto en el bioensayo oral como en el de inyección, lo que sugiere la implicación de proteínas tóxicas en la enfermedad. El aislado Mor4.1 se identificó presuntamente como *Serratia entomophila* Mor4.1<sup>16</sup>.

Un estudio realizado por Selvakumar et al, (2007) describe el aislamiento, establecimiento de la patogénesis, caracterización bioquímica y análisis filogenético de una cepa entomopatógena de *Bacillus cereus* WGPSB-2 (MTCC 7182), aislada de una pupa atrofiada de *Anomala dimidiata*, recolectada en el

Himalaya del noroeste de India. Mediante la secuenciación y la posterior comparación del ADNr 16S se evidenció que la cepa tiene un 100% de similitud con secuencias de *Bacillus cereus*. Se realizó el análisis filogenético de la secuencia de ADNr 16S, la cual reveló que el aislado está estrechamente relacionado con *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*. Los bioensayos *in vitro* mostraron que el aislado fue capaz de infectar y causar una mortalidad de 92 y 67% en las larvas de segundo estadio de *Anomala dimidiata* y *Holotrichia seticollis*, respectivamente. Las larvas infectadas exhibieron síntomas parecidos a una septicemia bacteriana, la mortalidad se produjo entre la tercera y novena semana después de la inoculación<sup>17</sup>.

Consolo et al, 2010 sugieren como posibles agentes de control biológico a *Bacillus thuringiensis* y *Atrthrobacter* sp. obtenidos de la hemolinfa de larvas de *Cyclocephala signaticollis*, la actividad insecticida de estas bacterias fue probada mediante bioensayos *in vitro* en larvas de *C. signaticollis*, causando una mortalidad del 90-100%, 4 días después de la inyección en el hemocele<sup>18</sup>.

Estudios de Dingman en el año 2008 sobre la distribución de la enfermedad lechosa en estados unidos mostraron la distribución de los patógenos *Paenibacillus popilliae* y *Paenibacillus lentimorbus*, donde los grupos filogenéticos de *P. popilliae* 1 y 2 fueron aislados del oeste y este de las montañas Apalaches respectivamente siendo este el patógeno en 12 casos de enfermedad lechosa, mientras que *P. lentimorbus* grupos 1, 2 se encuentran distribuido al oeste y sur de las montañas Apalaches y el grupo 3 en el este, participando en solo 3 casos de la enfermedad <sup>19</sup>.

En el año 2000 Harrison, Patel y Yousten realizaron un estudio en Suramérica y Centroamérica sobre *Paenibacillus* sp asociados a enfermedad lechosa, en el que 32 aislamientos de bacterias fueron identificados como *Paenibacillus popilliae* y *Paenibacillus lentimorbus*, mediante técnicas de análisis de ADN, encontraron que las dos especies producían cuerpos paraesporales, usando técnicas de screening y PCR, las diferencias entre los genes productores de dicho cuerpos paraesporales fueron evidenciadas. En contraste con *P. popilliae* de América del Norte, ninguno de los aislados de

América Central y del Sur era resistente a la vancomicina, una indicación de una distribución geográfica interesante de los genes de resistencia<sup>20</sup>.

En el caso de *Paenibacillus popilliae* el cultivo y la obtención de esporas sigue constituyendo un desafío debido a que los productos comerciales existentes constituyen un artículo de obtención rigurosa y extensiva que no permite posicionar al entomopatógeno como uno de los productos más efectivos para el control de plagas, tal es el caso de Stahly y Klein en el año 1992 quienes estudiaron las especies comercializadas encontrando que estas contenían una bacteria identificada como *Paenibacillus polymyxa* (antes *Bacillus polymyxa*), examinando las cepas tipo American Type Culture Collection (ATCC) identificando nuevamente *P. polymyxa* y *Bacillus amylolyticus*<sup>21</sup>. Haynes y Rhodes en 1966 describieron un método donde la esporulación de *P. popilliae* es posible en medios líquidos (usualmente medio líquido J) en agitación que contenga triptona, glucosa y extracto de levadura, además de la adición de carbón activado 1 g, se esterilizó aparte del medio en autoclave a 121°C durante 45 min. El carbón estéril se añade al medio en el momento de la inoculación, demostrando que las esporas obtenidas han sobrevivido y almacenadas óptimamente durante varios meses, el medio además aporta nutrientes para aumentar la longevidad de las células vegetales<sup>22</sup>.

La relación de *Paenibacillus popilliae* y larvas del escarabajo *Popillia japonica*, fueron estudiados en el sur de Michigan, Estados Unidos por Cappaert y Smitley en el año 2002, recolectando larvas en las estaciones primavera y otoño demostrando que el 1% de las larvas eran afectadas por *P. popilliae*<sup>23</sup>. En un estudio similar desarrollado por Petty, Johnson y Steinkraus en el año 2012 en el noroeste de Arkansas, Estados Unidos encontraron que las larvas no eran afectadas por enfermedad lechosa<sup>24</sup>. La susceptibilidad de especies de la familia *Scarabeidae* a *Paenibacillus popilliae* (Antes *Bacillus popilliae*) se muestra en el estudio realizado por Díaz en 1992, enfrentado dos especies de coleópteros *Phyllophaga menestresi* y *Phyllophaga obsoleta* con una especie comercial de *P. popilliae* evaluando la susceptibilidad de este

frente al producto en condiciones de laboratorio y cultivo, demostrando así que

las dos especies fueron capaces de infectarse con la enfermedad lechosa en porcentaje bajos; mediante la inyección intrahemocélica de esporas en condiciones de laboratorio, las larvas evaluadas en campo fueron capaces de infectarse con el suelo inoculado en un porcentaje menor, concluyendo que las especies *P. menestresi* y *P. obsoleta* no son susceptibles a la cepa comercial de *P. popilliae*<sup>25</sup>.

Estos coleópteros en Colombia poseen una amplia distribución en las zonas productoras de Nariño, Cundinamarca y Boyacá, en años anteriores han reportado pérdidas en cultivos de papa hasta de 70- 100%<sup>26</sup>. En el manejo integrado de plagas relaciona a *P. lentimorbus* al complejo chisa en Colombia como un enemigo natural en larvas de las especies *Phyllophaga*, *Anomala*, *Cyclocephala*, *Plectris*, *Isonychus*, *Macroductylus* y *Ancognatha*<sup>27</sup>. Constituyendo como una herramienta preventiva para el manejo del cultivo y el terreno usado.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Agricultura en Colombia**

El manejo de las tierras con fines productivos es una actividad humana que se desarrolla desde hace alrededor de 5000 años con los primeros asentamientos de grupos humanos, propiciando el crecimiento poblacional y económico. La historia de agricultura en Colombia se ha visto ocupada por cultivos de índole ilícita, los cuales han favorecido un crecimiento económico oscilatorio y un agresivo manejo de pesticidas debido a estos cultivos<sup>28</sup>.

Actualmente el país busca aumentar la oferta y demanda de productos obtenidos de actividades de agricultura, usando estrategias de expansión de la cantidad de área productiva sembrada durante los años 2015 a 2018, creando un ambiente favorable para impulsar las inversiones que se requieren en las nuevas áreas, paquetes tecnológicos, soluciones de agua, infraestructura, maquinaria, investigación y transferencia tecnológica<sup>29</sup>.

Según el censo actual, Colombia cuenta con un total de 111.452.998 ha de suelo, en las que 43.024.740 ha son de uso agropecuario<sup>30</sup>, las cuales están pobremente distribuidas para la producción agraria, en donde las fincas de más de 500 ha (0,4%) concentran el 67,7% de la tierra productiva; dejando así a las explotaciones de menor tamaño (84% del total de explotaciones) con menos del 4% de la tierra productiva, ejerciendo un evidente beneficio para la empresa y exclusión para los pequeños productores, pero además de la exclusión social, las actividades agroindustriales de monocultivos generan desequilibrios en el ecosistema por desecamiento de humedales, desviación en la migración de aves y el uso de grandes cantidades de agroquímicos para la eficiencia del suelo<sup>31</sup>.

#### **3.2 Uso de plaguicidas**

El término "plaguicida" es una palabra compuesta que comprende todos los productos químicos utilizados para destruir las plagas o controlarlas. En la agricultura, se utilizan herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematicidas y

rodenticidas, es una de las pocas actividades donde se descargan deliberadamente en el medio ambiente productos químicos para acabar con algunas formas de vida. Constituye la primera herramienta para el control de plagas y enfermedades con el fin de aumentar la calidad y producción en cultivos especialmente monocultivos. Por desgracia, los beneficios aportados por la química han ido acompañados de una serie de perjuicios, algunos de ellos tan graves que ahora representan una amenaza para la supervivencia a largo plazo de importantes ecosistemas, como consecuencia de la perturbación de las relaciones depredador-presa y la pérdida de biodiversidad. Además, los plaguicidas pueden tener importantes consecuencias en la salud humana<sup>32</sup>.

### 3.2.1 Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso. En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (tabla 1). La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL50)\* o de la concentración letal media (CL50). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc<sup>33</sup>.

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL50 (mg/kg)<sup>33</sup>.

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión, Lorsban

Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes 1, 4, 6 (tabla 2). De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos (tabla 3)<sup>33</sup>.

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad<sup>33</sup>.

Persistencia <sup>a</sup>	Vida media <sup>b</sup>	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

<sup>a</sup>. Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó<sup>33</sup>.

<sup>b</sup>. Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto mezcla aplicado<sup>33</sup>.

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química<sup>33</sup>

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín.
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaryl, methonyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permethrin
Derivados bipyridilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de

	magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

### 3.2.2 Problemática de los plaguicidas

Algunos plaguicidas a lo largo del tiempo, se han catalogado como tóxicos debido a sus efectos secundarios negativos en el ambiente y los seres vivos, para catalogar un plaguicida como tóxico y/o peligroso se debe identificar la capacidad de este para producir efectos adversos en los organismos, también ha de considerarse la exposición que los organismos tienen al químico, teniendo en cuenta la concentración de este y la vida media del químico. Los plaguicidas químicos de uso agrícola pueden estar constituidos por uno o varios componentes con distintos grados de peligrosidad que les confieren la capacidad de ejercer efectos tóxicos, sin perjuicio de su clasificación toxicológica ni la dosificación aplicada<sup>34</sup>.

La aplicación de plaguicidas sigue siendo el método de control de plagas más ampliamente utilizado. Sin embargo, los plaguicidas son un arma de doble filo, pues si bien controlan a las plagas contra las que van dirigidos, pueden ocasionar también graves problemas en el agroecosistema en el que se emplearon. Todos aquellos efectos que los tratamientos fitosanitarios provocan de forma no intencional a corto o largo plazo, ya sean perjudiciales o no, constituyen lo que se denomina efectos secundarios de los plaguicidas<sup>35</sup>.

### 3.2.3 Efectos secundarios de los plaguicidas

#### 3.2.3.1 Eliminación de los enemigos naturales

Este es uno de los efectos más graves; al quedar los cultivos desprotegidos de estos inestimables aliados en el control natural de plagas, los fitófagos que lleguen de nuevo al cultivo, o que no hayan sido totalmente eliminados del mismo, van a poder aumentar sus poblaciones a una velocidad mucho mayor

de lo que lo habían estado haciendo hasta que se produjo la intervención, de manera que tras la aplicación fitosanitaria, se puede llegar a tener incluso mayores problemas que antes de ella, con lo que el aplicar un producto que no haya sido cuidadosamente elegido en función de sus efectos sobre la fauna útil, puede ocasionar efectos contrarios a los deseados<sup>35</sup>.

#### 3.2.3.2 La aparición de resistencia a los plaguicidas.

Este efecto es muy perjudicial cuando se presenta en organismos plaga, ya que implica el tener que cambiar de producto, con lo que el perjuicio es grave tanto para el fabricante del plaguicida (que verá notablemente acortada la vida útil de su producto), como para el agricultor (que verá disminuir notablemente la eficacia de sus tratamientos). Este fenómeno es, por el contrario, muy beneficioso cuando lo desarrollan los enemigos naturales, ya que ello permitirá el uso conjunto de esos enemigos naturales y del plaguicida en cuestión<sup>35</sup>.

#### 3.2.3.3 Destrucción de otros artrópodos beneficiosos

Entre los artrópodos beneficiosos se encuentran los polinizadores, donde se destaca la abeja, y de los que depende la producción de muchos cultivos (prácticamente, dentro de los cultivos más importantes a nivel mundial, sólo los cereales no requieren este tipo de polinización)<sup>35</sup>.

#### 3.2.3.4 Resurgencia de plagas

Las plagas que estaban siendo controladas de forma eficaz, vuelven a cobrar importancia, a causa sobre todo de haber eliminado a sus enemigos naturales, y de fenómenos de resistencia<sup>35</sup>.

#### 3.2.3.5 Acumulación de residuos de plaguicidas

Los residuos plaguicidas se acumulan en los vegetales, suelo, agua, etc., con los riesgos que lo supone para la salud humana, el ganado y para el medio ambiente<sup>35</sup>.

### 3.3 Complejo chisa (Coleóptera: Scarabaeidae)

#### 3.3.1 Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Hexapoda

Clase: Insecta

Orden: Coleóptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Scarabaeoidea

Familia: Scarabaeidae

Subfamilias: Aphodiinae, Scarabaeinae, Pachypodinae, Orphninae, Allidiostomatinae, Dynamopodinae, Aclopiniae, Euchirinae, Phaenomeridinae, Melolonthinae, Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae<sup>36</sup>

#### 3.3.2 Generalidades

En Colombia se conocen con el nombre de chisas, mojojays, y/o gallina ciega; las larvas de los insectos pertenecientes al orden Coleóptera, considerados como el grupo de seres vivos más diversificados en el ambiente terrestre o aéreo. Mundialmente se ha reconocido que Colombia está catalogada entre los doce países con mayor diversidad biológica. Los adultos son escarabajos o cucarrones que varían en tamaño, forma, color y hábitos según la especie. Una variedad de larvas de escarabajos de la familia Scarabaeidae "Pleurosticti" (Melolonthidae) son consideradas plagas agrícolas, constituyendo complejos entomológicos integrados por varias especies y géneros, con amplio espectro de hospederos, morfológicamente muy similares una especie de la otra. Al estar protegidas bajo el suelo, afectan diferentes cultivos como la papa, yuca, cebolla, pastos, y otros<sup>3</sup>.

#### 3.3.3 Características morfológicas

La larva es de tipo escarabeiforme, con su característica forma de “C” y pasa por tres estados, su cuerpo es de color blanco cremoso, robusto y blando; con la cabeza esclerosada, cuyo color varía de amarillo a café marrón, dependiendo la especie, tiene tres pares de patas torácicas color café y no posee pseudopatas. Presenta una zona translúcida en la parte superior del cuerpo que permite ver el contenido interno de color oscuro (intestino)<sup>37,38</sup>.

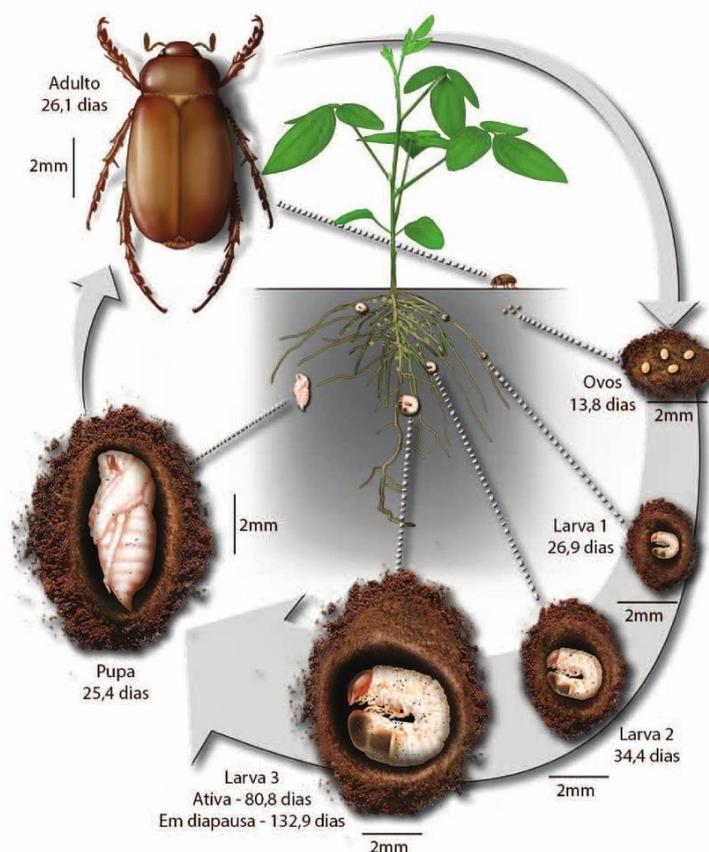


**Figura 1.** Larva típica de Scarabaeidae. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

#### 3.3.4. Biología y ecología

El ciclo biológico comienza con la cópula, que se presenta pocos días después de la emergencia del adulto, luego de ello, la hembra se interna en el suelo ubicando los huevos a pocos centímetros de profundidad, estos inicialmente son blancos y elongados, y a medida que aumentan su desarrollo embrionario se tornan más redondos. Miden en promedio 2 mm de diámetro, se les encuentra en el suelo en los primeros 30 cm de profundidad<sup>39</sup>. Después de la eclosión del huevo continúa el estado larval, el cual consta de tres instares, en cada cambio de instar realizan muda de piel; durante los dos primeros se alimentan de raíces tiernas y materia orgánica, durante el último la larva se muestra más voraz y se alimenta solo de las raíces, provocando mayores daños al cultivo<sup>40</sup>. En estado larval, se encuentran en el suelo a distintas profundidades dependiendo de la humedad y tipo de cultivo. En papa, maíz, frijol, hortalizas y flores se ubican en los primeros 30 cm; en potreros entre 10 y 15 cm; y en árboles frutales a profundidades que varían entre 25-60 cm. Durante los meses anteriores a los períodos de lluvia permanecen a profundidades entre 70 cm y un metro, donde se convierten en pupa. En este

último estado se protegen en una cámara pupal, la cual elaboran con tierra y excrementos, permaneciendo en su interior hasta la llegada de las lluvias, cuando los adultos atraviesan el perfil del suelo emergen a la superficie para emprender su vuelo e iniciar su ciclo vital (figura 2). Los adultos emergen con la llegada de las lluvias y pueden presentarse en los meses de marzo, abril, mayo, octubre y noviembre según la especie<sup>39</sup>.



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Phyllophaga cuyabana*<sup>41</sup>

### 3.3.5 Distribución geográfica

El estudio de diferentes investigadores de varios continentes ha permitido conocer la distribución global de las especies de mayor importancia agrícola. King en 1984 estudió una de las subfamilias de Melolonthidae afirmando que las larvas más perjudiciales pertenecen al género *Phyllophaga* encontrándose a lo largo de las Américas y en el Caribe; en Norteamérica destaca al género *Amphimallon*, *Phytoloema*, *Sericodes* y *Scizochelus* en Chile, *Serica* y *Holotrichia* en la India, *Leucopholis* en Filipinas e India, *Schizonicha* en

Botswana y Sudán, *Cochlitotis* en Tanganika, *Phytalus* en la isla Mauricio, *Hypopholis* y *Schizonicha* en Sudáfrica, *Dormolepida* y *Lepidiota* en Queensland Australia, *Costelytra* en Nueva Zelandia y *Melolontha* y *Amphimallon* en Europa. Sólo en el continente americano la familia Melolonthidae registra alrededor de 4000 especies agrupadas en varias subfamilias, de las cuales las de mayor interés agrícola son: Melolonthinae, Dynastinae y Rutelinae, que incluyen aproximadamente 200 especies plaga<sup>(3)</sup>.

Su distribución geográfica está determinada por el clima y la altitud a nivel del mar, encontrándose *Ancognatha* spp<sup>42</sup> y *Clavipalpus* spp. en altitudes mayores o iguales a 2.500 m.s.n.m<sup>43</sup>, *Phyllophaga* spp. menor a 2.500 m.s.n.m y *Cyclocephala* spp. menor a 1.700 m.s.n.m<sup>42</sup>.

### 3.3.6 Importancia económica y daños

Al ser esta una plaga polífaga (no selectiva con su alimento), afecta la mayoría de cultivos agrícolas, ocasionando grandes pérdidas para el cultivador. El estado larval genera daños en el sistema radicular principalmente, mientras que el adulto en el área folicular de la planta, en conjunto pueden destruir un cultivo hasta en un 98%. Existen reportes de cultivadores en el municipio de Pasca, que mencionan la pérdida de cultivos completos como el frijol por causa de este insecto plaga. Aunque en los reportes de entidades agrícolas no se encuentra la chisa como una plaga de importancia económica, es evidente que esta sigue afectando a una población significativa de cultivos.

El complejo chisa tiene un amplio rango de hospederos, entre los que se cuenta: Maíz, sorgo, arroz de seco, papa, frijol, solanáceas, camote, diversas hortalizas, pastos, plantas silvestres y diversos cultivos perennes como café y frutales<sup>44,45</sup>.

En el caso de los adultos, el daño principal consiste en la defoliación a que someten las plantas, cuyas hojas presentan márgenes irregulares; este daño puede ser de importancia económica en los cultivos de jocote, cítricos jóvenes y plantas ornamentales<sup>44</sup>. Por otro lado, el daño causado por las larvas se

considera de importancia más relevante en la mayoría de los cultivos, pues, en general, las plantas afectadas por ellas no crecen bien, presentan síntomas de deficiencia de agua y nutrimentos, alta susceptibilidad al acame, bajo rendimiento y pueden llegar hasta la muerte, dependiendo de la severidad del daño<sup>45</sup>.

A continuación, se describen los daños en algunos cultivos específicos de importancia económica:

En la papa, las larvas destruyen los tubérculos. En el caso del maíz, así como para diversos granos básicos, incluido el frijol, en los primeros 30 días del cultivo, las plantas presentan una coloración amarilla, se marchitan en las horas más soleadas, dejan de crecer y mueren. El daño tiene la característica de manifestarse en forma de parche o manchas formadas por grupos de plantas débiles o muertas dentro del área sembrada<sup>45</sup>.

### **3.4 Control Biológico**

El Control Biológico en su definición más sencilla, significa “la regulación de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, lográndose con ello un equilibrio poblacional”. Esta actividad en el ámbito de la agricultura, significa la regulación de la población de un organismo que está afectando al cultivo y generando pérdidas económicas (plaga), mediante la acción de otro que naturalmente ha sido diseñado para ejercer dicha función<sup>46</sup>.

Debido a que el desarrollo del control biológico se concentró por siglos en el combate de insectos, clásicamente se han definido tres tipos de controladores en el ámbito entomológico: los depredadores, que son artrópodos (insectos y arácnidos) y que atrapan a su presa devorándola; los parasitoides, que de forma interna o externa se alimentan de un hospedante (la plaga) y limitan su estabilidad; y los entomopatógenos, que pueden ser hongos, bacterias, virus u otros microorganismos que provocan enfermedades en los insectos. No obstante, actualmente se señalan dos tipos adicionales: los antagonistas, que interfieren con otros microorganismos patógenos, limitando

su desarrollo y por tanto, limitando su capacidad para generar enfermedades; y el grupo de los promotores de crecimiento y los inductores de resistencia sistémica<sup>46</sup>.

### 3.4.1 Enemigos naturales

Hay dos grandes grupos de enemigos naturales de las plagas: los depredadores y los parasitoides, y aunque a veces es difícil decir dónde acaba un tipo de vida y otro, a grandes rasgos, se suele aceptar que los depredadores son especies cazadoras que necesitan consumir un cierto número de individuos de sus presas para sobrevivir<sup>35</sup>.

Por ejemplo, tanto los sírfidos, cuyas larvas se alimentan activamente de pulgones, siendo sus adultos florícolas, como algunas hormigas, cuyos adultos son activos cazadores, o como los hemeróbidos, en que tanto adultos como larvas son depredadoras, pertenecen a esta categoría. Los parasitoides, en cambio, son especies que consumen una sola presa para su desarrollo, y este consumo se realiza sólo durante su fase juvenil (las larvas en el caso de los insectos), como hace por ejemplo, *Encarsia formosa*, cuyas larvas se alimentan internamente de la mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum*, mientras que los adultos son de vida libre. Otros parasitoides se alimentan de forma externa sobre sus huéspedes, como el drínido, que se encuentra sobre un cicadélido. En algunos casos, el huevo puesto por el parasitoide en el interior de su huésped da lugar a muchísimos descendientes, como se puede observar en la oruga de una mariposa plaga del chopo<sup>35</sup>.

Los enemigos naturales se encuentran de forma espontánea en la Naturaleza, y son capaces de hacer disminuir los niveles de población de sus presas hasta valores más bajos de los que alcanzarían sin su presencia, ello constituye el control biológico natural. En los cultivos los enemigos naturales pueden, pues, proporcionarnos una ayuda inestimable para mantener a raya a algunos insectos perjudiciales. En utilizar al máximo este tipo de ayuda se basa la lucha biológica<sup>35</sup>.

### 3.4.2 Entomopatógenos

Los entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades a los insectos, siendo el agente causal muy diverso. Penetran en la especie plaga a través del tubo digestivo o del tegumento dando lugar a la expresión de la enfermedad que provoca la muerte del hospedante. Los entomopatógenos son los únicos que no buscan de forma activa a sus presas, a excepción de los nemátodos<sup>47</sup>.

Dentro de los agentes entomopatógenos se incluyen bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoos fundamentalmente. Generalmente se caracterizan por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su aptitud para ser tratados industrialmente, es decir, se cultivan, formulan, empaquetan, almacenan y se comercializan como un insecticida convencional. Estos insecticidas biológicos penetran en el insecto plaga por ingestión, y también por contacto en el caso de los hongos<sup>47</sup>.

### 3.5 Enemigos naturales del complejo chisa (Scarabaeidae: Coleóptera)

Se han descrito diferentes entomopatógenos de *Phyllophaga* sp. y otros escarabeidos, destacándose las bacterias formadoras (*Bacillus popilliae*) y no formadoras de esporas (*Serratia entomophila*) así como los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y nematodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae; estos microorganismos son los que se han estudiado más a fondo por tener mayor potencial para su uso en el control de larvas de escarabeidos. Sin embargo, otros grupos como los virus, rickettsias y protozoarios también llegan a jugar un papel importante en el arsenal biológico que naturalmente contiene las explosiones poblacionales de este tipo de plaga<sup>48</sup>.

#### 3.5.1 Hongos

Varios hongos del grupo de los Deuteromicetos tales como *Paecilomyces*, *Hisutela*, *Verticillium*, *Akanthomyces*, *Beauveria* y *Metarrhizium*, han sido observados infectando larvas de escarabeidos; sin embargo, solamente los dos últimos han sido considerados como agentes con potencial para el desarrollo de un micoinsecticida. Ambos hongos son habitantes normales del suelo y están distribuidos globalmente, causando epizootias esporádicas bajo condiciones naturales <sup>48</sup>.

Se describen a *Metarrhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Septobasidium* sp. causando enfermedad en larvas de *Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclocephala*, y en adultos de *Phyllophaga*, *Cyclocephala* y *Serica*. Su presencia en larvas se evidencia por la aparición de puntos de entrada de color oscuro alrededor de los espiráculos, en medio de los tarsos, cerca de la región anal, entre los pliegues abdominales o en la unión de la cabeza con el tórax; posteriormente se presenta esporulación<sup>27</sup>, *Metarrhizium* produce micelio blanco o amarillo y columnas de conidias verdes que se unen formando típicos bloques muy compactos, en *Beauveria* se evidencian masas de conidios blancos o blanco cremoso<sup>48</sup> y esporulación color rosado en *Septobasidium* en larvas y adultos<sup>27</sup>.

Algunos mecanismos de defensa contra la infección por hongos son fácilmente identificables en el campo. El caso más claro es la acumulación de quitina, formando manchas café oscuro, alrededor de los puntos de la cutícula por donde se ha iniciado la penetración del patógeno o la encapsulación del microorganismo cuando ya ha penetrado, formando gránulos pardos o negruzcos en el cuerpo graso de la larva<sup>48</sup>.

### 3.5.2 Nemátodos

Nemátodos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae portan bacterias que son liberadas dentro del hospedante. La multiplicación de estas bacterias causa la muerte del insecto y a la vez le permite al nematodo completar su ciclo de vida, generando nuevos estadios juveniles que saldrán en busca de nuevas presas. Una ventaja de los nematodos es su movilidad, que se traduce en capacidad para buscar las larvas de *Phyllophaga* en el suelo<sup>48</sup>.

También se han descrito nemátodos del género *Hexamermis* spp. (Mermithidae) en larvas de *Phyllophaga*, *Anomala*, *Serica* y *Plectris*. El nemátodo consume el tejido graso y es posible observarlo a través del integumento. La infestación ocurre cuando la larva consume huevos del nematodo presentes en el suelo o cuando éste penetra en la cutícula<sup>27</sup>.

### 3.5.3 Rickettsias

De este grupo de patógenos se ha encontrado la especie *Rickettsiella popilliae*, causando enfermedades letales en varias especies de Scarabeidos. La infección se da por vía ingestión y la muerte puede tardar hasta 6 meses en alcanzarse. Su producción potencial como patógeno se ve limitada por su necesidad de crecimiento en células vivas y por ser patógenos potenciales para vertebrados<sup>48</sup>.

### 3.5.4 Virus.

Los virus entomopatógenos son considerados entidades infecciosas cuyo genoma está constituido por ácido nucleico, ya sea ADN o ARN. Son patógenos obligados ya que necesitan de un organismo vivo, el hospedante, para poder multiplicarse y diseminarse en el agroecosistema. A pesar de su éxito promisorio y atributos como plaguicidas, los virus han tenido un uso limitado y, sólo algunos productos comerciales se encuentran actualmente en el mercado, sobre todo a base de virus poliédricos (NPV), de la Familia Baculoviridae desarrollados para el control de algunos lepidópteros de la familia Noctuidae como *Helicoverpa zea*<sup>45</sup>. Son ingeridos por vía oral al consumir la materia orgánica infectada, la parte final del abdomen se torna transparente, flácida y finalmente se descompone<sup>48</sup>.

### 3.5.5 Bacterias

Las bacterias que pueden causar infecciones en insectos se clasifican en dos categorías: esporulantes y no esporulantes<sup>49</sup>.

De manera general, los síntomas evidentes de una larva infectada por bacterias entomopatógenas son: (a) la inhibición en la alimentación que ocurre como un primer evento; (b) cambios en la coloración y la turgencia de la larva; (c) cambios en las evacuaciones intestinales; (d) aletargamiento y finalmente la muerte de la larva. Estos síntomas pueden ir acompañados de una pérdida paulatina de peso, que varía según la especie bacteriana causante de la infección<sup>3</sup>.

#### 3.5.5.1 Esporulantes

Las bacterias esporulantes por su capacidad de formar esporas poseen una alta persistencia en el ambiente, son altamente virulentas y tienen una gran capacidad invasiva y de producción de toxinas, e incluyen todas aquellas que actúan como patógenos obligados y facultativos. Todas ellas pertenecen a la familia Bacillaceae. En este grupo, se encuentran los *Bacillus* como *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis*<sup>49</sup>.

A continuación, se presenta una breve referencia de las bacterias que han tenido mayor uso dentro del control biológico de insectos:

##### 3.5.5.1.1 *Bacillus thuringiensis*

Ha sido producido como un bioplaguicida desde inicios de 1950. Este ocupa, aproximadamente el 90% del mercado de los bioplaguicidas, produciéndose anualmente cerca de 13,000 toneladas del mismo<sup>45,49</sup>. Sin embargo, el descubrimiento de cepas activas sobre larvas de scarabeidos ha sido bastante reciente, esperando que pronto se puedan hallar formulaciones para estas plagas<sup>45,48</sup>. Básicamente, su acción está basada en la producción de tres exotoxinas, la beta, alfa y la gama y otra endotoxina, denominada delta endotoxina, la cual es producida a partir de las protoxinas resultantes de la degradación del cristal proteico por enzimas proteolíticas en el intestino del insecto, que ha demostrado ser agente principal del efecto insecticida<sup>49</sup>.

Su mecanismo de acción se resume en la ingestión de las esporas de Bt o bien, de los cristales de endotoxinas, las cuales alcanzan el intestino, donde ocurre la degradación del cristal mediante la participación de enzimas proteolíticas y condiciones de pH alcalino (superior a 9.5), el cristal es desdoblado en protoxina y posteriormente en delta-endotoxina, ésta ataca la pared intestinal, ocasionando lisis celular, disturbio del equilibrio colide-osmótico, destrucción del epitelio y la posterior muerte del insecto. A su vez las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas<sup>49</sup>.

#### 3.5.5.1.2 *Paenibacillus* spp.

Este género es el responsable de la enfermedad lechosa, llamada así por el aspecto característico de las larvas normalmente translúcidas, que se vuelven turbias debido al crecimiento masivo y la esporulación de las bacterias en la hemolinfa. En resumen, la larva come la espora que germina en el intestino posterior. Las células vegetativas invaden la hemolinfa donde crecen y esporulan, alcanzando a menudo 1010 células por ml. La muerte sigue aproximadamente 2 semanas después de la ingestión inicial<sup>50</sup>.

##### 3.5.5.1.2.1 *P. popilliae*

De esta especie se ha establecido su condición de parásito obligado. Esta bacteria tiene la capacidad de formar esporas muy resistentes a las condiciones adversas del medio, como la desecación y la radiación, lo que le confiere una ventaja para establecerse en control biológico<sup>48,49</sup>, causante de la enfermedad lechosa tipo A de los escarabajos, ocurriendo solamente en Scarabaeidae; esta se caracteriza por aumentar la blancura lechosa de la larva casi translúcida a medida que la bacteria crece y esporula en la hemolinfa. Ha sido relacionada con 29 especies de Scarabeidos, sobre todo en Melolonthinae y Rutelinae. Las larvas se infectan al ingerir alimentos contaminados con esporas de la bacteria, las que al entrar al tracto digestivo del insecto germinan

e infectan, ocurriendo la muerte al cabo de poco más de un mes post-infección<sup>45,49</sup>.

#### 3.5.5.1.2.2 *P. lentimorbus*

*P. lentimorbus* ha sido descrito como entomopatógeno en larvas de *Phyllophaga*, *Anomala*, *Cyclocephala*, *Plectris*, *Isonychus*, *Macroductylus* y *Ancognatha*. Esta bacteria causa la enfermedad lechosa tipo B, caracterizada por la aparición de coágulos marrones que bloquean la circulación de hemolinfa y conducen a condiciones de gangrena en las partes afectadas<sup>50</sup>. La infección ocurre vía oral, la larva toma una apariencia lechosa y consistencia blanda; en estados avanzados se torna negra y finalmente se descompone quedando sólo la cutícula<sup>27</sup>.

#### 3.5.5.2 No esporulantes

Las bacterias no esporulantes generalmente son comunes en el tracto digestivo de los insectos, pero, raramente tienen capacidad invasiva intrínseca<sup>49</sup>. A este grupo, pertenecen las bacterias de la familia Pseudomonadaceae como *Pseudomonas* sp, la familia Streptococcaceae y la Enterobacteriaceae, la cual está representada por el género *Serratia* sp<sup>49</sup>.

##### 3.5.5.2.1 *Serratia entomophila*

La bacteria coloniza el intestino larval después de ser ingerida del suelo por el insecto. La infección causa inhibición en la alimentación (AFE) y desarrollo de una coloración ámbar, así como una marcada disminución en los niveles de las principales enzimas digestivas de la larva. Los síntomas de la enfermedad son evidentes antes de la invasión de la bacteria al hemocele de la larva, lo cual ocurre en etapas tardías de la enfermedad y posterior a la colonización del intestino larval. El hemocele del insecto constituye un medio rico en nutrientes, donde la bacteria es capaz de reproducirse y provocar la muerte de la larva por septicemia después de varias semanas desde el inicio de la infección<sup>3</sup>.

## **3.6 Métodos moleculares de identificación**

### **3.6.1 PCR**

Técnica que realiza múltiples copias de una región de ADN, del que se conoce la región a secuenciar, replicando una y otra vez un mismo fragmento de ADN para seleccionar la región a amplificar se utilizan dos pequeños fragmentos de ADN complementarios a los extremos del ADN de interés, que se unen a ambas cadenas de la doble hélice de ADN y pueden ser utilizados como cebadores por la enzima encargada de la síntesis de ADN, la ADN polimerasa<sup>51</sup>.

### **3.6.2 Secuenciación por método Sanger**

Esta estrategia se basa en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple (que se utiliza como molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos últimos nucleótidos “especiales” o nucleótidos de parada, están diseñados para que carezcan del grupo 3'-OH, que permite la adición del nucleótido consecutivo, de forma que cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa se interrumpe la síntesis de la nueva hebra. Esto lleva a que se obtengan fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se incorporen los dideoxinucleótidos. De este modo, y tras una simple electroforesis, se va a poder dilucidar la secuencia<sup>52</sup>.

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Tipo de estudio

Universo: Bacterias entomopatógenas.

Población: especies enemigas naturales del complejo de larvas Scarabaeidae.

Muestra: bacilos Gram negativos y Gram positivos aislados y activados como control biológico del complejo chisa

### 4.2 Tipo de investigación

Este trabajo corresponde a una investigación de tipo cuantitativa que se basa en un diseño de tipo descriptivo-experimental.

Cuantitativa: el estudio busca medir la incidencia de cepas nativas y del cepario UCMC mediante bioensayos en la mortalidad de larvas de I, II o III instar del complejo chisa.

Descriptiva: Se presenta una interpretación del estudio basada en el porcentaje de mortalidad y supervivencia.

Experimental: En el estudio se tiene en cuenta más de una variable, las cuales son controladas con el fin de hallar las condiciones y la especie idóneas para el control biológico del complejo chisa.

### 4.3 Hipótesis

Especies bacterianas nativas con capacidad patógena contra insectos plaga del orden Coleóptera (Scarabaeidae) como posibles biocontroladoras efectivas.

### 4.4 Variables

TIPO DE VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN	CLASIFICACIÓN
Dependiente	Individuos muertos	Número significativo de decesos para evaluar tratamiento	Cuantitativa

<b>Dependiente</b>	Porcentaje de mortalidad	Porcentaje significativo de decesos para evaluar tratamiento	Cuantitativa
<b>Dependiente</b>	Alimentación	Se mide por el cese de consumo de alimentos como principal signo de enfermedad	Cualitativa
<b>Independiente</b>	Larvas de diferente tribu e instar	Evaluación de diferentes especies para comprobar su acción en diversos géneros	Cualitativa
<b>Independiente</b>	Cepas nativas	La selección de bacteria como posible agente biocontrolador	Cualitativa

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Fase pre-experimental

#### 5.1.1 Fase de campo



**Figura 3. Mapa político del municipio de Pasca, Cundinamarca. Se resaltan las dos veredas donde se realizaron la recolecta de las larvas de Scarabaeidae<sup>53</sup>.**

Esta fase consistió en la recolección de larvas de diferentes cultivos en dos fincas del municipio de Pasca-Cundinamarca: El primer muestreo se realizó el 6 de Abril de 2018 en la propiedad de don Teodomiro González llamada San Antonio, localizada en la vereda El Retiro; latitud: 4°17'50.858"N longitud: 74°18'28.1"W a una altitud de 2314 m.s.n.m, se recolectaron 25 larvas del complejo chisa (Coleóptera: Sacarabaeidae), de un cultivo de Pasto y frijol.

El segundo muestreo se realizó el 7 de Abril de 2018 en la propiedad de Lara Camargo llamada La Comadreja, localizada en la vereda Boca del Monte;

latitud: 4°18'36.5"N longitud: 74°17'28.7"W a una altitud de 2346 m.s.n.m se recolectaron 50 larvas del complejo chisa (Coleóptera: Sacarabaeidae), obtenidas de un cultivo de Pasto, papa y frijol.

La búsqueda de las larvas se llevó a cabo entre los 10 a 30 cm de profundidad mediante herramientas como azadón, barretillo y pala (ver figura 4), una vez extraídas del suelo éstas fueron colocadas y transportadas individualmente en vasos transparentes de 2 onzas con una porción de suelo del terreno, tapados con papel aluminio y empacados en caja de cartón como se muestra en la figura 6.



**Figura 4. Recolección de larvas en campo:** A. Finca El Retiro, B. Finca La Comadreja. Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018



**Figura 5. Larvas en cultivo de frijol.** Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018



**Figura 6. Colocación de larvas en hilera para su transporte.** Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018

### 5.1.2 Monitoreo de larvas

Las larvas fueron llevadas al laboratorio, donde se mantuvieron en constante observación con el fin de establecer las que padecían alguna enfermedad bacteriana, para determinar si la infección era de tipo bacteriano se tuvo en cuenta signos como aspecto blando y/o lechoso, coloración blanquecina, café o negruzca y olor a fermentación. Aquellas que presentaron estas características se procesaron en el laboratorio para realizar los aislamientos del patógeno.

### 5.1.3 Fase de aislamiento de patógenos bacterianos de larvas enfermas

Las larvas enfermas se sometieron a un proceso de desinfección con el fin de eliminar los microorganismos externos que pudiesen tener y que podrían interferir en el aislamiento del agente causal de la enfermedad.

Inicialmente, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos en beaker de plástico, posteriormente se lavó con agua destilada, luego se realizó un lavado con alcohol al 96% durante 1 minuto y finalmente se lavó con agua destilada estéril 3 veces.

Se realizaron aislamientos de diversos sitios anatómicos que incluyen cabeza, tórax, abdomen superior y zona caudal, utilizando bisturí de disección y pinzas, estos fueron inoculados con asa estéril en agar BHI y McConkey e incubados a una temperatura de 30° C durante 24 y 48 horas; del crecimiento obtenido, se procedió a purificar las colonias realizando un segundo aislamiento, y coloración de Gram de cada colonia con morfología diferente.

### 5.1.4 Fase de identificación microbiológica

Después de seleccionar las bacterias aisladas, confirmar su morfología microscópica y macroscópica se procedió a verificar su metabolismo bioquímico mediante pruebas tradicionales en tubo.

## 5.2 Fase experimental: pruebas de patogenicidad

### 5.2.1 Fase de campo

Esta fase consistió en la recolección de larvas suficientes para la ejecución de la prueba de patogenicidad y fue realizada en las propiedades San Antonio de Don Teodomiro González y La Comadreja de Lara Camargo en Pasca, Cundinamarca; este muestreo fue realizado el 1 de junio de 2018, en cultivos de papa, frijol y pasto (ver figuras 10 y 11). Estas dos propiedades fueron seleccionadas nuevamente para la búsqueda de larvas puesto que, de estas se obtuvieron los aislados bacterianos a probar en los ensayos de patogenicidad. Se recolectó un total de 750 larvas (600 de un cultivo de frijol, 80 de un cultivo de pasto, finca La Comadreja; 70 de un cultivo de papa, Finca San Antonio). El transporte se llevó a cabo de la misma manera que en la primera recolección de larvas.



**Figura 7.** *Recolección de larvas en finca La Comadreja. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018*



**Figura 8.** Medición de la temperatura del suelo con termómetro ambiental en cultivo de papa. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

Se tomó la temperatura del suelo con termómetro ambiental (figura 8) y la temperatura y humedad del cultivo con termohigrómetro digital con el fin de controlar estos factores en el laboratorio (ver figura 9).



**Figura 9.** Medición de humedad y temperatura en campo con termohigrómetro. A. Medición en finca La Comadreja. B. Medición en finca San Antonio. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018



**Figura 10.** Cultivo de frijol, finca San Antonio vereda El Retiro. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018



**Figura 11.** Cultivo de papa, finca San Antonio vereda El Retiro. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018



**Figura 12.** Larvas listas para guardar y transportar. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

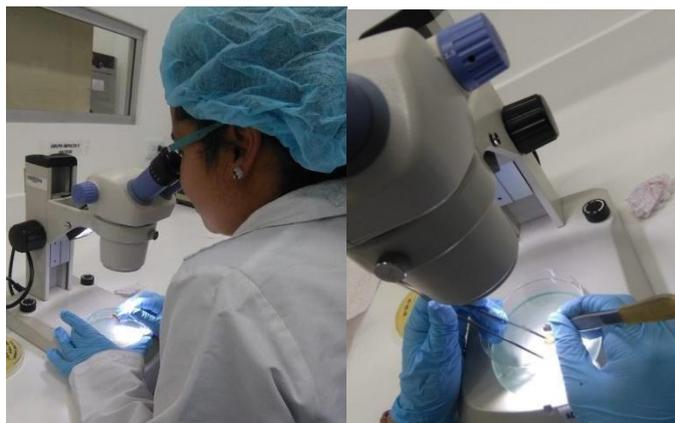
### 5.2.2 Monitoreo de larvas

El monitoreo se realizó para comprobar que las larvas no presentaran alguna enfermedad causada por microorganismos ajenos al ensayo sin alterar los resultados de la investigación.

Las larvas estuvieron bajo supervisión 30 días, durante este tiempo se verificaron criterios como el color, aspecto, y si presentaba algún signo de inanición, por lo que aquellas que presentaron signos de enfermedad se descartaron para el ensayo seleccionando solo las sanas.

### 5.2.3 Identificación de las larvas

La identificación de las larvas por género, se realizó con claves taxonómicas, con ayuda de un estereoscopio (ver anexo 2)



**Figura 13.** Identificación de larvas en el laboratorio 1 de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca mediante estereoscopio. Autoras: Beltrán, Cuevas, 2018.

#### 5.2.4 Desinfección del sustrato (suelo)

Este procedimiento se realizó con el fin de eliminar todos los contaminantes que pudiese traer el suelo y así asegurar que la muerte y/o enfermedad de la larva se debiera a los tratamientos aplicados. La esterilización del suelo se llevó a cabo dentro de la misma semana en que se montaron los bioensayos, mediante autoclave en el laboratorio central de la UCMC.

#### 5.2.5 Activación de cepas de *Bacillus sp.* cepario UCMC

Se realizó la activación de 11 cepas con actividad quitinolítica del género *Bacillus sp.* pertenecientes al cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (UCMC). BHF1, BHF2, BHF3, BHF4, BHF5, BHF6, BHF7, BHF8, BHF9, BHF10 y BHF11 (Tabla 4.), bajo el procedimiento establecido por Sánchez. L.<sup>54</sup>; se retiraron los viales congelados que contenían las cepas de *Bacillus sp.*, los cuales se encontraban a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ ; una vez los viales se descongelaron totalmente, se procedió a realizar siembra directa con asa por agotamiento en medio sólido BHI y en agar sangre, para verificar la capacidad hemolítica de las cepas. Posteriormente, se realizó coloración de Gram para verificar la morfología microscópica de las colonias.

**Tabla 4. Nomenclatura cepas *Bacillus* spp**

CEPA	GÉNERO-ESPECIE	NOMBRE
Bp01	<i>Bacillus pumilus</i> nativo del suelo	BFH01
BpC01	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 4884	BFH02
BS01	<i>Bacillus sphaericus</i> nativo de suelo	BFH03
BSC01	<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 4525	BFH04
BI07	<i>Bacillus subtilis</i> aislado de cultivo de <i>Solanum quitoense</i>	BFH05
CH4	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	BFH06
U2-01	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de plantas de cultivos de uchiva	BFH07
CH7B	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	BFH08
BIO10	<i>Bacillus subtilis</i> aislado de cultivo de <i>Solanum quitoense</i>	BFH09
TB2	<i>Bacillus subtilis</i> con actividad antagónica frente a <i>Fusarium</i>	BFH10
Control TB2	<i>Bacillus subtilis</i> nativo del suelo	BFH11

Autoras: Beltrán, Cuevas,. 2018

### 5.3 Fase de montaje de bioensayos

#### 5.3.1 Preparación de tratamientos

Luego de reactivar las cepas que se utilizarían como tratamientos en las pruebas de patogenicidad, se procedió a preparar las concentraciones de bacterias mediante la metodología de ajuste a escala Mac Farland, las cuales se realizaron en tubos falcon de 50 ml, cada inóculo bacteriano correspondiente a un tratamiento se ajustó a escala 1.0 Mac Farland con una concentración de  $3.0 \times 10^8$  y se verificó mediante espectrofotometría alcanzando una absorbancia entre 0.16 a 0.20. La descripción de los tratamientos se muestra en la tabla 5 y 6.

### 5.3.2 Inoculación de larvas

Se realizaron dos ensayos de patogenicidad; el primero el 12 de Julio de 2018 y el segundo el 10 de agosto de 2018, la inoculación se realizó de acuerdo a la metodología de Klein y Jackson<sup>55</sup> con algunas modificaciones. Se utilizaron larvas de I, II y III instar de desarrollo, se seleccionaron y distribuyeron las larvas de acuerdo con el tamaño y al género al que pertenecían.

En la primera prueba de patogenicidad se evaluaron 13 tratamientos correspondientes a los aislados bacterianos obtenidos de larvas enfermas (la descripción se muestra en la tabla 5), los cuales fueron ajustados a una concentración de  $3.0 \times 10^8$  ufc/mL, cada uno con 6 repeticiones de 6 larvas por inóculo, para un total de 36 larvas por tratamiento. La segunda prueba de patogenicidad constó de 11 tratamientos control, conformados por cepas del género *Bacillus* sp. suministradas por el cepario de la UCMC (tabla 6); utilizándose dos repeticiones de 5 larvas para un total de 10 larvas por inóculo.

El control negativo constó de 70 larvas escogidas al azar para los dos ensayos. Las pruebas de patogenicidad fueron montadas en cajas de cultivo celular, a cada pozo se le agregó una larva sana distribuida por género aleatoriamente, una porción de suelo estéril inoculado mediante aspersion y un cubo de zanahoria mediante inmersión en cada una de las concentraciones bacterianas.



**Figura 14.** Procedimiento utilizado en el montaje de las pruebas de patogenicidad.  
 Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

Los bioensayos fueron realizados en el laboratorio, con una duración de 56 días para la primera prueba de patogenicidad y 31 días para la segunda prueba, el monitoreo post inóculo se evaluó una vez por semana.

**Tabla 5.** Tratamientos evaluados en el primer ensayo de las pruebas de patogenicidad con larvas sanas en Julio de 2018

ENSAYO	TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	ESPECIFICACIÓN
1	T0	Sin inóculo	-----
2	T1	C1	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
3	T2	C5	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
4	T3	C9	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
5	T4	C10	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
6	T5	C13	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
7	T6	C16	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
8	T7	C19	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
9	T8	C24	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
10	T9	C26	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
11	T10	C27	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
12	T11	C30	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
13	T12	C32	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
14	T13	C34	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL

**Tabla 6.** Tratamientos evaluados en el segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad con larvas sanas en Julio de 2018

ENSAYO	TRATAMIENTO	ESPECIE	CODIFICACIÓN	ESPECIFICACIÓN
1	T1	<i>B. pumilus</i>	BFH-1	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
2	T2	<i>B. pumilus</i>	BFH-2	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
3	T3	<i>B. sphaericus</i>	BFH-3 cepa nativa	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
4	T4	<i>B. sphaericus</i>	BFH-4 cepa ATCC 4525	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
5	T5	<i>B. subtilis</i>	BFH-5	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
6	T6	<i>B. subtilis</i>	BFH-6	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
7	T7	<i>B. pumilus</i>	BFH-7	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
8	T8	<i>B. pumilus</i>	BFH-8	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
9	T9	<i>B. subtilis</i>	BFH-9	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
10	T10	<i>B. subtilis</i>	BFH-10	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL
11	T11	<i>B. subtilis</i>	BFH-11	3.0 x 10 <sup>8</sup> ufc/mL

## 5.4 Identificación molecular

### 5.4.1 Extracción de ADN

Se realizó de ADN genómico de los aislamientos mediante kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, USA), siguiendo el protocolo del kit para bacterias Gram positivas y Gram negativas (ver anexo 1).



**Figura 15.** Kit de extracción de ADN genómico Wizard utilizado para la obtención de ADN de los aislados bacterianos de larvas enfermas. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

#### 5.4.2 Amplificación parcial del gen ADN ribosomal 16S

Para lograr la amplificación parcial del gen ADNr 16S se realizó PCR convencional, cada reacción contenía un volumen final de 50  $\mu$ l (los valores utilizados en la master mix se muestran en la tabla 7), se utilizaron los iniciadores universales 16S-8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 16S-1492R (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Para observar los productos de amplificación se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v en TBE 1X, se añadió 10  $\mu$ l de tinte *GelGreen Nucleic Acid Gel Stain 10000X* (Biotium, USA) para visualizar las bandas en el gel. El corrido se llevó a cabo en una cámara Cleaver Scientific de 24 pozos, a 110 V por 40 minutos; se colocaron en cada pozo 5  $\mu$ l del amplificado de PCR. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb ladder (NEB, Reino Unido). La visualización del gel se realizó en un analizador Bio-Rad ChemiDoc XRS (BioRad, USA).

#### 5.4.3 Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR del gen ADNr 16S de los 13 aislados bacterianos fue realizada por Corpogen (Bogotá, Colombia) utilizando el método Sanger; para ello se envió 45  $\mu$ l de cada amplificado, las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el programa Chromas 2.6.5. (Technelysium, Australia), posteriormente se compararon con la base de datos de nucleótidos "nr" del GenBank mediante la herramienta BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool) del NCBI  
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

**Tabla 7. Valores de máster mix utilizados en PCR convencional.**

Componente	Volumen 50 µl	Concentración final
Go Taq G2 DNA Polymerase máster mix (Promega, USA)	25 µl	1X
Primer 16S-1492R (10µM)	1,05 µl	0,21µM
Primer 16S-8F (10µM)	1,05 µl	0,21µM
ADN genómico	0,5 µl	50-100 ng/ µl
Agua desionizada estéril	21,5 µl	---

### 5.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de variabilidad ANOVA de un factor, intervalo de confianza Tukey y homogeneidad de varianza por Levene, usando el paquete para *Excel real statistics*. El porcentaje de mortalidad fue corregido, respecto a las bajas del control usando la fórmula de Sun-Shepard

$$\% \text{ corregido} = \frac{\text{mortalidad de tratamiento} - \% \text{ en poblacion control}}{100 - \% \text{ en poblacion control}} \times 100$$

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Fase pre-experimental

#### 6.1.1 Monitoreo de larvas

De las larvas en observación, 5 presentaron signos de debilidad, cese de la alimentación y posterior cambio de color; bajo estas condiciones fueron seleccionadas para el aislamiento microbiano y su posterior uso en los ensayos de patogenicidad con larvas sanas (figura 16) .

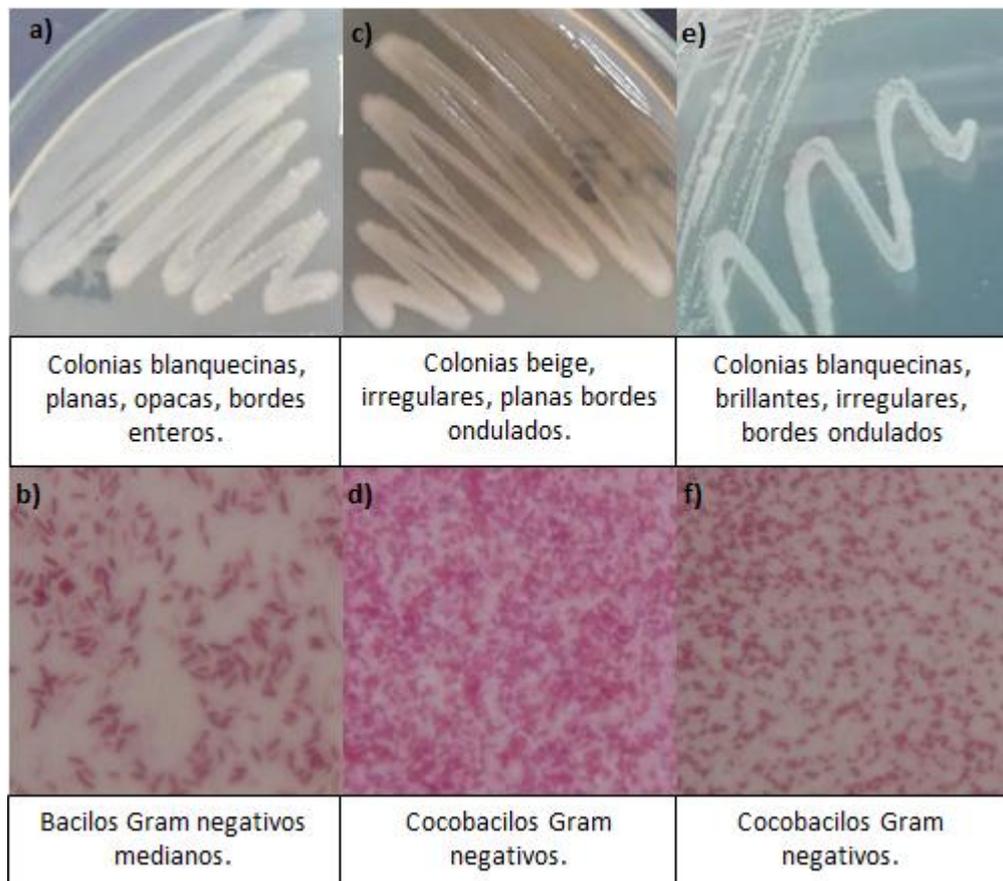


**Figura 16. Larvas enfermas con signos de infección bacteriana** A-B. Larva III instar blanquecina, blanda, con signos de inanición, aletargamiento, zona caudal blanca. C. Hemolinfa blanquecina de aspecto lechoso. D. Larva III instar, de color café amarillento, de aspecto blando, olor a podrido. E. Larva color ámbar, de aspecto blando. F. Larva II o III instar blanquecina, coloración negruzca en zona caudal con endurecimiento. G-H. Larva III instar, de aspecto blando, color violáceo a grisáceo, con posibles moretones en el cuerpo. Autoras; Beltrán, Cuevas. 2018.

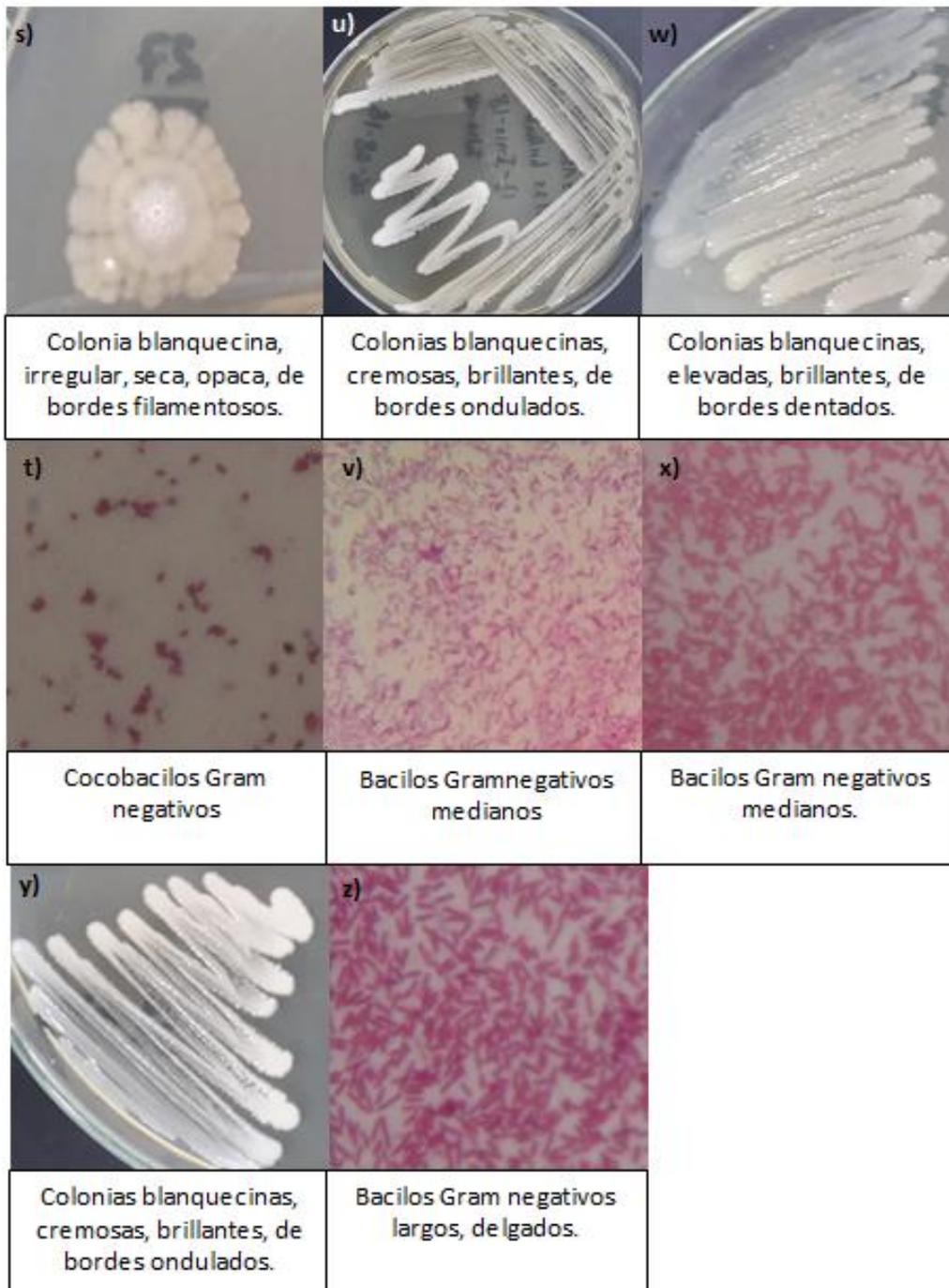
### 6.1.2 Fase de aislamiento de patógenos bacterianos de larvas enfermas

De las larvas enfermas mencionadas, se realizaron aislamientos de las diferentes partes anatómicas en agar BHI y MacConkey, obteniéndose abundantes colonias de diferente morfología macroscópica, las cuales fueron resembradas para su purificación en agar nutritivo y MacConkey, a su vez se realizó tinción de Gram para determinar la morfología microscópica de los aislados.

A continuación, se observan las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos de las larvas que presentaron signos de infección bacteriana.



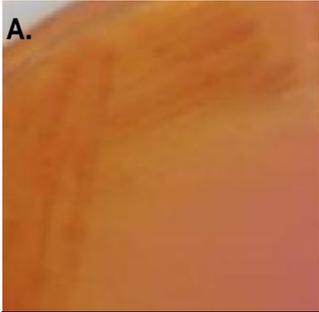
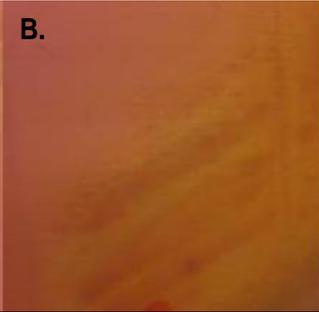
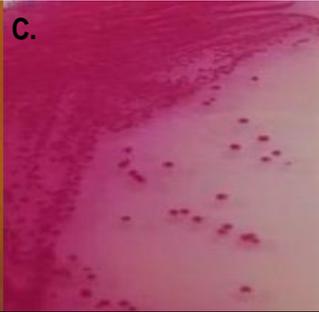
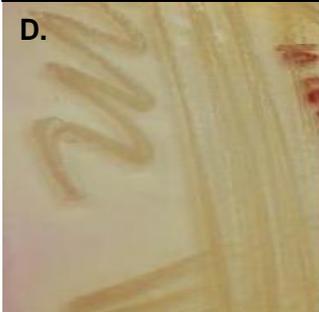
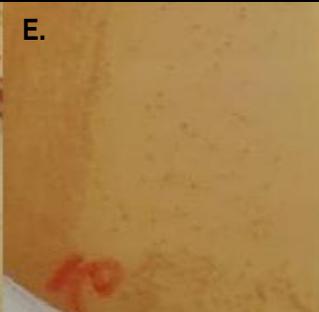
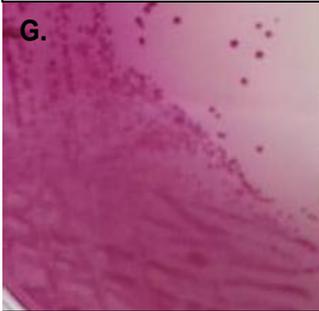
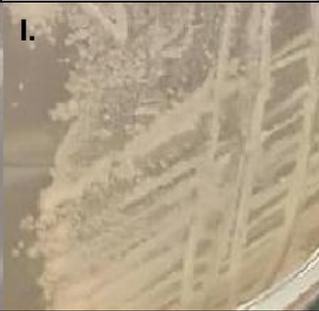
g)	i)	k)
Colonias blanquecinas, pequeñas, brillantes, de bordes ondulados.	Colonias blanquecinas, irregulares, de bordes dentados.	Colonias blanquecinas, brillantes, irregulares, de bordes enteros.
h)	j)	l)
Bacilos Gram negativos cortos.	Bacilos Gram positivos largos.	Bacilos Gram negativos medianos.
m)	o)	q)
Colonias blanquecinas, convexas, irregulares, bordes elevados.	Colonias blanquecinas, cremosas, brillantes, de bordes ondulados.	Colonias grisáceas, pequeñas, brillantes, hemólisis gamma
n)	p)	r)
Bacilos Gram negativos medianos.	Bacilos Gram positivos medianos.	Bacilos Gram positivos medianos.



**Figura 17. Cepas aisladas de larvas enfermas. Cultivo en agar nutritivo y sangre con su respectiva tinción de Gram:** Características macroscópicas de las cepas aisladas de larvas enfermas probadas en los ensayos de patogenicidad en agar nutritivo y microscópicas con tinción de Gram. **a)** Colonias de C1 en agar nutritivo; **b)** Coloración de Gram de C1; **c)** Colonias de C5 en agar nutritivo; **d)** Coloración de Gram de C5; **e)** Colonias de C9 en agar nutritivo; **f)** Coloración de Gram de C9; **g)** Colonias de C10 en agar nutritivo; **h)** Coloración de Gram de C10; **i)** Colonias de C13 en agar nutritivo; **j)** Coloración de Gram de C13; **k)** Colonias de C16 en agar nutritivo; **l)** Coloración de Gram de C16; **m)** Colonias de C19 en agar nutritivo; **n)** Coloración de Gram de C19; **o)** Colonias de C24 en agar nutritivo; **p)** Coloración de Gram de C24; **q)** Colonias de C26 en agar sangre; **r)** Coloración de Gram de C26; **s)** Colonias de C27 en agar nutritivo; **t)** Coloración de Gram de C27; **u)** Colonias de C30 en agar nutritivo; **v)** Coloración de Gram de C30; **w)** Colonias de C32 en agar nutritivo; **x)** Coloración de Gram de

C32; y) Colonias de C34 en agar nutritivo; z) Coloración de Gram de C34. Autoras; Beltrán, Cuevas. 2018.

Los aislados bacterianos identificados como Gram negativos se seleccionaron para una última siembra en agar MacConkey y así determinar la capacidad para fermentar la lactosa como una ayuda de identificación primaria (figura 18).

<b>A.</b> 	<b>B.</b> 	<b>C.</b> 
Colonias brillantes, irregulares, no fermentadoras de lactosa	Colonias pequeñas, irregulares, no fermentadoras de lactosa	Colonias redondas, pequeñas, brillantes, fermentadoras de lactosa
<b>D.</b> 	<b>E.</b> 	<b>F.</b> 
Colonias pequeñas, irregulares, no fermentadoras de lactosa	Colonias puntiformes, elevadas, no fermentadoras de lactosa	Colonias pequeñas, irregulares, brillantes, no fermentadoras de lactosa
<b>G.</b> 	<b>H.</b> 	<b>I.</b> 
Colonias pequeñas, circulares, brillantes, fermentadoras de lactosa	Colonias pequeñas, irregulares, no fermentadoras de lactosa	Colonias pequeñas, irregulares, cremosas, no fermentadoras de lactosa



**Figura 18. Cultivo en agar MacConkey: características macroscópicas. A. C1; B. C5; C. C9; D. C10; E. C16; F. C19; G. C24; H. C26; I. C32; J. C34. Autoras; Beltrán, Cuevas. 2018.**

En la tabla 8 se muestra las características de las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos, incluye la zona geográfica y cultivo de donde provienen las larvas y sus respectivos sitios anatómicos de donde fueron aisladas.

**Tabla 8. Características de los aislados bacterianos utilizados en los ensayos de patogenicidad.**

AISLADO	ZONA GEOGRÁFICA	CULTIVO	LARVA	SITIO ANATÓMICO
C1	Vereda El retiro; Finca San Antonio	Pasto	II o III instar, larva color ámbar, de aspecto blando	Abdomen
C5	Vereda El retiro; Finca San Antonio	Papa	III instar, larva café amarillento, de aspecto blando, olor fétido.	Abdomen
C9	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Frijol	II o III instar, larva blanquecina con endurecimiento en zona caudal	Hemolinfa zona caudal
C10	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Frijol	II o III instar, larva blanquecina con endurecimiento en zona caudal	Hemolinfa cabeza cefálica
C13	Vereda El retiro; Finca San Antonio	Papa	III instar, larva café amarillento, de aspecto blando, olor fétido.	Abdomen
C16	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva blanquecina, blanda con zona caudal blanca, signos de inanición.	Hemolinfa zona caudal

C19	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva grisácea azulada, con moretones en el cuerpo.	Hemolinfa cabeza cefálica
C24	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva blanquecina, blanda con zona caudal blanca, signos de inanición.	Hemolinfa zona caudal
C26	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva blanquecina, blanda con zona caudal blanca, signos de inanición.	Hemolinfa pata
C27	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva blanquecina, blanda con zona caudal blanca, signos de inanición.	Hemolinfa cabeza cefálica
C30	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva grisácea azulada, con moretones en el cuerpo.	Morado abdomen superior
C32	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva grisácea azulada, con moretones en el cuerpo.	Hemolinfa pata
C34	Vereda Boca del Monte; Finca La Comadreja	Pasto	III instar, larva grisácea azulada, con moretones en el cuerpo.	Estigma respiratorio

### 6.1.3 Fase de identificación microbiológica

Se realizaron pruebas de microbiología convencional en tubo, para Gram positivos y Gram negativos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9 y 10, estos se compararon con tablas de identificación del Manual de Bergey. Posteriormente, se calculó el porcentaje de homología y se tabuló junto con la identificación molecular (tabla 11).

Tabla 9. Pruebas bioquímicas en tubo, kit Gram negativos

PRUEBA	C1	C5	C9	C10
TSI	K/K	A/A	A/A	A/A
LIA	K/K	K/K	K/A	k/k
UREA	-	-	+	-
CITRATO DE SIMMONS	+	+	+	+
FEA	-	-	-	-
MIO	+++	+++	+++	+++
INDOL	-	-	-	-

VP	-	-	-	-
RM	-	+	+	+
NITRATOS	-	+	+	+
MOTILIDAD	+	+	+	+
LACTOSA	-	+	+	+
SACAROSA	-	+	+	+
GLUCOSA	+	+	+	+

Tabla 10. Pruebas bioquímicas en tubo, kit Gram positivos

PRUEBA	C13	C16	C19	C30	C32	C34
TSI	K/K	K/K	A/A	A/A	A/A	K.A/A
CS	-	-	-	+	+	+
UREA	-	-	+	+	+	d
MOT	+	-	+	+	+	+
BILIS	-	-	+	+	+	+
ALMIDON	-	-	+	-	-	-
GELATINA	+	+	+	+	+	+
GLUCOSA	-	d	+CO2+	+CO2+	+CO2+	+CO2+
SACAROSA	-	-	+	d	+	d
XILOSA	-	-	+	+	+	+
MALTOSA	-	-	+	+	+	+
ARABINOSA	-	-	d	d	d	d
MANITOL	-	-	+	+	+	+
NITRATOS	-	-	+	+	+	+
NaCl 7,5	+	-	-	-	-	-

d: débil

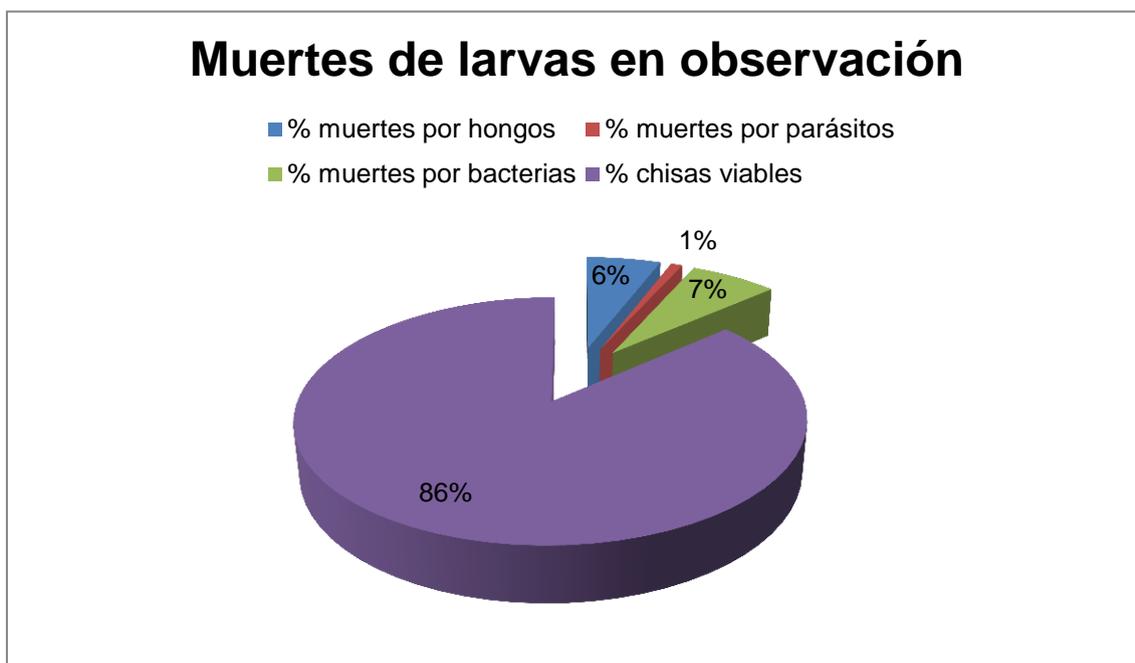
## 6.2 Fase experimental

### 6.2.1 Fase experimental: pruebas de patogenicidad

#### 6.2.1.1 Monitoreo de larvas

Durante los 30 días de observación se registraron 102 decesos; las muertes se debieron a diferentes etiologías, algunas ocasionadas por hongos de diferentes especies (figura 20) con un total de 44 larvas muertas; también se registraron 51 muertes ocasionadas por bacterias con su característico cambio de color y muerte blanda; y los últimos menos comunes, el deceso de 7 larvas asociadas a parásitos, de los cuales se desconoce si ataca la larva o si solo es un hospedero oportunista, estos parásitos tienen una forma redondeada, son

de color blanco y de un mínimo tamaño, el porcentaje de mortalidad de cada uno se encuentran en la figura 19.

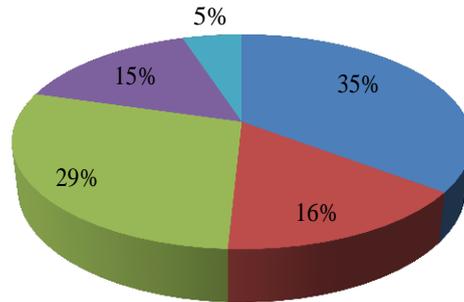


**Figura 19. Muerte de larvas en observación:** porcentaje de larvas muertas por los diferentes agentes etiológicos y larvas viables para el ensayo (que no muestran signos de enfermedad). Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.

Para la selección de las larvas, fueron necesarias observaciones individuales de cada una; el 86% del muestreo fue idóneo, con 578 larvas usadas para el montaje de 24 tratamientos bacterianos y 70 larvas como control del bioensayo.

## Etiología muertes por hongos

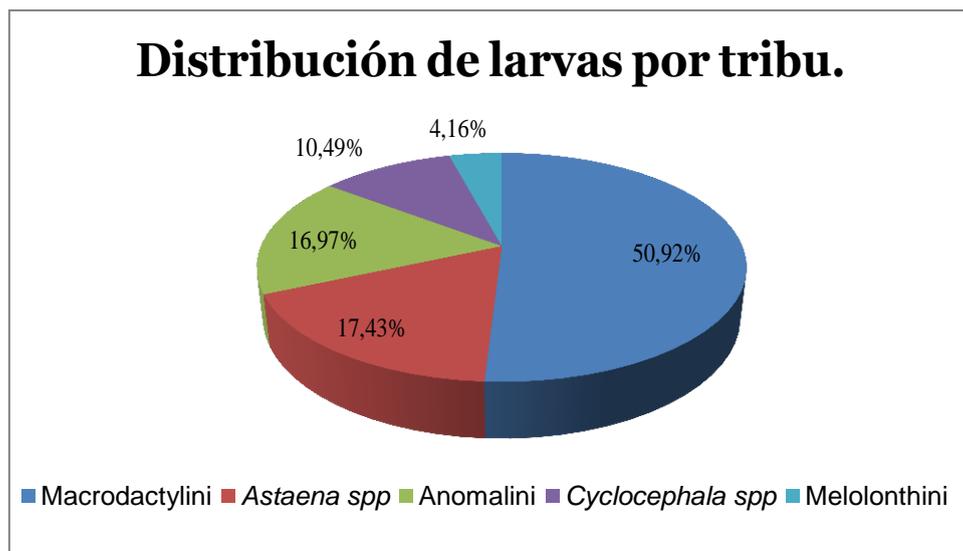
- Hongo Verde
- Hongo Filamentoso
- Hongo blanco seco
- Hongo Lanudo
- Simbiosis hongo filamentoso y hongo verde



**Figura 20.** Porcentajes de decesos por cada uno de los diferentes hongos. Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018.

### 6.1.4.2 Identificación de larvas utilizadas en el ensayo

Para la identificación de las larvas se utilizaron claves taxonómicas, en las que se tuvieron en cuenta la morfología del ráster (presencia o no de palidias, séptula, palis), color y forma de la cabeza. Las larvas identificadas pertenecían a 3 subfamilias: Melolonthinae, Dynastinae y Rutelinae, éstas a su vez se clasificaron en tribus; Macroductylini, Melolonthini, Sericini, Anomalini y Cyclocephalini. La distribución por tribu se muestra en detalle en la figura 21.

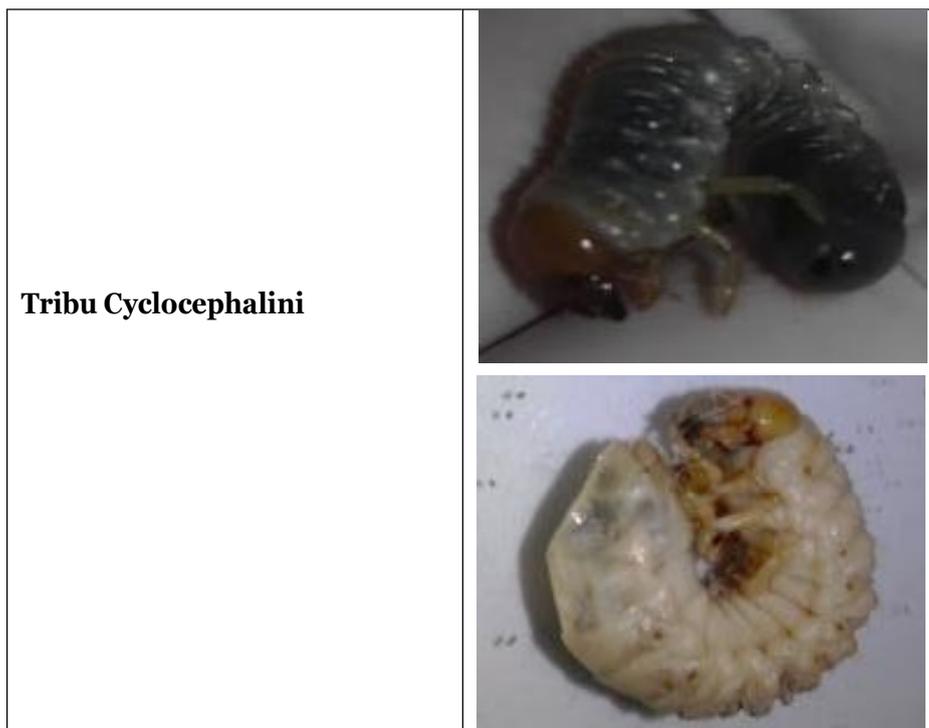


**Figura 21.** Distribución de larvas por tribu: *Macroductylini* 330 larvas (50,92%), *Melolonthini* 27 larvas (4,16%), *Sericini* (*Astaena* spp) 113 larvas (17,43%), *Anomalini* 110 larvas (16,97%), *Cyclocephalini* (*Cyclocephala* spp) 68 larvas (10,49%); para un total de 648 larvas (100%). Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.

En la tabla 11 se muestran los ejemplares de las larvas identificadas por tribu, dos de éstas fueron posibles caracterizar hasta género, ya que alcanzaron el estado adulto (ver anexo 7), facilitando la identificación.

Tabla 11. Ejemplares de larvas III instar recolectadas del municipio de Pasca, Cundinamarca, identificadas taxonómicamente. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.

<b>FAMILIA SCARABAEIDAE</b>	
<b>Subfamilia / Tribu</b>	<b>Larva</b>
<b>Subfamilia Melolonthinae</b>	
<b>Tribu Macroductylini</b>	
<b>Tribu Melolonthini</b>	
<b>Tribu Sericini</b>	
<b>Subfamilia Rutelinae</b>	
<b>Tribu Anomalini</b>	
<b>Subfamilia Dynastinae</b>	



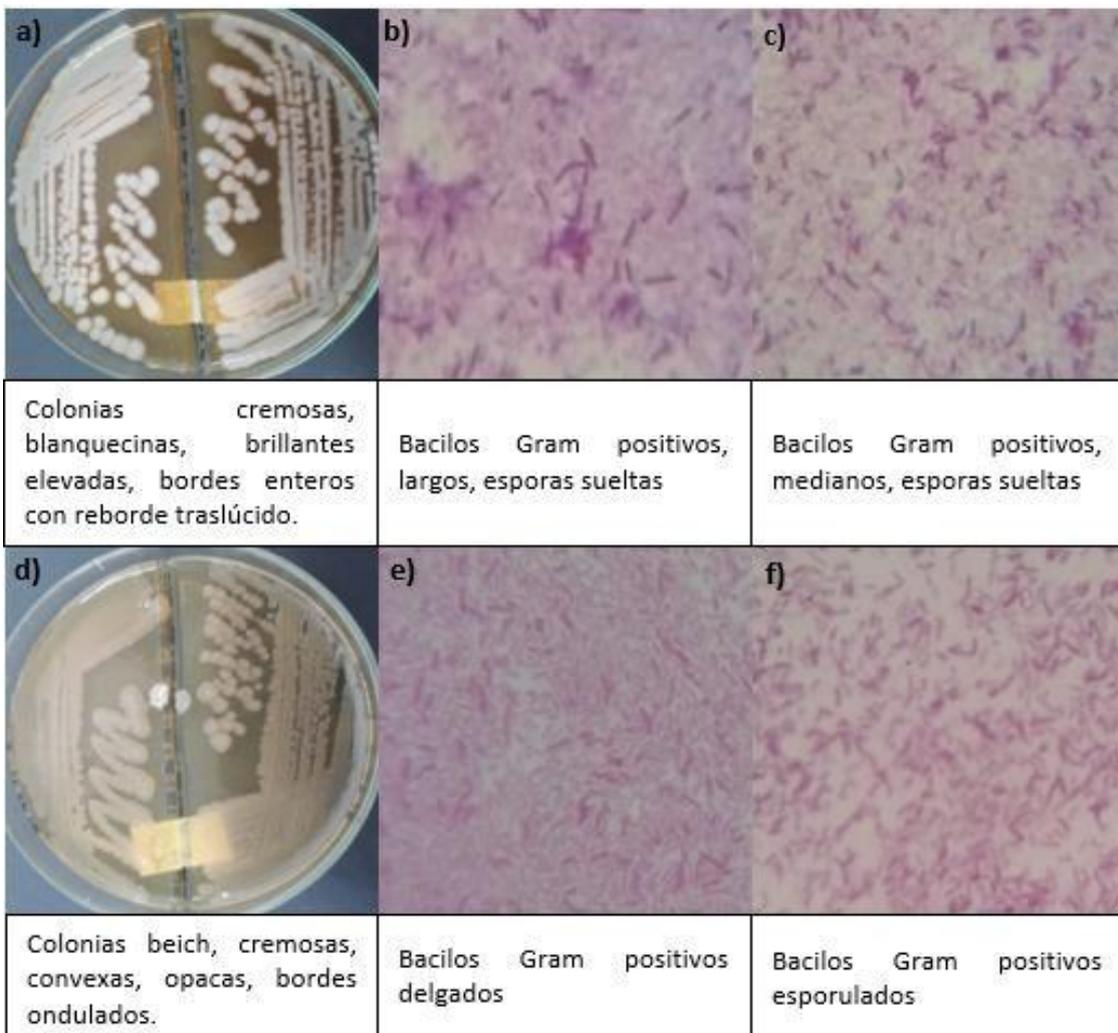
En la tabla 12 se muestra la distribución por cultivo de las 3 subfamilias y tribus encontradas en las dos propiedades del municipio de Pasca, Cundinamarca, se tuvo en cuenta los cultivos de Pasto, Frijol y papa, donde fueron realizados los muestreos de las larvas tanto para el aislamiento de entomopatógenos como para las pruebas de patogenicidad.

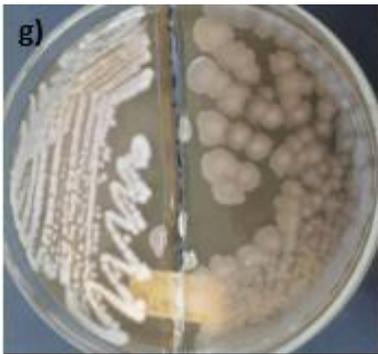
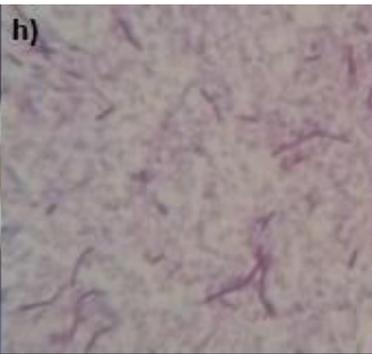
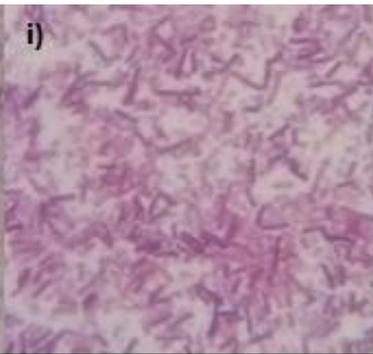
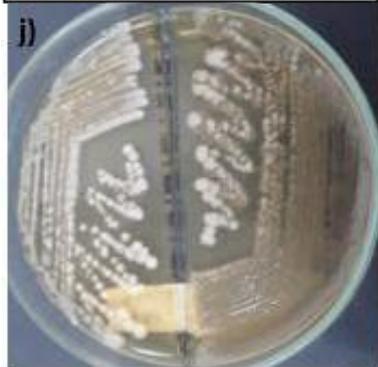
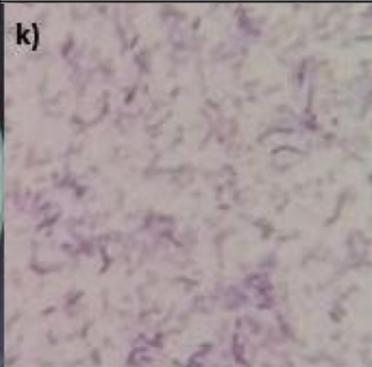
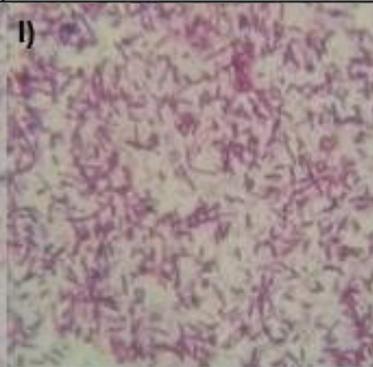
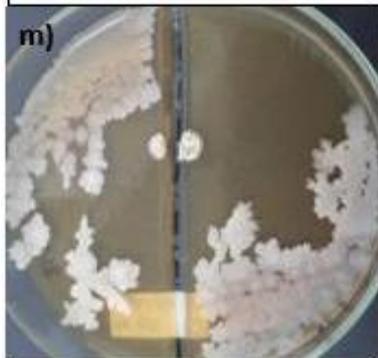
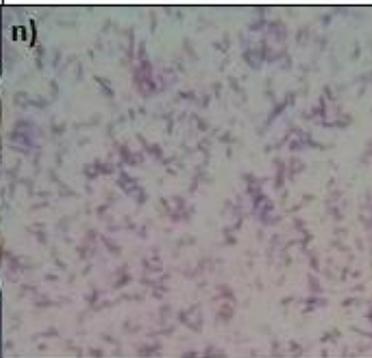
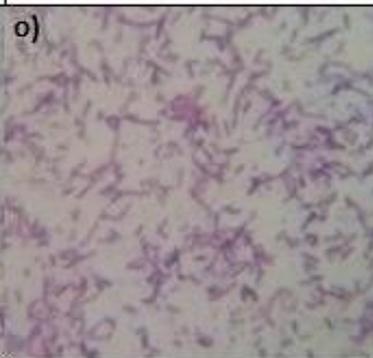
Tabla 12. Larvas de Melolonthidae encontradas en cultivo de pasto, papa y frijol en Pasca Cundinamarca. *Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018*

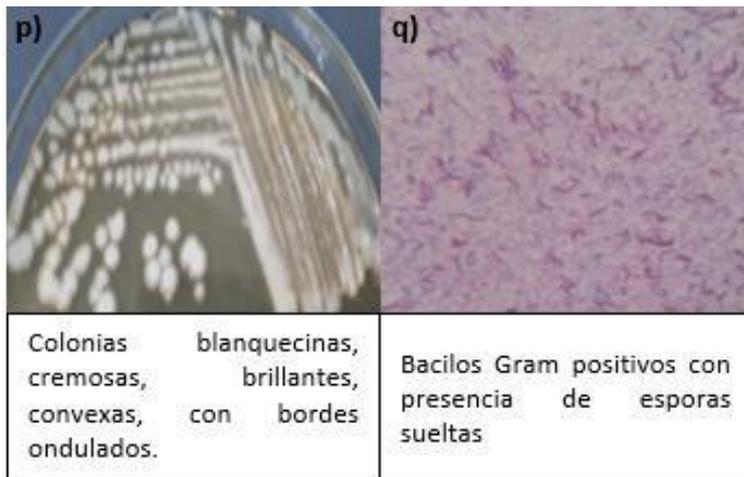
Subfamilia	Tribu	Pasto	Frijol	Papa	Total larvas
Melolonthinae	Macroductylini	28	302	0	330
	Melolonthini	5	10	12	27
	Sericini	20	80	13	113
Rutelinae	Anomalini	54	41	15	110
Dynastinae	Cyclocephalini	11	25	32	68
	<b>Total larvas por cultivo</b>	118	472	58	<b>648</b>

### 6.1.5 Activación de cepas de *Bacillus* sp. cepario UCMC

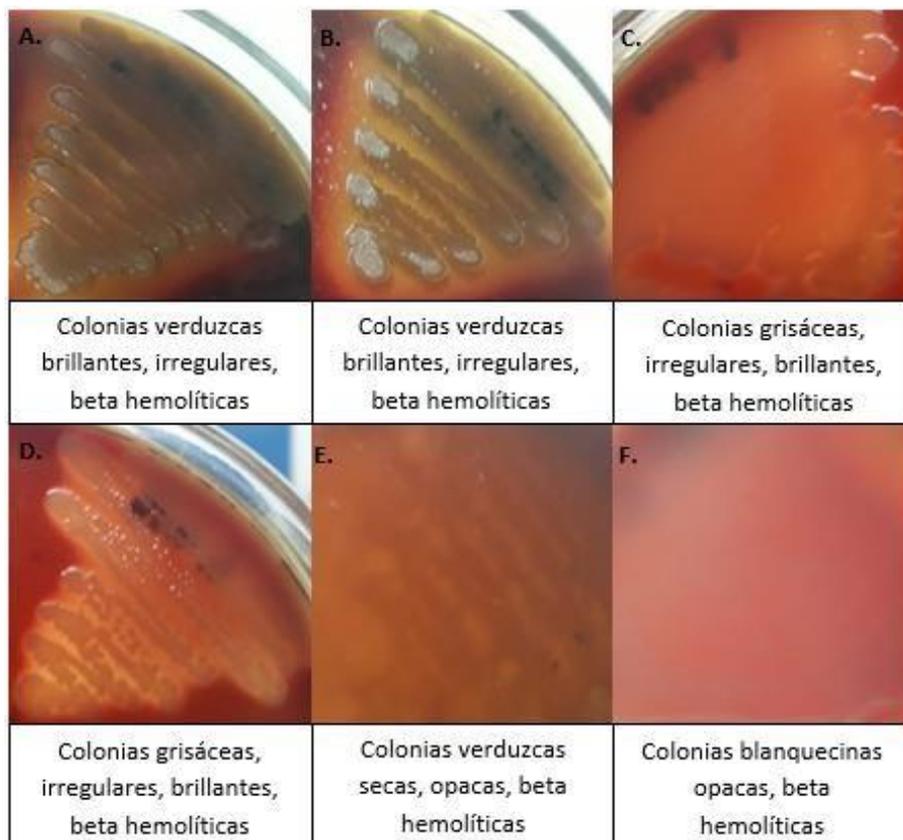
Las cepas de *Bacillus* spp suministradas por el cepario de la UCMC, se reactivaron en agar BHI, posteriormente se realizó tinción de Gram para confirmar su morfología microscópica (figura 22), adicionalmente se realizó siembra en agar sangre para verificar la capacidad hemolítica de cada una de las colonias (ver figura 23).

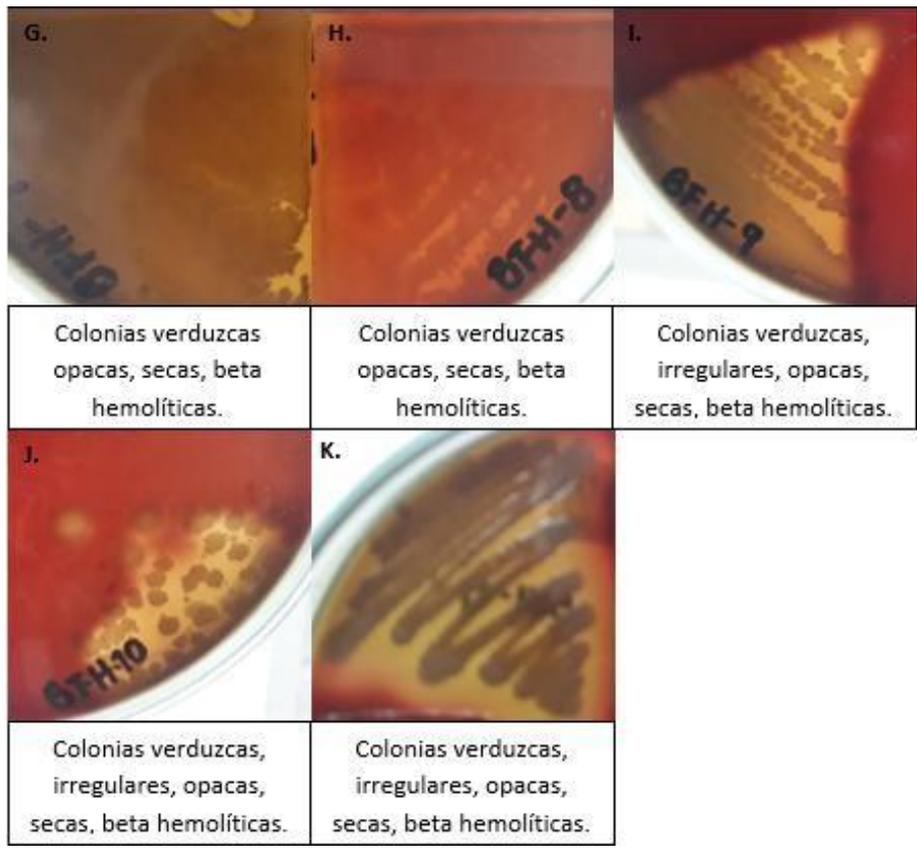


 <p>g)</p>	 <p>h)</p>	 <p>i)</p>
<p>Izq. Colonias opacas, blanquecinas, elevadas, bordes enteros. Der. Colonias irregulares, blanquecinas grisáceas opacas, bordes ondulados.</p>	<p>Bacilos Gram positivos largos, presencia de esporas sueltas.</p>	<p>Bacilos Gram positivos largos, algunos esporulados, presencia de pocas esporas sueltas</p>
 <p>j)</p>	 <p>k)</p>	 <p>l)</p>
<p>Colonias blanquecinas irregulares, opacas, planas, bordes ondulados.</p>	<p>Bacilos Gram positivos con presencia de esporas sueltas</p>	<p>Bacilos Gram positivos medianos, algunos esporulados</p>
 <p>m)</p>	 <p>n)</p>	 <p>o)</p>
<p>Colonias blanquecinas, secas, opacas, irregulares, planas, de bordes lobulados.</p>	<p>Bacilos Gram positivos con presencia de pocas esporas sueltas</p>	<p>Bacilos Gram positivos con presencia de pocas esporas sueltas</p>



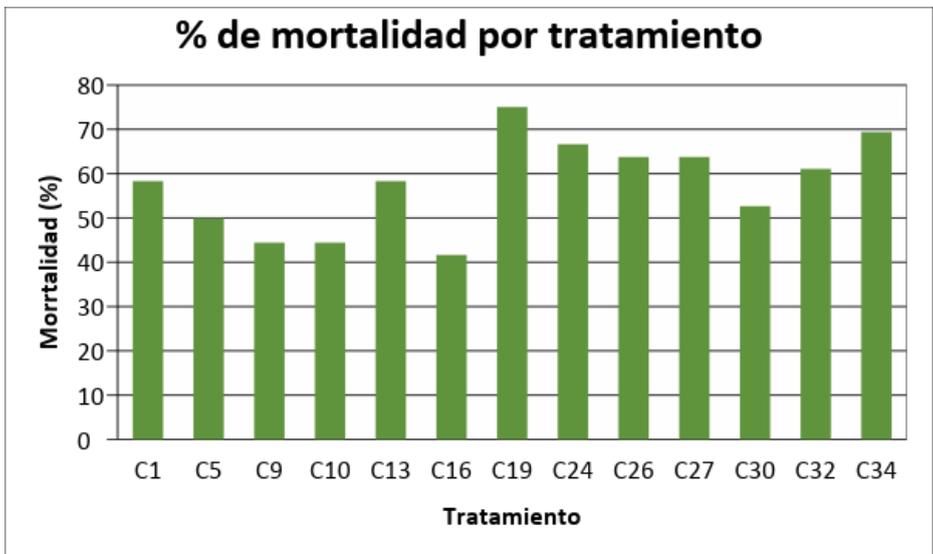
**Figura 22. Cultivo de las cepas de *Bacillus* sp en agar BHI con su respectiva tinción de Gram:** Características macroscópicas en agar BHI y microscópicas con tinción de Gram de las cepas de *Bacillus* spp del cepario de la UCMC probadas en los ensayos de patogenicidad en agar BHI: **a)** BFH -1 y BFH-2; **b)** BFH-1; **c)** BFH-2; **d)** BFH-3 y BFH-4; **e)** BFH-3; **f)** BFH-4; **g)** BFH-5-6; **h)** BFH-5; **i)** BFH-6; **j)** BFH-7 y BFH-8; **k)** BFH-7; **l)** BFH-8; **m)** BFH-9 y BFH-10; **n)** BFH-9; **o)** BFH-10; **p)-q)** BFH-11. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.





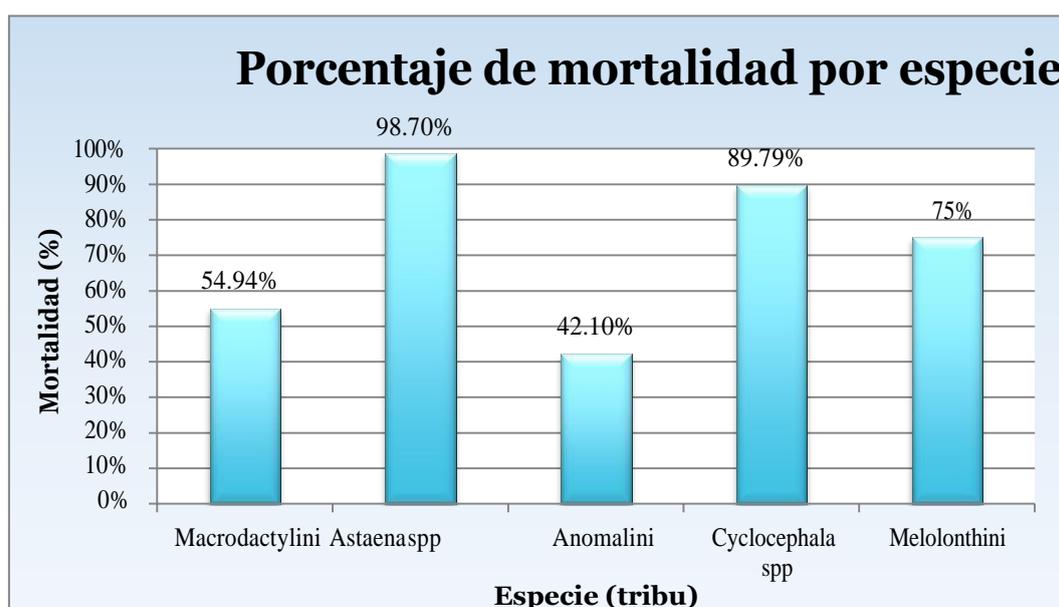
**Figura 23. Cultivo de las cepas de Bacillus sp en agar sangre:** Características hemolíticas de las cepas de Bacillus sp. del cepario de la UCMC probadas en los ensayos de patogenicidad en agar sangre. **A.** BFH-1; **B.** BFH-2; **C.** BFH-3; **D.**BFH-4; **E.** BFH-5; **F.** BFH-6; **G.** BFH-7; **H.** BFH-8; **I.** BFH-9; **J.** BFH-10; **K.** BFH-11. Autoras: Beltrán, Cuevas,. 2018.

**6.2 Análisis pruebas de patogenicidad**



**Figura 24. Porcentaje de mortalidad por tratamiento:** mortalidad asociada a los 13 inóculos aislados. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.

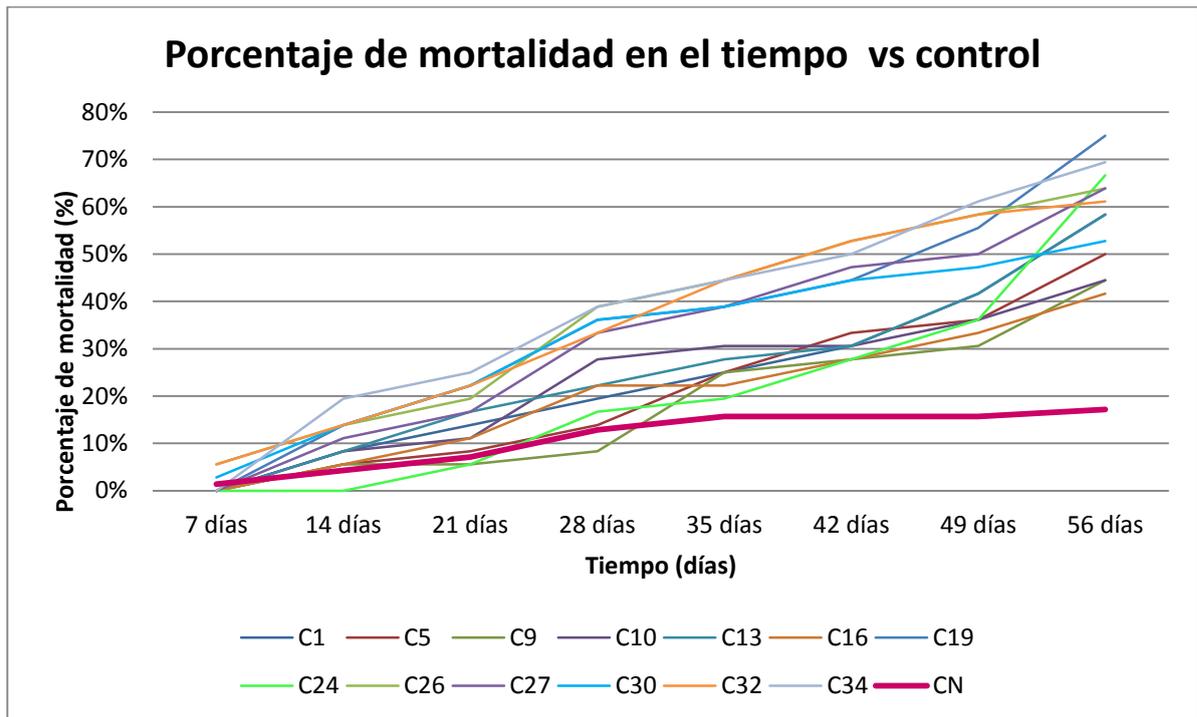
La mortalidad fue calculada de manera acumulativa a lo largo de los bioensayos arrojando que el tratamiento más eficiente contra las larvas es C19 con un porcentaje de mortalidad del 75%; contrario al tratamiento C16, quien obtuvo a lo largo del ensayo el 41,6% de mortalidad (figura 24). Los ensayos mostraron que a medida que el tiempo avanzaba la mortalidad aumentaba tanto en número de decesos, como el porcentaje de mortalidad en todos y cada uno de los tratamientos (figura 26), indicando que los tratamientos usados son de acción lenta, mayor al tiempo de observación evaluado.



**Figura 25. Mortalidad de larvas por especie.** Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018.

Al evaluar la susceptibilidad y mortalidad de los tratamientos frente a las tribus se encontró que la tribu Anomalini 42,10% es menos susceptible a decesos ocasionados por los tratamientos; el género más susceptible es *Astaena* spp con un porcentaje de 98,70% (figura 25.)

Se determinó el porcentaje de mortalidad de cada uno de los tratamientos a través del tiempo, todos tuvieron un comportamiento similar, el número de larvas muertas era directamente proporcional al tiempo, evidenciando a los 42 días un aumento significativo en la mortalidad de las larvas (figura 26).



**Figura 26.** Mortalidad causada por los aislamientos bacterianos sobre larvas de la familia Scarabaeidae durante un período de 56 días en condiciones de laboratorio, comparado con el comportamiento del control negativo. Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018.

Los porcentajes de mortalidad se presentan en la tabla 13; los tratamientos C13; C19; C24; C26; C27; C32 y C34 obtuvieron un porcentaje mayor o igual 50% de mortalidad, lo cual los hace una buena alternativa como control del complejo chisa.

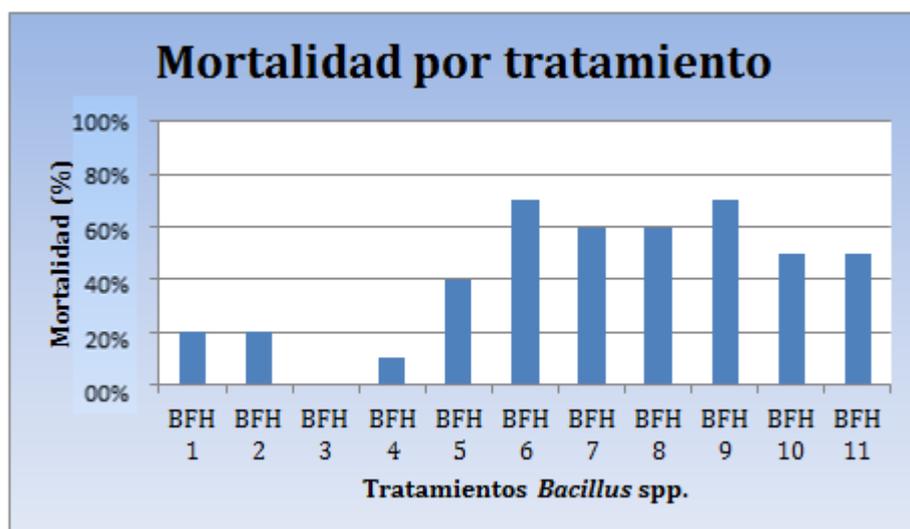
**Tabla 13.** Porcentaje de mortalidad y número de muertes por tratamiento. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

TRATAMIENTO	NUMERO DE MUERTES	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
C1	21	58,3
C5	18	50
C9	16	44,4
C10	16	44,4
C13	21	58,3
C16	15	41,6
C19	27	75
C24	24	66,6
C26	23	63,8
C27	23	63,8
C30	19	52,7
C32	22	61,1
C34	25	69,4

En la tabla 14, se muestra los resultados del segundo ensayo, realizado con las cepas de *Bacillus* spp. Los tratamientos BHF6, BHF7, BHF8 y BHF9 presentaron durante el ensayo mayor acción quitinolítica provocando muerte prematura de las larvas, el ensayo BHF 3 demostró que no posee ninguna actividad contra las larvas de la familia Scarabaeidae. Los resultados se graficaron en la figura 27.

**Tabla 14.** Porcentaje de mortalidad y número de muerte por tratamiento BHF's.  
Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018

TRATAMIENTO	NÚMERO DE MUERTES	PORCENTAJE DE MORTALIDAD(%)
BFH 1	2	20
BFH 2	2	20
BFH 3	0	0
BFH 4	1	10
BFH 5	4	40
BFH 6	7	70
BFH 7	6	60
BFH 8	6	60
BFH 9	7	70
BFH 10	5	50
BFH 11	5	50



**Figura 27. Porcentaje de mortalidad por tratamiento:** mortalidad asociada a los 11 inóculos pertenecientes al género *Bacillus* spp. Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.

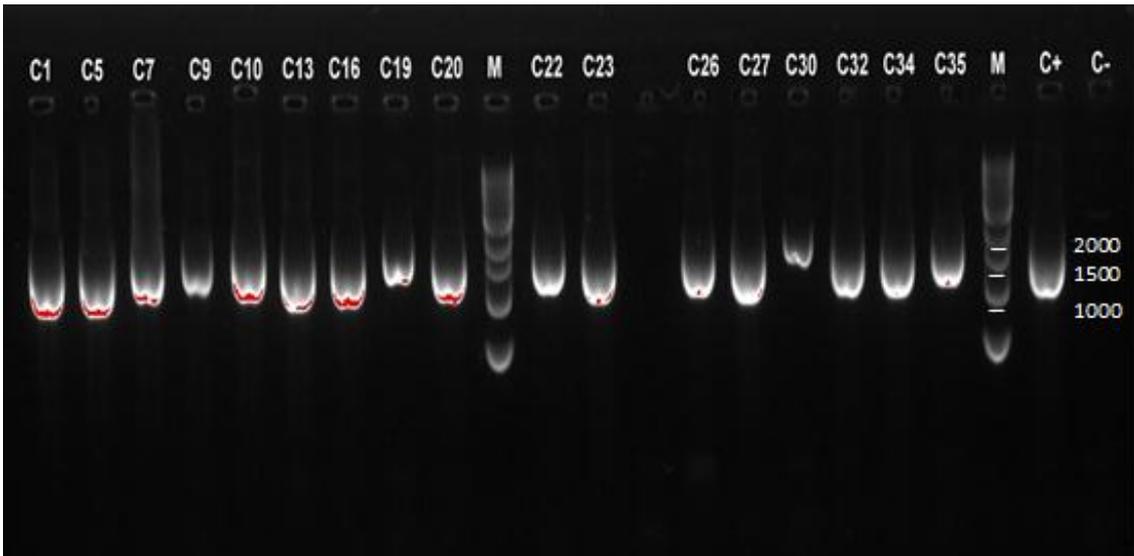
### **6.3 Análisis estadístico**

El análisis de datos ANOVA comparó las medias de las variables usadas por tratamiento y porcentaje de mortalidad con los tratamientos de bacterias aisladas y recuperadas. En este experimento se tuvo en cuenta como hipótesis variable el número de larvas muertas por cada uno de los tratamientos bacterianos usados y como hipótesis nula la posibilidad de muerte por agentes y factores externos diferentes a los tratamientos, en todos los tratamientos se obtuvo un  $P = >0.05$ , tal es el caso de los tratamientos C19, C30 y C34 con  $P = 0,00164789$ ;  $0,00049262$ ;  $0,00087502$  respectivamente. En la homogeneidad de varianzas  $P = 0,05$  rechaza la hipótesis nula, junto con el intervalo de confianza de Tukey las diferentes medias de los tratamientos aportan un 95% de confianza (Anexo 5)

### **6.4 Identificación molecular**

#### **6.4.1 Amplificación parcial del gen ADNr 16S**

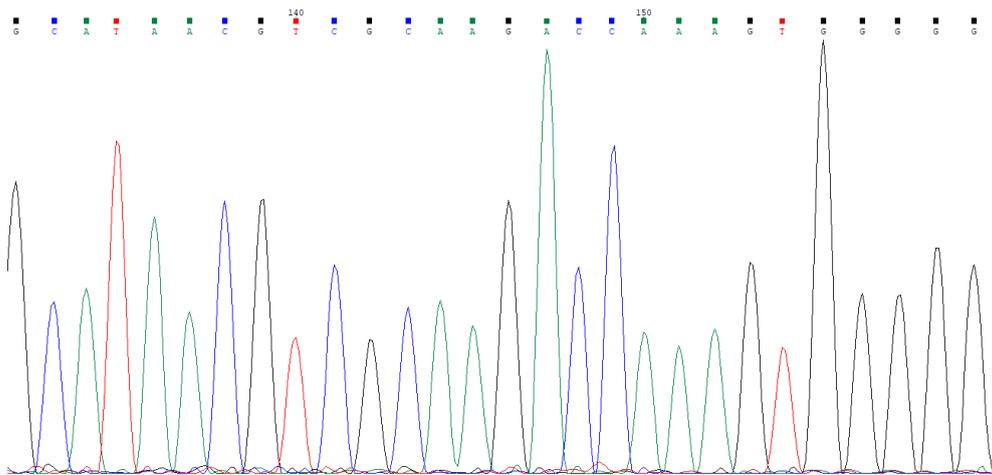
La extracción del ADN genómico de los aislados bacterianos se realizó mediante el kit comercial Wizard Genomic ADN Purification de Promega (USA), el ADN genómico obtenido fue sometido a PCR, y los amplificados se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa; el resultado del corrido se muestra en la figura 28, éste fue visualizado en el analizador Bio-Rad ChemiDoc XRS. Los productos de PCR obtenidos en 17 aislamientos fueron del tamaño esperado, aproximadamente entre 1000 pb y 1500 pb.



**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% en TBE 1X de los productos de PCR, correspondientes a los aislados bacterianos de larvas enfermas y/o muertas por infección bacteriana. Marcador 1Kb ladder (NEB, UK). Autoras: Beltrán, Cuevas. 2018.

#### 6.4.2 Secuenciación por método Sanger

Las secuencias de los productos de PCR generadas por el método Sanger en Corpogen se visualizaron y editaron en el programa Chromas 2.6.5. (figura 29).



**Figura 29.** Secuencia visualizada en Chromas. Autoras: Cuevas, Beltrán. 2018.

En la siguiente tabla se muestra la identificación microbiológica y molecular de los aislados bacterianos, con sus respectivos porcentajes de identificación.

Aislamiento	Identificación microbiológica	Porcentaje de identificación	Secuencia 16S-ADNr	Porcentaje de identificación	Link NCBI	Número de acceso GENBANK
C1	<i>Pseudomonas</i> spp.	87,5%	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK026822.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=X9ZEXXAZ015">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK026822.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=X9ZEXXAZ015</a>	SUB4991080 C1S MK351234 SUB4991080 C1A MK351235
C5	<i>Klebsiella</i> spp.	62,5%	<i>Raoultella terrigena</i>	100%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC790281.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=X9YW689D014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC790281.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=X9YW689D014</a>	SUB4991080 C5S MK351236 SUB4991080 C5A MK351237
C9	<i>Klebsiella</i> spp.	50%	<i>Raoultella</i> spp	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LC049187.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=2&amp;RID=XAOEBVT7015">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LC049187.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=2&amp;RID=XAOEBVT7015</a>	SUB4991080 C9S MK351238 SUB4991080 C9A MK351239
C10	<i>Enterobacter</i> spp.	56,25%	<i>Serratia entomophila</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB720153.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=XA1BC1FF014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB720153.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=XA1BC1FF014</a>	SUB4991080 C10S MK351240 SUB4991080 C10A MK351241
C13	<i>Bacillus</i> spp.	46,66 %	<i>Lysinibacillus</i> spp	100%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK053917.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=XA2KTBR2014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK053917.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=1&amp;RID=XA2KTBR2014</a>	SUB4991080 C13A
C16	<i>Pseudomonas</i> spp.	26,66 %	<i>Comamonas testosteroni</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY910091.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=2&amp;RID=XJKFFAWX015">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY910091.1?report=genbank&amp;log\$=nucltop&amp;blast_rank=2&amp;RID=XJKFFAWX015</a>	MK351242)SUB4991080 C16A MK351243
C19	<i>Serratia</i> spp.	46,66 %	<i>Serratia proteamaculans</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJMD5H5J014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJMD5H5J014</a>	SUB4991080 C19A MK351244
C26	No identificada	---	<i>Bacillus mycoides</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MF111470.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XZ1SNBB9015">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MF111470.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XZ1SNBB9015</a>	SUB4991080 C26S MK351245 SUB4991080 C26A MK351246
C27	No identificada	---	<i>Xenorhabdus</i> spp	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GU480973.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJN9098501R">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GU480973.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJN9098501R</a>	SUB4991080 C27S MK351247 SUB4991080 C27A MK351248
C30	<i>Serratia</i> spp.	73,33%	<i>Serratia proteamaculans</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJPAPSYM014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJPAPSYM014</a>	SUB4991080 C30A MK351249
C32	<i>Serratia</i> spp.	73,33%	<i>Serratia proteamaculans</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJR0669G015">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJR0669G015</a>	SUB4991080 C32S MK351250 SUB4991080 C32A MK351251
C34	<i>Serratia</i> spp.	73,33%	<i>Serratia proteamaculans</i>	99%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJRMU664015">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY934181.1?report=genbank&amp;log\$=nuclalign&amp;blast_rank=1&amp;RID=XJRMU664015</a>	SUB4991080 C34S MK351252 SUB4991080 C34A MK351253

## DISCUSIÓN

En la labor de cultivo en campo se evidencia que el complejo chisa sigue siendo una problemática que afecta a los cultivadores. Aunque las relaciones de antagonismo que se dan entre los organismos de forma natural ya son una forma de mantener controlados tanto insectos plaga como otros microorganismos fitopatógenos, es necesario seguir en la búsqueda de alternativas biológicas que controlen estos de forma masiva.

Pasca es un municipio reconocido por su alta producción de cultivos, tales como papa, mora, arveja, frijol, cebolla, uchuva y hortalizas, estos constituyen la base económica de sus familias, por lo que los daños en dichos cultivos son perjudiciales para su misma economía. Los campesinos reportan la utilización de insecticidas de origen químico para el control de la chisa, lo que genera daños a largo plazo en la salud tanto de los cultivadores como de los consumidores de estos productos agrícolas. De los resultados obtenidos del trabajo de campo, se puede analizar la distribución tanto geográfica como por cultivo que presenta la familia de coleópteros fitófagos Scarabaeidae en dos veredas de este municipio (ver tabla 12), observando que esta distribución no es uniforme en las dos propiedades estudiadas, a pesar de pertenecer al mismo municipio y tener una altitud al nivel del mar y una temperatura muy similares. En la propiedad de Don Teodomiro González, predominaron las tribus Cyclocephalini en el cultivo de papa y Sericini en el de frijol, a diferencia de la propiedad de Lara Camargo donde se resalta la presencia de la tribu Macroductylini en frijol, seguida de Anomalini en frijol y pasto. Según un estudio realizado por López et al<sup>56</sup> sobre la diversidad de los escarabajos fitófagos de la familia Scarabaeidae, en los Andes orientales, que incluía Cundinamarca, junto con una revisión de las diferentes colecciones de estos insectos, *Cyclocephala* spp ha sido encontrada ocasionando daños en varias regiones agrícolas, principalmente en cultivos de papa, frijol, maíz, yuca, pastos, hortalizas y flores<sup>57</sup>. De acuerdo con este trabajo y a lo encontrado en el presente estudio se confirma la prevalencia del género *Cyclocephala* spp en cultivos de

papa y frijol, siendo mayor en el primero de ellos; por otro lado, es importante mencionar su distribución de acuerdo a la altura sobre el nivel del mar, este género ha sido reportado desde los 0 hasta los 1800 m.s.n.m.<sup>56,57</sup>, sin embargo, en el presente trabajo fue encontrado a una altura de 2300 m.s.n.m. Es preciso advertir que son pocos los estudios de diversidad de esta especie en Cundinamarca y ninguno en el municipio de Pasca.

La tribu Sericini se ha encontrado en Cundinamarca atacando flores de cultivos comerciales, en Antioquia en cultivos de frijol, papa y zanahoria; este género se distribuye en los pisos térmicos medio y frío (entre 1000 y 3000 m.s.n.m.), de acuerdo con lo encontrado en el municipio de Pasca y los reportes existentes, se asemejan tanto en la altura como en la distribución por cultivos. Pardo en el 2007 afirmó que la poca información que se tiene sobre esta especie está dispersa y no permite adelantar programas de manejo de este grupo de insectos plaga<sup>58</sup>.

Las tribus Macroductylini y Anomalini han sido reportadas principalmente en pastizales, y en alturas hasta los 2240 m.s.n.m.<sup>56</sup>; Villegas<sup>59</sup> realizó un reconocimiento de especies del complejo chisa en Risaralda, encontrando mayor prevalencia de estas dos tribus en cultivos de pasto y en menor cantidad en cebolla; por el contrario, en la propiedad de Lara Camargo predominó Macroductylini en el cultivo de fríjol, seguido del de Pasto, mientras que Anomalini fue mayormente encontrada en cultivo de Pasto; resultados que se relacionan con los encontrados por otros autores.

El monitoreo de las larvas antes de realizar las pruebas de patogenicidad es clave para el desarrollo de las mismas y obtener resultados más confiables. En el presente estudio se tuvo un tiempo de observación de 30 días, sin embargo, se considera dejar un tiempo aproximado de 70 días para el monitoreo, ya que hay diferentes etiologías que demoran en presentar signos y ocasionar la muerte de la larva hasta en 3 meses. Durante esta fase de observación se evidenciaron otros entomopatógenos de origen diferente al bacteriano, como los diversos hongos que ocasionaron muerte en varias de las larvas

evaluadas. Se determinó como el mayor entomopatógeno el hongo *Metarhizium* spp aislado en el laboratorio e identificado de acuerdo a sus características microscópicas en azul de lactofenol y macroscópicas en agar PDA (anexo 3); éste ha sido bien descrito como biocontrolador de diferentes insectos. Valencia et al en el 2011<sup>60</sup>, realizaron un estudio para determinar la patogenicidad de siete aislados de este hongo frente a larvas del coleóptero *Strategus aleous*, encontrando que uno de estos ejercía un alto grado de patogenicidad sobre estas larvas (99%) en 16 días, Rodríguez et al, en el 2007 evaluaron el efecto de aislamientos de los hongos *Metarhizium* y *Beauveria* para el control de *Leucothyreus femoratus* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae), encontrando aislamientos de *Metarhizium* spp que causaron porcentajes de mortalidad superiores a 80% en condiciones de laboratorio<sup>61</sup>. Son varios los estudios que confirman la acción insecticida que posee este género fúngico, por lo que sería importante realizar pruebas de patogenicidad in vitro de esta nueva cepa en larvas de la familia Scarabaeidae y en otros insectos plaga.

La mortalidad acumulada de larvas de la familia Scarabaeidae ocasionada por los aislamientos bacterianos a través del tiempo, evidencia que en todos los tratamientos se presenta un incremento en el número de individuos muertos durante el período de evaluación (56 días); sin embargo, solo con 9 de estos se obtuvo mortalidad mayor al 50%. El número de larvas muertas fue mayor desde los 42 a los 56 días (figura 25), demostrando una acción lenta de cada uno de los aislados. El tratamiento con el que se obtuvo mejores resultados fue el C19 con una mortalidad del 75%, éste fue identificado como *Serratia proteamaculans*, con un porcentaje de homología del 99% con una cepa aislada de la rizosfera de una planta de tomate; esta especie bacteriana ha sido reportada ejerciendo actividad entomopatógena en larvas de *Costelytra zealandica*; junto con *Serratia entomophila* han sido bien estudiadas en control biológico, se caracterizan por causar la enfermedad ámbar, definida como una infección crónica del intestino larvario, la cual inicia con la ingestión de células bacterianas patógenas, posteriormente las larvas dejan de alimentarse después de 2 a 5 días y adquieren un color ámbar debido a la depuración

intestinal. Sin embargo, la muerte no ocurre hasta 1-3 meses después de la infección inicial<sup>62</sup>. Los tratamientos C30, C32 y C34 aislados de la misma larva pero de diferente sitio anatómico, fueron identificados como *Serratia proteamaculans*, con los cuales se obtuvo mortalidades de 52,7%, 61,1% y 69,4%, respectivamente, por lo que se confirma que la muerte de la larva fue ocasionada solo por esta especie bacteriana, aun así se puede observar que los signos que presentó esta larva no son acordes a los característicos de la enfermedad ámbar (figura 16 G-H); sin embargo, en los ensayos si se evidenció coloración ámbar en varios de los individuos; es posible que la patología esté relacionada con la especie del insecto al que ataca. Hurst et al, caracterizaron una cepa de *S. proteamaculans* llamada AGR96X, la cual causa mortalidad dentro de los 5 a 12 días de la ingestión e invade el hemocele del insecto<sup>63</sup>, el mecanismo de acción de esta cepa es diferente a las que causan la enfermedad ámbar. Por otro lado, es importante destacar que esta especie bacteriana hasta el momento solo ha sido descrita ocasionando enfermedad en larvas de *Costelytra zealandica*. En Colombia no existen reportes como entomopatógeno de larvas fitófagas, esto abre puertas a nuevos estudios de esta cepa en biocontrol de la familia Scarabaeidae; se resalta la importancia de evaluar su actividad entomopatógena por género y/o especie de estos insectos.

C10 identificado como *Serratia entomophila* causó una mortalidad del 44,4%, es este un porcentaje bajo en contraste con lo obtenido por Nuñez et al, quienes evaluaron una cepa mexicana de *S. entomophila* (Mor 4.1) frente a larvas de *Phyllophaga blanchardi*, *P. ravidia*, *P. trichodes*, *P. obsoleta*, y *Anomala donovani*, la cual presentó un 100% de mortalidad<sup>64</sup>; aun así, no se debe descartar la potencialidad de esta especie como entomopatógena, ya que los ensayos fueron probados en larvas de diferentes especies, por lo que puede no ser un biocontrolador de la familia Scarabaeidae en general, pero si puede llegar a ser un potencial insecticida sobre alguna especie específica.

El tratamiento C1, obtuvo una mortalidad del 58,3%, la secuencia del iniciador reverso permitió la identificación como *Pseudomonas koreensis* con

un porcentaje de homología del 99% con una cepa aislada de *Achicoria* roja. *P. koreensis* fue reportada y aislada por primera vez de un suelo agrícola coreano en el 2003<sup>65,66</sup>; esta especie ha sido informada como productora de biosurfactantes con capacidad biocontroladora contra los hongos *Phytophthora infestans* y *Pythium ultimum*<sup>65,67</sup>; una cepa de esta especie (CRS05-R5) se aisló de la rizosfera de un cultivo de arroz en la provincia de Heilongjiang, la cual mostró acción insecticida sobre el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* y antagónica contra *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, un fitopatógeno bacteriano que afecta diversos cultivos como la papa, el maíz, el sorgo, entre otros<sup>65,68</sup>; también se ha encontrado ejerciendo actividad fungicida contra *Fusarium* spp, *Alternaria* spp y *Bipolaris*<sup>69</sup>. Por otro lado, se ha informado como promotora de crecimiento vegetal (PGPR) y productora de enzimas como la nitrogenasa. Estos reportes se relacionan con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que se conoce su capacidad biocontroladora en un amplio rango de fitopatógenos como los hongos, bacterias y coleópteros, es posible que *P. koreensis* se encuentre ejerciendo en la naturaleza un control biológico en larvas de la familia Scarabaeidae. Es necesario realizar más estudios en larvas de esta familia con esta cepa bacteriana para así poder determinar su acción entomopatógena. Su estudio es de gran potencia a nivel industrial y agroambiental por su capacidad de producir biosurfactantes, estas sustancias tienen diferentes usos en la industria agroambiental, entre los que se destaca la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales, hidrocarburos y plaguicidas<sup>70</sup>, por lo que un producto comercial de esta especie es muy prometedor, ya que ejercería simultáneamente diversas funciones benéficas en los cultivos y suelos contaminados.

El tratamiento C13 causó una mortalidad del 58,3%, fue identificado como *Lysinibacillus* spp. con un porcentaje de identidad del 100%, su mayor representante es *L. sphaericus*, ha sido bien estudiado en biotecnología y bioprocesos por su maquinaria enzimática, la cual le confiere la cualidad de degradar compuestos como el petróleo y pesticidas como el glifosato, también ha sido descrita su actividad mosquitocida y antagónica frente a hongos fitopatógenos, se le ha dado uso en la industria agrícola como fertilizante al ser

promotor de crecimiento vegetal y solubilizar nutrientes. Naureen et al, aislaron e identificaron una cepa (ZA9) como *L. sphaericus* de la rizosfera de una planta de maíz, esta cepa produce una gran cantidad de indol-3-ácido acético (697 µg / ml); sideróforos (195.79 µg / ml), HCN y enzima hidrolítica, tiene la capacidad de solubilizar silicatos (Si), fosfatos (P) y potasio (K). La bacteria aumentó el vigor de las plántulas y la germinación de las semillas tratadas previamente y promovió la longitud del brote de las semillas de pepino y tomate en un experimento de invernadero. *L. sphaericus* ZA9 y su sobrenadante de cultivo libre de células mostraron un comportamiento antagónico variado contra *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus* sp., *Sclerotinia* sp., *Bipolaris spicifera* y *Trichophyton* sp<sup>71</sup>. Aunque son pocos los estudios en biocontrol en larvas de la familia Scarabaeidae, su actividad quitinolítica y sus enzimas lo convierten en un microorganismo prometedor en investigación, con diferentes usos en biotecnología y bioprocesos.

Los tratamientos C26 y C27 ocasionaron la muerte del 63,8% de las larvas, la secuencia del iniciador reverso permitió la identificación de los aislados como *Xenorhabdus* spp y *Bacillus mycoides*, respectivamente. *Xenorhabdus* spp es un género perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, ha sido asociada simbióticamente a los nemátodos *Steinernema* y *Heterorhabditis*<sup>72</sup>; por otro lado, ha sido estudiada la capacidad de producir sustancias antibióticas y su acción controladora frente a hongos fitopatógenos y mosquitos del género *Aedes* spp<sup>73</sup>. Aunque no ha sido reportada ocasionando enfermedad en larvas de Scarabaeidae por sí sola, es probable que tenga actividad insecticida frente a esta familia de coleópteros. Se puede evidenciar una posible simbiosis entre las bacterias entomopatógenas *Xenorhabdus* spp y *Bacillus* spp, ya que fueron aisladas de la hemolinfa de la misma larva y ambas causaron una mortalidad igual en los bioensayos; si se utilizan en conjunto puede llegar a tener una eficiencia mayor al 70%. Es necesario realizar más estudios para determinar la actividad insecticida de esta cepa.

*Bacillus mycoides* hace parte de los bacilos Gram positivos formadores de esporas, aunque no ha sido reportado en biocontrol de coleópteros, se ha

estudiado la capacidad de inducir resistencia sistémica en plantas<sup>74</sup> y su acción nematicida; Lou y colaboradores en el 2018, determinaron en un experimento en maceta la actividad nematicida de *B. mycooides* cepa R2 contra el nemátodo del nódulo de la raíz *Meloidogyne incognita*, encontrando una eficiencia alta del 90.94%. El compuesto nematicida fue aislado e identificado como estireno<sup>75</sup>. Se deben realizar más investigaciones con esta cepa en biocontrol de larvas de Scarabaeidae, de nemátodos y otros microorganismos fitopatógenos, para así comprobar el potencial de esta especie en el área agroambiental.

El inóculo C9 obtuvo una mortalidad del 44,1 %, se identificó como *Raoultella* spp, los iniciadores reverso y forward permitieron llegar hasta género con un 99% de identidad, a diferencia de C5 que se logró identificar como *Raoultella terrigena*, el alineamiento de la secuencia en BLAST con el iniciador reverso dio una homología del 100% con una cepa aislada de la raíz de la planta *Wasabia japonica*. Este tratamiento causó una mortalidad del 50% en las larvas de Scarabaeidae. *R. terrigena* es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, aunque no ha sido reportada en biocontrol, si se ha estudiado ampliamente como promotora de crecimiento vegetal, también se han realizado otras investigaciones donde se ha evaluado la capacidad de éste microorganismo de producir biohidrógeno<sup>76</sup>, generar productos de fermentación como alcoholes<sup>77</sup> y enzimas que hidrolizan polisacáridos como la sacarosa<sup>78</sup>. Su uso se limita por la capacidad de esta especie de causar enfermedad en el humano, ya que existen reportes de un caso de absceso subungueal<sup>79</sup> y otro de sepsis<sup>80</sup>.

C16 causó una mortalidad del 41,6%, fue identificado como *Comamonas testosteroni*, es una bacteria Gram negativa ambiental de distribución mundial que se encuentra en el agua, el suelo y las plantas, reconocido inusualmente como patógeno humano<sup>81</sup>, aun así, ya son varios los reportes de diferentes infecciones causadas por este microorganismo, como gastroenteritis<sup>82</sup>, bacteriemia<sup>83</sup>, neumonía asociada a ventilador<sup>84</sup> y apendicitis<sup>85</sup>. No existen investigaciones de esta bacteria en biocontrol, es posible que las pocas muertes ocasionadas en el ensayo sean producto de una

infección oportunista. Los estudios en biotecnología son pocos, todos direccionados a la degradación de metabolitos por parte de esta especie. La poca mortalidad ocasionada en los ensayos junto con la cualidad de patógeno descarta su uso en el área ambiental.

En el segundo ensayo se obtuvo con cuatro tratamientos mortalidades mayor al 50%, las cepas que mejor funcionaron fueron BFH9 y BFH6 (*Bacillus subtilis*), las cuales causaron un 70% de mortalidad, BFH7 y BFH8 (*Bacillus pumilus*) tuvieron acción insecticida sobre el 60% de las larvas. Las 11 cepas bacterianas utilizadas en el segundo ensayo fueron estudiadas por Ramírez et al<sup>86</sup>, quienes determinaron su actividad quitinolítica sobre huevos de *Fasciola hepatica*, encontrando que la mejor acción fue presentada por *Bacillus subtilis* (BFH5) y *Bacillus pumilus* (BFH2), seguido de *Bacillus sphaericus* (BFH4), BFH6 y BFH8, los cuales disminuyeron la concentración de huevos por gramo significativamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio no se correlacionan con los obtenidos por Ramírez, excepto por BFH6 y BFH8, sin embargo, es evidente que *B. subtilis* y *B. pumilus* poseen quitinasas más eficientes que *B. sphaericus*.

Son varios los estudios en biocontrol de *B. subtilis* y de sus enzimas quitinasas, Senol et al evaluaron las enzimas quitinasas purificadas de una cepa de *B. subtilis* TV-125 frente a cuatro agentes fúngicos, aunque todos los resultados fueron positivos, fue particularmente eficaz en *Fusarium culmorum*<sup>87</sup>. Por otro lado, Liu et al, realizaron un estudio donde determinaron el efecto de la quitinasa producida por *B. subtilis* SL-13 sobre *Rhizoctonia*, Las eficacias de control de la podredumbre de la *Rhizoctonia* SL-13 al tomate fueron 20.65% y 35.23% en el invernadero y el campo, respectivamente<sup>88</sup>. Saber et al evaluaron una cepa ATCC 11774 en condiciones de invernadero, la aplicación de una suspensión bacteriana de *B. subtilis* a  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> redujo significativamente la incidencia de la enfermedad del cancro del tallo a 22,3% y la rizoctoniasis a 30%<sup>89</sup>. Las enzimas quitinasas de los *Bacillus* spp suministrados por el cepario de la UCMC pueden también ser evaluadas frente

a hongos fitopatógenos, en búsqueda de cepas con mayor eficiencia frente a estos agentes fúngicos que son una problemática para los cultivadores.

*Bacillus pumilus* se ha utilizado como un agente de biocontrol para la protección de cultivos contra enfermedades fúngicas, que representa una alternativa a una variedad de fungicidas químicos utilizados en la actualidad. Ren et al., encontraron que la cepa *B. pumilus* tiene la capacidad de inhibir *in vitro* los patógenos *Cytospora chrysosperma*, *Phomopsis macrospora* y *Fusicoccum aesculi*. Gurav et al, aislaron dos cepas distintas RST25 y SUK25 del suelo industrial que procesa mariscos. En condiciones de inmersión, estas cepas RST25 y SUK25 produjeron actividades de quitinasa máximas a las 72 h ( $59.4 \pm 1.1 \text{ U ml}^{-1}$ ) y 96 h ( $51.7 \pm 0.8 \text{ U ml}^{-1}$ ), respectivamente. La quitinasa de *B. pumilus* RST25 mostró actividades antifúngicas *in vitro* contra *Fusarium solani* y *Aspergillus niger*<sup>90</sup>.

Finalmente los resultados de los ensayos tanto en porcentaje de mortalidad y número de decesos correlacionan con los hallazgos e identificaciones moleculares, dando confiabilidad a los datos recogidos durante los 56 días del experimento, queda por valorar un ensayo de mayor tiempo de exposición al patógeno y observación de los mismos; con los aislamientos realizados, abren nuevas posibilidades de investigaciones asociados a los tratamientos C1, C9, C13, C26 y C27, quienes por literatura han sido asociados a actividades aprovechables en biotecnología y bioprocesos industriales.

## 7. CONCLUSIONES

Existen diferentes factores que en forma natural disminuyen la población nativa de larvas como los hongos, bacterias y algunos parásitos, pero este control natural no es suficiente para lograr la disminución de esta plaga.

De las cepas obtenidas como posibles biocontroladores, en su mayoría fueron bacilos Gram negativos, para un total de 11 aislamientos. Solo 2 de ellos, fueron bacilos Gram positivos.

De la zona anatómica de la cual se obtuvo mayor cantidad de cepas fue del abdomen con 4 aislamientos, lo cual refuerza la noción que el mecanismo de infección de estas bacterias es principalmente por ingestión, pues las especies aisladas son encontradas frecuentemente en suelo, material del que las larvas se alimentan. En segundo lugar por la hemolinfa de la zona caudal y hemolinfa de la zona cefálica con 3 cepas cada uno, reforzando la idea de una septicemia cursada por la larva enferma; por último se encuentran la hemolinfa proveniente de la pata y estigma respiratorio como posibles focos de entrada.

Las cepas de *Bacillus* sp BHF 1, BHF2, BHF3, BHF4, BHF5, BHF6, BHF7, BHF8, BHF9, BHF10, BHF11 del cepario de la UCMC, fueron de fácil activación y mostraron adecuado crecimiento en los medios sólidos usados, además de su característico signo de hemólisis en agar sangre.

La identificación de los géneros de las larvas usadas en las pruebas de patogenicidad, fue posible gracias a las claves taxonómicas existentes, todo esto con el fin de analizar la distribución geográfica de cada género así como de la susceptibilidad por género a cada cepa usada en los bioensayos.

Los tratamientos C13; C19; C24; C26; C27; identificados como *Lysinibacillus* spp, *Serratia proteamaculans*, *Bacillus mycoides* y *Xenorhabdus* spp, respectivamente, mostraron un porcentaje mayor o igual al 50% de mortalidad, lo cual los hace una buena alternativa como control del complejo chisa.

El tratamiento que mejor eficiencia tuvo en los bioensayos y que resulta ser una buena alternativa de control de larvas de la familia Scarabaeidae fue C19

identificado como *Serratia proteamaculans* con un porcentaje de mortalidad del 75%.

Los tratamientos BHF6, BHF7, BHF8 y BHF9 presentaron durante el ensayo mayor acción quitinolítica provocando muerte prematura de las larvas con un porcentaje de mortalidad de 70%; 60%; 60%; 70% para cada una respectivamente, el ensayo BHF 3, demostró que no posee ninguna actividad contra las larvas de la familia Scarabaeidae.

Los métodos moleculares resultaron ser idóneos para la identificación de las cepas hasta especie, debido a que las pruebas microbiológicas convencionales permitieron llegar solamente hasta los géneros *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., y *Serratia* sp. en porcentajes de identificación bajo, respecto al proporcionado por la secuenciación mediante método Sanger

## RECOMENDACIONES

- Desarrollar nuevas investigaciones sobre el manejo, alimentación y condiciones in vitro de larvas del orden Coleóptera para llegar a un protocolo de procesos aplicados a bioensayos efectivos con ese modelo experimental
- Desarrollar nuevas investigaciones con las cepas obtenidas de este ensayo, aplicados a otras plagas de importancia agrícola
- Realizar ensayos de 2 o más cepas en conjunto para medir su capacidad infectiva buscando así la potenciación de la mortalidad del coleóptero
- Llevar a cabo procesos de investigación, con las cepas obtenidas en este estudio, buscando proteínas y genes asociados a las patologías descritas en este trabajo, con el fin de potenciar los resultados obtenidos
- Desarrollar procesos de investigación que contribuyan a la búsqueda de nuevos usos de las cepas obtenidas debido a que en la literatura se encuentran otros usos biotecnológicos de algunos géneros encontrados en este estudio.

## Referencias bibliográficas

1. Lizarralde R. Informe de rendición pública de cuentas gestión 2013 - 2014 [Internet]. Minagricultura.gov.co. 2014 [citado 25 abr 2017]. Disponible en:  
[http://www.minagricultura.gov.co/Documents/Informe\\_2013\\_2014\\_Final.pdf#search=B%C3%BAsqueda%2E%2E%2Eproductos%20agr%C3%A Dcolas%20de%20mayor%20producci%C3%B3n](http://www.minagricultura.gov.co/Documents/Informe_2013_2014_Final.pdf#search=B%C3%BAsqueda%2E%2E%2Eproductos%20agr%C3%A Dcolas%20de%20mayor%20producci%C3%B3n)
2. Beneo O. Manual técnico Achicoria industrial temporada 2015-2016 [Internet]. Beneo-Orafti. 2016 [citado 25 abr 2017]. Disponible en:  
<http://www.orafti.cl/download/manualtecnicocultivo2015-2016.pdf>
3. Hernández VV, Nuñez VM, Ruiz VJ, Najera RM, Villalobos FJ. Uso de entomopatógenos. [Internet] 2015 [citado 1 jul 2018]. Disponible en:  
[http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/biblio\\_sin\\_paredes/fac\\_agri/2015/plag\\_su/cap/09.pdf](http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/biblio_sin_paredes/fac_agri/2015/plag_su/cap/09.pdf)
4. Serna PL. Reconocimiento de especies del complejo chisa (Coleóptera-Melolonthidae) asociados a los cultivos de yuca y pasto en el municipio de Pereira y alrededores. [Internet] 2004 [citado 3 mar 2017] Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos\\_ciat/ipm/pdfs/tesis\\_serna.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/tesis_serna.pdf)
5. Glare T, Jurat-Fuentes J, O'Callaghan M. Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria - Microbial Control of Insect and Mite Pests - Chapter 4 [Internet]. Sciencedirect.com. 2017 [citado 22 abr 2017]. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035276000044>
6. Yamamoto T, Powel GK. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: Recent advances in understanding its insecticidal activity. En: Kim L, editor. Advanced engineered pesticides. [Internet]. 1st ed. New York: Marcel Dekker. 1993. [citado 22 abr 2017]. Disponible en:  
<https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=5dvZtLN1bfcC&oi=fnd&pg=PA3&dq=beegle+y+yamamoto+bacillus+thuringiensis&ots=1RWwhv->

VF&sig=g8sJmMGptFJXT5oQZ4TLh642M5g#v=onepage&q=beegle%20y%20yamamoto%20bacillus%20thuringiensis&f=false

7. Suzuki N, Hori H, Tachibana M, Asano S. *Bacillus thuringiensis* strain Buibui for control of cupreous chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in turfgrass and sweet potato. *Biol Control*. [Internet] 1994 (citado 17 feb 2018); 4:361-365. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964484710450>
8. Asano S, Yamashita C, Lizuka T, Takeushi K, Yamanaka S, Cerf D et al. A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel cry8 gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) [Internet]. *Biol Control*. 2003 [citado 23 ago 2018]. 28(2):191-196 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964403000604>
9. Koppenhöfer AM, Wilson M, Brown I, Kaya HK, Gaugler R. Biological Control Agents for White Grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in Anticipation of the Establishment of the Japanese Beetle in California. *Econ. Entomol.* [Internet] 2000 (citado 17 feb 2018); 93(1):71-80 Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0022-0493-93.1.71>
10. Sezen K, Demir I, Kati H, Demirbag Z. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). *J Microbiol.* [Internet] 2005 [citado 17 feb 2018]; 43(5):463-468. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/16273040>
11. Sezen K, Demir I, Kati H, Demirbag Z. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *New Zeal J Crop Hort Sci.* [Internet] 2007; [citado 17 feb 2018]; 35(1): 79-85. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01140670709510171>
12. Poprawski T, Yule W. Bacterial pathogens of *Phyllophaga* spp. (Col., Scarabaeidae) in southern Quebec, Canada. *J Appl Entomol.* [Internet]

1990; [citado 23 ago 2018] 109(1- 5):414-422. Disponible en:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.1990.tb00071.x>

13. Selvakumar G, Suchil S, Stanley J, Mohan M, Deol A, Rai D et al. *Brevibacterium frigoritolerans* a novel entomopathogen of *Anomala dimidiata* and *Holotrichia longipennis* (Scarabaeidae: Coleoptera). *Biocontrol Sci Technol*. [Internet]. 2011 [citado 23 ago 2018]. 21(7):821-827 Disponible en:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583157.2011.586021>
14. O' Callaghan M, Jackson T. Isolation and enumeration of *Serratia entomophila*—a bacterial pathogen of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica* [Internet]. *J Apl Microbiol*. 1993 [citado 23 ago 2018]; 75(4):307-314. Disponible en:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02781.x>
15. Hurst M, Glare T, Jackson T. Cloning *Serratia entomophila* Antifeeding Genes—a Putative Defective Prophage Active against the Grass Grub *Costelytra zealandica*. [Internet]. *J Bacteriol*. 2004 [citado 23 Ago 2018]; 186(15):5116-5128. Disponible en:  
<https://jb.asm.org/content/186/15/5116>
16. Valdez NM, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez GR, Lina L, et al. Identification of a Putative Mexican Strain of *Serratia entomophila* Pathogenic against Root-Damaging Larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). [Internet]. *J Bacteriol*. 2007 [citado 23 Ago 2018]; 74(3): 802–810 Disponible en: <https://jb.asm.org/content/186/15/5116>
17. Selvakumar G, Mohan M, Sushil SN, Kundu S, Bhatt JC, Gupta HS. Characterization and phylogenetic analysis of an entomopathogenic *Bacillus cereus* strain WGPSB-2 (MTCC 7182) isolated from white grub, *Anomala dimidiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Sci Technol*. [Internet] 2007 [citado 17 feb 2018]; 17(5): 525-

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150701311663>

18. Consolo VF, Mucci V, Salerno GL, Berón CM. Pathogenicity of bacterial isolates to *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae), *Biocontrol Sci Technol*. [Internet] 2010 [citado 17 feb 2018]; 20(5):475-482. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150903580537>
19. Dingman D. Geographical distribution of milky disease bacteria in the eastern United States based on phylogeny. *J Invertebr Pathol*. [Internet] 2008. [citado 22 abr 2017]; 97(2):171-181. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201107001929>
20. Harrison H, Patel R, Yousten A. *Paenibacillus* Associated with Milky Disease in Central and South American Scarabs. *J Invertebr Pathol*. [Internet]. 2000 [citado 22 abr 2017]; 76(3):169-175. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201100949693>
21. Stahly D, Klein M. Problems with in vitro production of spores of *Bacillus popilliae* for use in biological control of the Japanese beetle. *J Invertebr Pathol*. [Internet]. 1992 [citado 22 abr 2017]; 60(3):283-291. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022201192900102>
22. Haynes W, Rhodes L. Spore Formation by *Bacillus popilliae* in Liquid Medium Containing Activated Carbon. *J Bacteriol*. [Internet]. 1966 [citado 22 abr 2017]; 91(6):2270-2274. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316205/pdf/jbacter00423-0192.pdf>
23. Cappaert D, Smitley D. Parasitoids and Pathogens of Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in Southern Michigan. *Environ Entomol*. [Internet]. 2002 [citado 22 abr 2017]; 31(3):573-580 Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0046-225X-31.3.573>

24. Petty B, Johnson D, Steinkraus D. Survey of pathogens and parasitoids of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in northwest Arkansas. *J Invertebr Pathol.* [Internet]. 2012. [citado 22 abr 2017]; 111(1):56-59. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201112001656>
25. Díaz M. Respuesta de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) y *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Coleóptera: Scarabaeidae) a *Bacillus popilliae* Dutky. [Internet]. Repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr. 1992 [citado 22 abr 2017]. Disponible en: [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5509/Respuesta\\_de\\_Phyllophaga\\_menetriesi.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5509/Respuesta_de_Phyllophaga_menetriesi.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
26. Lucero A, Villamil L, Cultid L. Efecto de *Steinernema* sp. sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Scarabaeidae) en condiciones de laboratorio e invernadero. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* [Internet] 2006 [citado 22 abr 2017]; 7(1):66-69. Disponible: <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/62/62>
27. Vásquez N, Sánchez G. Propuesta de manejo integrado de las chisas (Coleoptera, Melolonthidae) en el cultivo de arracacha. [Internet] 2014 [citado 22 abr 2017]. Disponible en: [http://nkxms1019hx1xmtstxk3k9sko.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2014/09/10\\_Manejo\\_chisas.pdf](http://nkxms1019hx1xmtstxk3k9sko.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2014/09/10_Manejo_chisas.pdf)
28. Melo GJ. Desarrollo histórico del campo colombiano | [banrepcultural.org](http://banrepcultural.org) [Internet]. Banrepcultural.org. 1995 [citado 14 ago 2017]. Disponible en: <http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/historia/colhoy/colo9.htm>
29. Colombia siembra [Internet]. Minagricultura.gov.co. 2015 [citado 20 ago 2017]. Disponible en: [https://www.minagricultura.gov.co/Colombia-Siembra/Paginas/default.aspx#acerca\\_de](https://www.minagricultura.gov.co/Colombia-Siembra/Paginas/default.aspx#acerca_de)
30. Martínez RJ, Freire DE, Cárdenas CM, Acevedo AL, Buitrago HG, Valenzuela GR. Tercer censo nacional agropecuario [Internet]. 1era ed. Bogotá D.C. 2016 [citado 20 ago 2017]. Disponible en:

<http://www.dane.gov.co/files/images/foros/foro-de-entrega-de-resultados-y-cierre-3-censo-nacional>

31. Betancur Alarcón L. Colombia, el país más desigual de A. Latina en el reparto de la tierra [Internet]. El Tiempo. 2016 [citado 24 ago 2017]. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/vida/ciencia/concentracion-de-la-tierra-en-america-latina-oxfam-52376>
32. Ongley ED. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. 1st ed. Roma, Italia: FAO [Internet] 1997. [citado 24 ago 2017]. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021109/LUCHACONTRALACONTAMINACION.pdf>
33. Ramírez JA, Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. INVIMA [Internet] 2001. [citado 13 sep 2017]; 4(2):67-75 Disponible en: <https://www.invima.gov.co/images/pdf/intranet/Dir%20operaciones/reviaw%20plaguicidas.pdf>
34. Guía para la gestión ambiental responsable de los plaguicidas químicos de uso agrícola en Colombia [Internet]. Reduciendo el escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe. 2017 [citado 13 sep 2017]. Disponible en: <http://cep.unep.org/repcar/capacitacion-y-concienciacion/andi/publicaciones-andi/Guia%20ambiental%20plaguicidas.pdf>
35. Viñuela E, Jacas J. Enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas. [Internet] MAPAMA. 1993 [citado 19 ago 2018] Disponible en: [www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1993\\_02.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1993_02.pdf)
36. Lawrence JF, Newton AF. Families and subfamilies of Coleoptera (with selectes genera, notes, references and data on family-group names). En: Palaluk, Sllipinski, editores. Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson. Muzeum i Instytut Zoologii PAN. [Internet] 1995. [citado 18 sep 2017] 779-1006 Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/281999955\\_Families\\_and\\_subfamilies\\_of\\_Coleoptera\\_with\\_selected\\_genera\\_notes\\_references\\_and\\_data\\_on\\_family-group\\_names](https://www.researchgate.net/publication/281999955_Families_and_subfamilies_of_Coleoptera_with_selected_genera_notes_references_and_data_on_family-group_names)

37. Londoño M, Perez M. Reconocimiento de enemigos naturales de la chisa o mojoyoy (Coleóptera: Sacrabaeidae) en el Oriente Antioqueño. Rev Colomb Entomol. [Internet] 1994 [citado 17 sep 2017]; 20(3): 199-206.
38. Villegas UN. Reconocimiento de especies del complejo chisa (Coleóptera: Melolonthidae) asociados al cultivo de cebolla y pasto en la localidad de la Florida, Risaralda. [Internet] 2012 [citado 17 sep 2017] Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos\\_ciat/ipm/pdfs/tesis\\_villegas.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/tesis_villegas.pdf)
39. Serna PL. Reconocimiento de especies del complejo chisa (Coleóptera: Melolonthidae) asociados a los cultivos de yuca y pasto en el municipio de Pereira y alrededores [Internet] 2004 [citado 18 sep 2017] Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos\\_ciat/ipm/pdfs/tesis\\_serna.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/tesis_serna.pdf)
40. Gutiérrez N. Gallina ciega: plaga que afecta las raíces de las plantas. Jalisco.gob.mx. [Internet] 2014 [actualizado 20 oct 2014; citado 18 sep 2017] Disponible en: <https://seder.jalisco.gob.mx/fomento-agricola-hortofruticola-e-inocuidad/613>
41. Oliveira LJ, Roggia J, Salvadori JR, Ávila CJ, Fernandes PM, Oliveira SM. Insetos que atacan raíces e nódulos da soja. En: Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Hoffman CC, Correa FB, Moscardi F, editores. Embrapa. [Internet] 2012. [citado 19 ago 2018]; 1ª ed 75-144. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/263734594\\_Insetos\\_que\\_atacam\\_raizes\\_e\\_nodulos\\_da\\_soja](https://www.researchgate.net/publication/263734594_Insetos_que_atacam_raizes_e_nodulos_da_soja)
42. Palacio V.M. Determinación de las especies de Astaena (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas a cultivos en dos Altiplanos Colombianos. [Internet] 2010. [citado 12 sep 2017] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2624/1/39356203.2010.pdf>

43. Yepes Y. Descripción de estados inmaduros e importancia agrícola de *Clavipalpus Ursinus* Bl. (Coleoptera: Melolonthidae) en los Andes Colombianos. Rev. Agricul Trop. [Internet] 2011. [citado 12 sep 2017]; 34(3,4):67-88. Disponible en: <https://manualzz.com/doc/5512223/yepes-y-et-al-larva-de-clavipalpus-ursinus-bl>
44. Trabanino R. Guía para el manejo Integrado de plagas invertebradas en Honduras. *Phyllophaga* spp. y otros géneros Gallina Ciega [Internet] 1993. [citado 13 sep 2017]; 82-84 Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4004/3/02.pdf>
45. Burgos HH, Mazariego HG, Sánchez QO. Patogenicidad de hongos nativos en el control de gallina ciega (Coleóptera; Scarabaeidae) bajo condiciones de laboratorio. [Internet] 2012 [citado 13 sep 2017] Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/1538/1/13100003.pdf>
46. Rodríguez MA, Guillén SC, Valle RH, Uva MV, Segura MR, Laprade CS, et al. Aspectos a considerar del control biológico. [Internet] 2010. [citado 18 sep 2017]. Disponible en: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/control-biologica>
47. abcAgro.com [Internet] Chile: Infoagro.com [citado 24 sep 2017] Disponible en: [http://www.abcagro.com/agriculturas\\_alternativas/enemigosnaturales3.asp](http://www.abcagro.com/agriculturas_alternativas/enemigosnaturales3.asp)
48. Hidalgo E. Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. [Internet] 2001. [citado 12 sep 2017] Disponible en: <http://www.sidalc.net/REPDOC/A1753E/A1753E.PDF>
49. Cano E, Carballo M, Chaput P, Fernández O, Gonzales L, Gruber a, et al. Control biológico de plagas agrícolas. 1ª ed. Managua, Nicaragua. CATIE [Internet] 2004 Disponible en: <https://books.google.com.co/books?isbn=9992403160>

50. De Vos P. Garrity GM. Jones D. Krieg NR. Ludwig W. Rainey FA. et al. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Paenibacilliae. 2009. Second Edition. Vol 3.
51. Secuenciación de ADN [Internet]. Khan Academy. [citado 5 Jun 2018].  
Disponibile en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>
52. Garrigues F. Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación [Internet]. Genética Médica Blog. 2017 [citado 10 Jun 2018]. Disponible en: <https://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>
53. ABC. Situación geográfica de Pasca. [Internet] 2014. [citado 5 jun 2018]  
Disponibile en: <http://pueblomuisca.wixsite.com/pascaeduca/situacin-geografica>
54. Sánchez L., Corrales L. Evaluación de la congelación de especies autóctonas bacterianas. NOVA. [Internet] 2005. [citado 2 jun 2018]; 3(4):22-29. Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/42>
55. Jackson T, Glare T, Klein M. Use of pathogens management. Bulletin of entomological research; 1992. 1st ed.
56. López GM, García AS, Amat GG. Escarabajos Fitófagos (Coleoptera: Scarabaeidae "Pleurosticti") de Los Andes Orientales de Colombia (Departamentos de Santander, Boyacá y Cundinamarca). [Internet] 2015 [citado 26 oct 2018]; 19(2):322-358. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v19n2/v19n2a20.pdf>
57. Stechauner RR, Pardo LL. Redescrición de inmaduros, ciclo de vida, Distribución e Importancia Agrícola de *Cyclocephala Lunulata* Burmeister (Coleóptera: Melolonthidae: Dynastinae) en Colombia. Scielo. [Internet] 2010 [citado 26 oct 2018]; 14(1):203-220. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v14n1/v14n1a12.pdf>
58. Palacio VM. Determinación de las especies de *Astaena* (Coleóptera:

Melolonthidae) asociadas a cultivos en dos altiplanos colombianos [Internet] 2010 [citado 27 oct 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/2624/1/39356203.2010.pdf>

59. Villegas UN. Reconocimiento de especies del complejo chisa (Coleóptera: Melolonthidae) asociados al cultivo de cebolla y pasto en la localidad de la Florida, Risaralda. [Internet] 2004 [citado 27 oct 2018]. Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos\\_ciat/ipm/pdfs/tesis\\_villegas.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/tesis_villegas.pdf)

60. Valencia CC, Pérez SM, Aldana RS, Mesa E, Gomes H. Patogenicidad de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* sobre larvas de *Strategus aloeus* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), en condiciones de laboratorio [Internet] 2011 [citado 27 oct 2018]; 32(4): 30-40. Disponible en: <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/download/10780/10771/>

61. Rodríguez F, Aldana R, Cayón G. Evaluación de hongos entomopatógenos para el control de larvas de *Leucothyreus femoratus* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae) defoliador de palma de aceite. Ceniavances. [Internet] 2007. [citado 27 oct 2018]; 146: 1-4. Disponible en: <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/ceniavances/article/view/10320/10310>

62. Jackson TA, Huger AM, Glare TR. Pathology of Amber Disease in the New Zealand Grass Grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) J. Invertebr Pathol. [Internet] 1963 [citado 28 oct 2018]; 61(2):123-130. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201183710244>

63. Hurst MR, Beattie A, Jones SA, Laugraud A, VanKoten C, Harper L. *Serratia proteamaculans* Strain AGR96X Encodes an Antifeeding Prophage (Tailocin) with Activity against Grass Grub (*Costelytra giveni*) and Manuka Beetle (*Pyronota* Species) Larvae. Appl Environ Microbiol. [Internet] 2018 [citado 28 oct 2018]; 1(84):10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29549100>

64. Nuñez VM, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez GM, Rodríguez Z, et al. Identification of a Putative Mexican Strain of *Serratia entomophila* pathogenic against Root-Damaging Larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Appl Environ Microbiol*. [Internet] 2008 [citado 28 oct 2018]; 74(3):802-810. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/74/3/802.short>
65. Lin H, Hu S, Liu R, Chen P, Ge C, Zhu B, Guo L. Genome Sequence of *Pseudomonas koreensis* CRS05-R5, an Antagonistic Bacterium Isolated from Rice Paddy Field. *Front Microbiol*. [Internet] 2016. [citado 28 oct 2018]; 7:1756. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099245/>
66. Kwon S. W., Kim J. S., Park I. C., Yoon S. H., Park D. H., Lim C. K., et al. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. [Internet] 2003. [citado 29 oct 2018]; 53: 21–27
67. Hultberg M, Bengtsson T, Liljeroth E. Late blight on potato is suppressed by the biosurfactant-producing strain *Pseudomonas koreensis* 2.74 and its biosurfactant. *Biocontrol* [Internet] 2010. [citado 29 oct 2018]; 55: 543–550.
68. Liu H., Yang C. L., Ge M. Y., Ibrahim M., Li B., Zhao W. J., et al. Regulatory role of *tetR* gene in a novel gene cluster of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* RS-1 under oxidative stress. *Front. Microbiol*. [Internet] 2004. [citado 29 oct 2018]; 5:547
69. Rafikova GF, Korshunova TY, Minnebaev LF, Chetverikov SP, Loginov ON. A new bacterial strain, *Pseudomonas koreensis* IB-4, as a promising agent for plant pathogen biological control. *Microbiology*. [Internet] 2016. [citado 29 oct 2018]; 85(3):333-341. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0026261716030115>
70. De la Rosa CN, Sánchez SE, Ortiz HM. Biosurfactantes y su papel en biorremediación de suelos. [Internet] 2014 [citado 17 oct 2018]; 5(1):47-104

67. Disponible en:  
<https://www.globalsciencejournals.com/content/pdf/10.7603%2Fs40682-014-0004-8.pdf>
71. Nauren Z, Rehman N, Hussain H, Hussain J, Gilani SA, Al Housni SK, et al. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi [Internet] 2017 [citado 17 oct 2018]; 8:1477 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5563071/>
72. Guerra SB, Chacón JG, Muñoz FJ, Caicedo AM. Evaluación de la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. nativos en Colombia. [Internet] 2014. [citado 19 oct 2018] 16(1):111-118. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/44277>
73. Nicholls Estrada C. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico [Internet]. Wp.globalalternatives.org. 2008 [citado 6 Jul 2018]. Disponible en: <http://wp.globalalternatives.org/wp-content/uploads/2014/01/Control-biologico-de-insectos-un-enfoque-agroecologico.pdf>
74. Cuervo Lozada J. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *Bacillus* spp COMO FIJADORES BIOLÓGICOS DE NITRÓGENO Y SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EN DOS MUESTRAS DE BIOFERTILIZANTES COMERCIALES [Internet]. Javeriana.edu.co. 2010 [citado 9 Jun 2018]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
75. Sidar WI, Ghoneem KM, Al-Askar AA, Rashad YM, Ali AA, Rashad EM. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato. [Internet] 2015 [citado 28 oct 2018]; 66(4):436-448. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26616375>
76. Zieliński M, Korzeniewska E, Filipkowska Z, Dębowski M, Harnisz M, Kwiatkowski R. Biohydrogen production at low load of organic matter by psychrophilic bacteria. *Energy* [Internet] 2017 [citado 13 oct 2018];

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360544217308769>

77. Rodríguez A, Ripoll V, Santos VE, Gómez E, García OF. Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: oxygen transfer and uptake rates. *J Chem Technol Biotechnol*. [Internet] 2017 [citado 13 oct 2018]; 92(6): 1266-1275. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/308944183\\_effect\\_of\\_fluid\\_dynamic\\_conditions\\_on\\_23-butanediol\\_production\\_by\\_raoultella\\_terrigena\\_in\\_sbtr\\_oxygen\\_transfer\\_and\\_uptake\\_rates\\_effect\\_of\\_fluid\\_dynamic\\_conditions\\_in\\_stbr](https://www.researchgate.net/publication/308944183_effect_of_fluid_dynamic_conditions_on_23-butanediol_production_by_raoultella_terrigena_in_sbtr_oxygen_transfer_and_uptake_rates_effect_of_fluid_dynamic_conditions_in_stbr)
78. Ripoll Morales V. Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerina (residuo de biodiésel) [Internet]. *Eprints.ucm.es*. 2017 [citado 7 Jun 2018]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/43536/1/T38996.pdf>
79. Wang Y, Jiang X, Xu Z, Ying C, Yu W, Xiao Y. Identification of *Raoultella terrigena* as a Rare Causative Agent of Subungual Abscess Based on 16S rRNA and Housekeeping Gene Sequencing. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. [Internet] 2016 [citado 13 oct 2018]; (3):1-4. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/303890985\\_Identification\\_of\\_Raoultella\\_terrigena\\_as\\_a\\_Rare\\_Causative\\_Agent\\_of\\_Subungual\\_Abscess\\_Based\\_on\\_16S\\_rRNA\\_and\\_Housekeeping\\_Gene\\_Sequencing](https://www.researchgate.net/publication/303890985_Identification_of_Raoultella_terrigena_as_a_Rare_Causative_Agent_of_Subungual_Abscess_Based_on_16S_rRNA_and_Housekeeping_Gene_Sequencing)
80. Muhammad SM, Morgan M. Sepsis caused by *Raoultella terrigena*. [Internet] 2011 [citado 13 oct 2018]; (6): 49. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127491/>
81. Duran A. *Comamonas testosteroni* endocarditis in Turkey: A case report and review of the literature [Internet]. *Sifa Medical Journal*. 2015 [citado 5 May 2018]. Disponible en: <http://www.imjsu.org/article.asp?issn=2148-7731;year=2015;volume=2;issue=2;spage=44;epage=47;aulast=Duran>
82. Farooq S, Farooq R, Nahvi N. *Comamonas testosteroni*: Is It Still a Rare Human Pathogen? [Internet] 2017 [citado 13 oct 2018]; 11:42-47. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Pdf/452197>

83. JoEllyn MA, Gary LS. *Comamonas testosteroni* Bacteremia: A Case Report and Review of the Literature. [Internet] 2007. [citado 13 oct 2018]; 15(4):272-273. Disponible en: [https://journals.lww.com/infectdis/fulltext/2007/07000/comamonas\\_testosteroni\\_bacteremia\\_a\\_case\\_report.15.aspx](https://journals.lww.com/infectdis/fulltext/2007/07000/comamonas_testosteroni_bacteremia_a_case_report.15.aspx)
84. Lima LI, Castañón GJ, Gorordo DL. Neumonía asociada a ventilador por *Comamonas testosteroni*. [Internet] 2016 [citado 13 oct 2018]; 83(1 y 2): 56-57. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2016/ju161-2i.pdf>
85. Khalki H, Deham T, Taghouti A, Yahyaoui G, Mahmoud M. Appendicite à *Comamonas testosteroni*. [Internet] 2016 [citado 13 oct 2018]; 46(3):168-170. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0399077X16000020>
86. Ramírez ML, Sainea LM. Evaluación de *Bacillus* spp como posible controlador biológico de *Fasciola hepática* en ovinos. 2018. [citado 14 oct 2018].
87. Senol M, Nadaroglu H, Dikbas N, Kotan R. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. [Internet] 2014 [citado 28 oct 2018]; 12:13-35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25112904>
88. Liu Y, Tao J, Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. [Internet] 2011 [citado 28 oct 2018]; 19(1):128-134. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1004954109601889>
89. Saber WI, Ghoneem KM, Al-Askar AA, Rashad YM, Ali AA, Rashad EM. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of Rhizoctonia diseases of potato. [Internet] 2015 [citado 28 oct 2018]; 66(4):436-448. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26616375>

90. Gurav R, Tang J, Jadhav J. Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RS25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phyto-pathogens [Internet] 2017 [citado 29 oct 2018]; 125:228-234. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830517307886>

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1.**

#### **PROTOCOLO KIT DE PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO WIZARD**

**Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas.**

##### **Pellet de células**

Centrifugar 1 ml de cultivo previamente incubado toda la noche por 2 minutos a 13.000-16.000 x *g*. Descartar sobrenadante.

##### **A. Para bacterias Gram positivas**

1. Suspender las células en 480ul de EDTA 50Mm.
2. Adicionar enzimas líticas (120 µl) (lisozima y/o lisostafina).
3. Incuba a 37°C por 30-60 minutos.
4. Centrifugar por 2 minutos a 13.000-16.000 x *g* y descartar sobrenadante.
5. Ir al paso 1, **lisis celular**.

##### **B. Para bacterias Gram negativas**

Ir al paso 1, **lisis celular**.

##### **Lisis celular**

1. Adicionar 600 µl de solución de lisis nuclear. Pipetear suavemente para mezclar.
2. Incubar por 5 minutos a 80°C, luego enfríe a temperatura ambiente.
3. Adicionar 3 µl de solución RNasa. Mezclar, incubar a 37°C por 15-60 minutos, luego enfríe a temperatura ambiente.

##### **Precipitación de proteínas**

4. Adicionar 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Vortex.

5. Incubar en hielo por 5 minutos.
6. Centrifugar a 13.000-16.000 x *g* por 3 minutos.

### **Precipitación y rehidratación del ADN**

7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar.
8. Centrifugar por 2 minutos a 13.000-16.000 x *g*.
9. Adicionar 600 µl de etanol 70% a temperatura ambiente. Mezclar.
10. Centrifugar por 2 minutos a 13.000-16.000 x *g*.
11. Aspirar el etanol y dejar secar al aire el pellet por 10 a 15 minutos.
12. Rehidratar el pellet de ADN en 100 µl de solución de rehidratación por 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.

## ANEXO 2.

### RÁSTER DE LARVAS DE SCARABAEIDAE IDENTIFICADAS POR SUBFAMILIA Y TRIBU.

		
<p>Ráster de Anomalini: abertura anal transversal, palidia paralela, cada palidium con 14-15 palis, séptula bien definida, setas gruesas y delgadas cerca a la abertura anal. Larva enferma con zona caudal blanquecina.</p>	<p>Ráster de Anomalini: abertura anal transversal, palidia paralela, cada palidium con 14-15 palis, séptula bien definida, setas gruesas y delgadas cerca a la abertura anal. Larva enferma grisácea a violácea con moretones en el cuerpo.</p>	<p>Ráster de Anomalini: Abertura anal horizontal, palidia divergente, palidium paralelos, septula bien definida, campus setoso con setas cortas y gruesas en el entorno de la palidia, setas largas en la periferia, ráster de un color metalizado.</p>
		
<p>Ráster de Sericini (Astaena spp): abertura anal poco visible, única palidia transversal, sin septula, entorno de la abertura anal densamente setoso con setas gruesas cerca de la palidia, setas delgadas de punta fina en la periferia.</p>	<p>Ráster de Macroductylini: abertura anal en Y, par de palidium fuertemente curvados, cada uno con 15-18 palis, septula ancha, campus con setas gruesas largas y cortas.</p>	<p>Ráster de Melolonthini: abertura anal en Y, palidia paralela, cada palidium con 16-18 palis, septula definida, campus con setas gruesas cortas alrededor de la palidia, setas más largas y finas en la periferia.</p>

**ANEXO 3.**

**IDENTIFICACIÓN HONGO *METARHIZIUM* spp.**



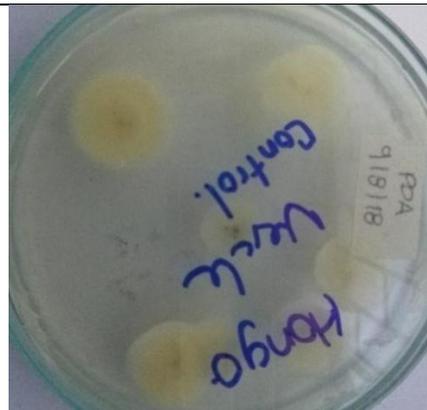
*Metarhizium* spp joven parasitando una larva de III instar.



*Metarhizium* spp con pigmentación parasitando una larva de III instar.



Colonias de *Metarhizium* spp en agar PDA, cultivo joven, anverso.



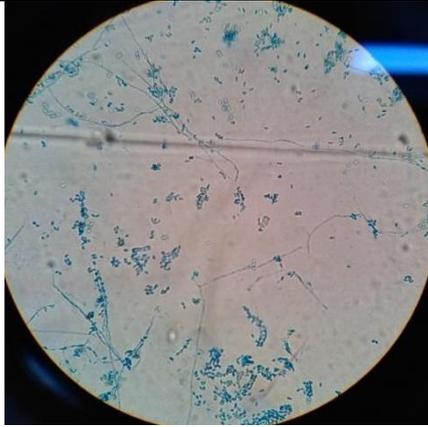
Colonia de *Metarhizium* spp en agar PDA, cultivo joven, reverso.



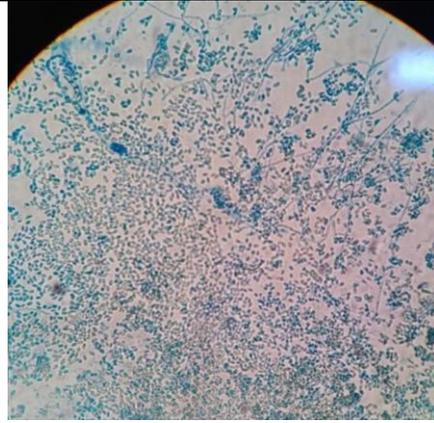
Colonias de *Metarhizium* spp en agar PDA, cultivo viejo, anverso



Colonias de *Metarhizium* spp en agar PDA, cultivo viejo, reverso



Microscopía de *Metarhizium* spp  
en azul de lactofenol en objetivo  
40 X, hifas hialinas,



Microscopía de *Metarhizium* spp  
en azul de lactofenol en objetivo  
40 X, conidias sueltas

#### ANEXO 4.

### SECUENCIAS OBTENIDAS POR MÉTODO SANGER DE LOS AISLADOS BACTERIANOS UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

>C1-16S-F

```
CTAaCACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTTCAGCGGGCGGACGCGG
TGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAAT
ACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGC
CTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGAAG
AAGGTCCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGTTGTAGATTAATACTCTG
CAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGctcacca
```

>C1-16S-R

```
TGGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCT
TAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC
TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTT
CGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTC
TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGA
GGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCC
TTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACC
TTCGGGAGGACGGTTACCACCGG
```

>C5-16S-F

```
CTAACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAAGAGCTTGCTCTTTcGGGTGACGAGCGGGC
GACGaGGaTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGG
TAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATC
AGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT
GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCaGTTAAGGTT
AATAACCTTGGCGATTGACGTTACTCGgCAGAAGAAgCAgCCGGCgTAACTCCGTGCCA
GCAGCgCGCGGCAATACGgGAGGGTtGCaAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGGCGTAAAG
GCGCACGCAGGCGGTctttgatcagagtcgggatggtgtaaataccccccggtgctcaac
Ctggggaaactgcggttcgaaactgggagggtagaggtt
```

>C5-16S-R

```
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
CTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCACGAGC
GCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGA
TAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA
```

CACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATA  
AAGTATGTCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCCGGAATCGCTAG  
TAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC  
ACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACCA  
C

>C9-16S-F

CTACACATGCAAGTTCGAGCGGTAGCACAGGAAGAGCTTGCTCTTTGGGTGACGAGCGGCG  
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA  
GCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAG  
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCT  
AGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT  
ATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCGTAAAGGTTAA  
TAACCTTAAGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC  
CGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGG  
CGGTCTGTCAAGTTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCGAAACTG  
GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGgACGcCTCAg

>C9-16S-R

CTGGgCAGGcTtAGAgGTcTgGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGcCGGTGAAAT  
GcCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC  
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAA  
CGATGTGCACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTC  
GACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCAC  
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA  
TCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCAT  
GGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT  
ATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTC  
GTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGTGG  
ATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG  
GAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCT

>C10-16S-F

CtAcACATGCAGTCGAGCGGTAGCACGGGGAGAGCTTGCTCTCCTGGGTGACGAGCGGCG  
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA  
GCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAG  
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCT  
AGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGgCCATGcCGCGT  
GTGTGAAGAAGGCCTTCGtGGTTGTAcAAGtCAcCTTTTCAGCGAGGAGgGAaTGGGCGAT  
GTCgTTATTAcCcgTgGttatcgctagttggagcgttacctctg

>C10-16S-R

CCCATGAATCCAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAA  
CCCCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCA  
TTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCC  
GGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTACTCTCGCaGAGtCTCGCTTCTCTTTGTAT  
ACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC  
CCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCTCCGACCGAATCGCTGGCA  
ACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACGAGCTG  
ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCTCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAG  
TTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACCATGCT  
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACTTGGCGCCGTACTCCC  
CAGGCGGTTCGATTTAACCGGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCTCAAGGGCACAACCTCCAAA

TCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT  
CgGCACCTGAGCGTCAGgTCTTCGTCCAGGGGGGCCCTTCGCCACCGGTATTCTTCCA  
GgATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGgAATTCTAC

>C13-16S-F

GGGAAGGGGCGGGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGAATTGATGAAGAAG

>C13-16S-R

taGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTG  
TAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGGGGTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAA  
CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC  
AGGTCTTGACATCCCATTGACCACTGTAGAGATACAGTTTTCCCTTCGGGGACAACGGTG  
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  
GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG  
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACC CGGAGGGGGAGCTAATCCG  
ATAAAGTCGTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGC  
TAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
GTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

>C16-16S-R

CTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTtTGgACCGCTGGGGAGTACgGCcCGCAAGGT  
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGA  
TGCAACGCGAAAAACCTTACCACCTTTGACATGGCAGGAACCTACCAGAGATGGTTTGG  
TGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGA  
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTAGTTGAG  
CACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA  
TGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTACATAAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCAACC  
CGCGAGGGGGAGCTAATCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA  
CTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCC  
GGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCC  
TAACCGTAAGGAGGGCGCTA

>C19-16S-R

GACGCTCAGGTGCcGAAAGCgGTGGgGGAGCAAACAGGATtTAGATAaCCCTGGTAGTCC  
ACGCTGTAAaACGATGTCGACTTgGgGAGGTTGTGCCcCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCT  
AACGCGTTAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTA  
CCTACTCTTGACATCCACAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACCTGTGAG  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  
GAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCC  
GGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGG  
CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACC  
TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATC  
GCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC  
CCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGc

>C26-16S-F

CaTATaCTGCAGTCGAGCGAATGGATCtAgAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA  
CGGGCACGTGGGTAACCTACCCATAAGACTGGGATAACTcCGGGAAACCGGGGCTAATAC  
CGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATG  
GATGGACCCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCG  
TAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGgACACGGCCAGACTCCTAC  
GGGAGGACGAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCT

GAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTG  
AATAAGCTGGgCcACCTTGACGGTACCTAAaCCAaGaaagccacgggctaactacgtgcca  
Gcagccgcggtaataacgtaggggcaagcgttatccggaattattg

>C26-16S-R

TGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC  
GACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCAT  
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC  
TTGACATCCTCTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTG  
GTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACG  
TGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAC  
CGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT  
CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC  
CACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGAGTAAC

>C27-16S-F

CTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGAAGAAGCGTGCTTCTTTGCCGGCGAGCGGGCG  
ACGcGGTtGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGAGGGGGATAACCcACTGGAAACGG  
TGGCTAATACCGCATGACCTCTTGGGAGCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATC  
GGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGACGATCC  
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  
GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGTAAGCGTTA  
ATAGGGCTTACGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC  
CGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGG  
CGGTCAATTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCCGGGAACGGCATCCAAGACTG  
GTTGGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCACGCTGTAGCGGTGAaATGCGgTAC  
AGATGTGGAGGAATACCGGTtGGC

>C27-16S-R

AACCCCGGAACGGCATCCAAGACTGGTTGGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC  
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC  
TGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG  
GTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG  
AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA  
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGC  
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAGGGAGAC  
TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT  
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCG  
GAACTCATAAAGTCTGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCG  
AATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTCGGTAGCTTAaCCTTCGGGGGG  
GCGCTGACC

>C30-16S-F

CTACaCATGCAAGTCGAGCGGTACACACGAAAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGGCGGA  
TCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTAGGTAGCTAATACCGCATAACGCTTTCg  
GGACCAAcAGgtGGGGGACCTTCGaGaGcCCTCACACCATCGGATGTGCCCaGATGGGAT  
TAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAgCGA  
TGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGGGGGAA  
TATTGCACAATGcGGCGCAAGCCTGATTgCAGCCATGCCGgCGCGTGTGAATAAGGCCTT

Cgggttgtaaagcactcttcacgagtgagtaatggcgctgacac

>C30-16S-R

GTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTtAGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGtTGcGCTTCCGG  
AGCTAACGCGTTAAGTTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA  
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACCGGAAGAAC  
CTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACCTG  
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAAGGAGAC  
TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT  
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCG  
GACCTCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCCG  
AATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
CCGCCCGTCAgCACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGTAGTgTAGCTTAACCTTCGGGA  
GGGCGCTCCT

>C32-16S-F

CTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGGCGGA  
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTAcCTGGAAACGGTAGC  
TAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGAT  
GTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAG  
CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT  
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTACAGTGTAAATAG  
CGCTGTGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT  
TTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACCTGCATTTGAAACTGGCAA  
GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT  
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAaaa

>C32-16S-R

gatGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
GCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC  
GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG  
GCCCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAC  
TCTTGACATCCACAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGA  
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA  
CACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATA  
AAGTATGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCCGGAATCGCTAG  
TAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC  
ACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTT

>C34-16S-F

CTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGGCGG  
AGGGAGAGAAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC  
TAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGAT  
GTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAG  
CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT  
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTACAGTGTAAATAG  
CGCTGTGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT  
TTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACCTGCATTTGAAACTGGCAA  
GCTAGAGTCTTGTAGAG

>C34-16S-R

GAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGA  
ATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACT  
GTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCC  
GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCAAAGGAGA  
CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAG  
TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGC  
GGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCG  
GAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  
ACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAG  
GGCGCTTACCAC

## ANEXO 5

### RESULTADOS DE ANÁLISIS ANOVA, LEVENE TEST Y PRUEBA DE TUKEY PARA CADA ENSAYO

Pruebas ANOVA con aislados bacterianos de larvas enfermas

C1

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
NUMERO DECESOS	8	21	2,625	3,125	21,875	4,72083504	-7,50018415	12,7501842	
% MORTALIDAD	8	196,9	24,6125	353,455536	2474,18875	4,72083504	14,4873158	34,7376842	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Groups	1933,80063	1	1933,80063	10,8463611	0,00533204	4,60010994	1,16438616	0,38095734	
Within Groups	2496,06375	14	178,290268						
Total	4429,86438	15	295,324292						

Levene's Tests

type	p-value
means	0,00522364
medians	0,00586227
trimmed	0,00522364

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05			
group	mean	n	ss	df	q-crit					
NUMERO DE	2,625	8	21,875							
% MORTALID	24,6125	8	2474,18875							
		16	2496,06375	14	3,033					
Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
NUMERO DE	% MORTALID	21,9875	4,72083504	4,65754465	7,66920732	36,3057927	0,00533204	14,3182927	1,6466907	

## C5

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION									
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	Alpha
NUMERO DE	8	18	2,25	2,78571429	19,5	4,2254332	-6,81265287	11,3126529	0,05
% MORTALID	8	162	20,25	282,882857	1980,18	4,2254332	11,1873471	29,3126529	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	1296	1	1296	9,07345175	0,00932296	4,60010994	1,06497956	0,33536743	
Within Grou	1999,68	14	142,834286						
Total	3295,68	15	219,712						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00192712
medians	0,00218064
trimmed	0,00192712

TUKEY HSD/KRAMER									
alpha									
0,05									
group	mean	n	ss	df	q-crit				
NUMERO DE	2,25	8	19,5						
% MORTALID	20,25	8	1980,18						
		16	1999,68	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
NUMERO DE	% MORTALID	18	4,2254332	4,25991825	5,18426111	30,8157389	0,00932296	12,8157389	1,50610854

## C9

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION									
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	Alpha
NUMERO DE	8	16	2	5,14285714	36	4,15094116	-6,90288334	10,9028833	0,05
% MORTALID	8	141,4	17,675	270,542143	1893,795	4,15094116	8,77211666	26,5778833	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	982,8225	1	982,8225	7,13003972	0,01829228	4,60010994	0,94406301	0,27700085	
Within Grou	1929,795	14	137,8425						
Total	2912,6175	15	194,1745						

### Levene's Tests

type	p-value
means	7,6101E-05
medians	9,1329E-05

trimmed 7,6101E-05

TUKEY HSD/KRAMER		alpha		0,05					
group	mean	n	ss	df	q-crit				
NUMERO DE	2	8	36						
% MORTALID	17,675	8	1893,795						
		16	1929,795	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
NUMERO DE	% MORTALID	15,675	4,15094116	3,77625204	3,08519547	28,2648045	0,01829228	12,5898045	1,33510671

### C10

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha		0,05		
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	26	3,25	19,3571429	135,5	3,98637047	-5,29991433	11,7999143	
% MORTALID	8	188,1	23,5125	234,90125	1644,30875	3,98637047	14,9625857	32,0624143	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	1642,27563	1	1642,27563	12,9181626	0,00293212	4,60010994	1,27073613	0,42689638	
Within Grou	1779,80875	14	127,129196						
Total	3422,08438	15	228,138958						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00267277
medians	0,03431978
trimmed	0,00267277

TUKEY HSD/KRAMER		alpha		0,05					
group	mean	n	ss	df	q-crit				
DECESOS	3,25	8	135,5						
% MORTALID	23,5125	8	1644,30875						
		16	1779,80875	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
DECESOS	% MORTALID	20,2625	3,98637047	5,08294453	8,17183835	32,3531616	0,00293212	12,0906616	1,79709227

### C13

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	21	2,625	3,41071429	23,875	4,65293206	-7,35454675	12,6045467	
% MORTALIC	8	205,2	25,65	342,985714	2400,9	4,65293206	15,6704533	35,6295467	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gr	2120,6025	1	2120,6025	12,2437896	0,00354145	4,60010994	1,23712316	0,41271019	
Within Grou	2424,775	14	173,198214						
Total	4545,3775	15	303,025167						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00678523
medians	0,00688515
trimmed	0,00678523

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05			
group	mean	n	ss	df	q-crit					
DECESOS	2,625	8	23,875							
% MORTALIC	25,65	8	2400,9							
		16	2424,775	14	3,033					
Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
DECESOS	% MORTALIC	23,025	4,65293206	4,94849263	8,91265705	37,1373429	0,00354145	14,1123429	1,74955635	

### C16

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	15	1,875	1,83928571	12,875	3,33224908	-5,27196347	9,02196347	
% MORTALIC	8	153,6	19,2	175,822857	1230,76	3,33224908	12,0530365	26,3469635	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gr	1200,6225	1	1200,6225	13,5157944	0,00249115	4,60010994	1,29979779	0,43890744	
Within Grou	1243,635	14	88,8310714						
Total	2444,2575	15	162,9505						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00352459
medians	0,01856798
trimmed	0,00352459

TUKEY HSD/KRAMER		alpha		0,05					
<i>group</i>	<i>mean</i>	<i>n</i>	<i>ss</i>	<i>df</i>	<i>q-crit</i>				
DECESOS	1,875	8	12,875						
% MORTALID	19,2	8	1230,76						
		16	1243,635	14	3,033				
Q TEST									
<i>group 1</i>	<i>group 2</i>	<i>mean</i>	<i>std err</i>	<i>q-stat</i>	<i>lower</i>	<i>upper</i>	<i>p-value</i>	<i>mean-crit</i>	<i>Cohen d</i>
DECESOS	% MORTALID	17,325	3,33224908	5,19919117	7,21828854	27,4317115	0,00249115	10,1067115	1,83819167

### C19

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	23	2,875	3,26785714	22,875	6,02362166	-10,0443835	15,7943835	
% MORTALID	8	287,8	35,975	577,276429	4040,935	6,02362166	23,0556165	48,8943835	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	4382,44	1	4382,44	15,097694	0,00164789	4,60010994	1,37375826	0,46839781	
Within Grou	4063,81	14	290,272143						
Total	8446,25	15	563,083333						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00587515
medians	0,00623382
trimmed	0,00587515

TUKEY HSD/KRAMER					alpha	0,05				
group	mean	n	ss	df	q-crit					
DECESOS	2,875	8	22,875							
% MORTALID	35,975	8	4040,935							
		16	4063,81	14	3,033					
Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
DECESOS	% MORTALID	33,1	6,02362166	5,49503304	14,8303555	51,3696445	0,00164789	18,2696445	1,94278756	

### C24

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	24	3	12,5714286	88	3,44194031	-4,38222777	10,3822278	
% MORTALID	8	129,3	16,1625	176,979821	1238,85875	3,44194031	8,78027223	23,5447278	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	693,005625	1	693,005625	7,312066	0,0171192	4,60010994	0,95603779	0,28289922	
Within Grou	1326,85875	14	94,775625						
Total	2019,86438	15	134,657625						

### Levene's Tests

type	p-value

means 0,00485859  
 medians 0,00784239  
 trimmed 0,00485859

TUKEY HSD/KRAMER		alpha		0,05					
group	mean	n	ss	df	q-crit				
DECESOS	3	8	88						
% MORTALIC	16,1625	8	1238,85875						
		16	1326,85875	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
DECESOS	% MORTALIC	13,1625	3,44194031	3,82415115	2,72309503	23,601905	0,0171192	10,439405	1,3520416

## C26

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION									
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	23	2,875	2,98214286	20,875	5,03632785	-7,92684893	13,6768489	
% MORTALIC	8	250,4	31,3	402,851429	2819,96	5,03632785	20,4981511	42,1018489	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gr	3231,9225	1	3231,9225	15,9273295	0,00133973	4,60010994	1,41099829	0,48265821	
Within Grou	2840,835	14	202,916786						
Total	6072,7575	15	404,8505						

## Levene's Tests

type p-value  
 means 5,5386E-05  
 medians 5,4528E-05  
 trimmed 5,5386E-05

TUKEY HSD/KRAMER		alpha		0,05					
group	mean	n	ss	df	q-crit				
DECESOS	2,875	8	20,875						
% MORTALIC	31,3	8	2819,96						
		16	2840,835	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
DECESOS	% MORTALIC	28,425	5,03632785	5,64399317	13,1498176	43,7001824	0,00133973	15,2751824	1,99545292

## C27

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	23	2,875	4,125	28,875	4,45244215	-6,67453865	12,4245386	
% MORTALID	8	210	26,25	313,062857	2191,44	4,45244215	16,7004614	35,7995386	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	2185,5625	1	2185,5625	13,7808712	0,00232032	4,60010994	1,31248196	0,4440752	
Within Grou	2220,315	14	158,593929						
Total	4405,8775	15	293,725167						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00128879
medians	0,00700952
trimmed	0,00128879

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05			
group	mean	n	ss	df	q-crit					
DECESOS	2,875	8	28,875							
% MORTALID	26,25	8	2191,44							
		16	2220,315	14	3,033					
Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
DECESOS	% MORTALID	23,375	4,45244215	5,24992784	9,87074297	36,879257	0,00232032	13,504257	1,85612979	

### C30

ANOVA: Single Factor									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
DECESOS	8	20	2,5	2,85714286	20	4,00470148	-6,08923042	11,0892304	
% MORTALID	8	224,2	28,025	253,745	1776,215	4,00470148	19,4357696	36,6142304	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gro	2606,1025	1	2606,1025	20,3123986	0,00049262	4,60010994	1,59343962	0,54690135	
Within Grou	1796,215	14	128,301071						
Total	4402,3175	15	293,487833						

### Levene's Tests

type	p-value
means	0,00011858
medians	0,00013516
trimmed	0,00011858

TUKEY HSD/KRAMER		alpha		0,05					
group	mean	n	ss	df	q-crit				
DECESOS	2,5	8	20						
% MORTALID	28,025	8	1776,215						
		16	1796,215	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
DECESOS	% MORTALID	25,525	4,00470148	6,37375848	13,3787404	37,6712596	0,00049262	12,1462596	2,25346392

**C32**

ANOVA: Single Factor										
DESCRIPTION					Alpha	0,05				
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper		
DECESOS	8	24	3	2,28571429	16	4,79150569	-7,27675762	13,2767576		
% MORTALID	8	242,2	30,275	365,050714	2555,355	4,79150569	19,9982424	40,5517576		
ANOVA										
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq		
Between Gro	2975,7025	1	2975,7025	16,2015105	0,00125285	4,60010994	1,42309129	0,48720431		
Within Grou	2571,355	14	183,668214							
Total	5547,0575	15	369,803833							

**Levene's Tests**

type	p-value
means	0,00013928
medians	0,01653993
trimmed	0,00013928

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05			
group	mean	n	ss	df	q-crit					
DECESOS	3	8	16							
% MORTALID	30,275	8	2555,355							
		16	2571,355	14	3,033					
Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
DECESOS	% MORTALID	27,275	4,79150569	5,69236515	12,7423632	41,8076368	0,00125285	14,5326368	2,012555	

**C34**

ANOVA: Single Factor										
DESCRIPTION					Alpha	0,05				
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper		
DECESOS	8	25	3,125	4,69642857	32,875	5,18081677	-7,98674684	14,2367468		
% MORTALID	8	271,71	33,96375	424,75737	2973,30159	5,18081677	22,8520032	45,0754968		
ANOVA										
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq		
Between Gro	3804,11401	1	3804,11401	17,7160571	0,00087502	4,60010994	1,48812202	0,51094351		
Within Grou	3006,17659	14	214,726899							
Total	6810,29059	15	454,019373							

**Levene's Tests**

type	p-value
means	0,00127077

medians 0,00150664  
 trimmed 0,00127077

TUKEY HSD/KRAMER			alpha	0,05					
group	mean	n	ss	df	q-crit				
DECESOS	3,125	8	32,875						
% MORTALID	33,96375	8	2973,30159						
		16	3006,17659	14	3,033				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
DECESOS	% MORTALID	30,83875	5,18081677	5,95248807	15,1253327	46,5521673	0,00087502	15,7134173	2,10452234

### Pruebas ANOVA ensayo con *Bacillus* spp (BFH)

#### Descriptive Statistics

	Número de larvas muertas	corrección control fórmula sun shepard
Mean	4,09090909	47,1163636
Standard Error	0,74412298	7,19205765
Median	5	56,2
Mode	2	29,9
Standard Deviation	2,46797672	23,8533567
Sample Variance	6,09090909	568,982625
Kurtosis	-1,29676988	-0,36053288
Skewness	-0,41970448	-0,72888652
Range	7	73,58
Maximum	7	73,7
Minimum	0	0,12
Sum	45	518,28
Count	11	11
Geometric Mean		27,8472465
Harmonic Mean		1,28474764
AAD	2,08264463	19,5173554
MAD	2	17,5
IQR	4	35,08

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION				Alpha		0,05		
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	StdErr	Lower	Upper
Número de larvas muertas corrección control fórmula	11	45	4,09090909	6,0909091	60,90909	5,1127	-6,574	14,75582
sun shepard	11	518,28	47,1163636	568,98263	5689,826	5,1127	36,45146	57,78127

ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	Fcrit	RMSSE	Omega Sq	
Between Groups	10181,5	1	10181,5436	35,409536	8,07E-06	4,351244	1,794171	0,609995	
Within Groups	5750,74	20	287,536767						
Total	15932,3	21	758,679948						

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05
group	mean	n	ss	uj	q-crit		
Número de larvas muertas corrección control fórmula	4,09090909	11	60,9090909				
sun shepard	47,1163636	11	5689,82625				
		22	5750,73535	20	2,95		

## ANEXO 6.

### REVISIÓN DE MORTALIDAD POR SEMANAS

TTO	20 JULIO	27 JULIO	3 AGOSTO	10 AGOSTO	17 AGOSTO	24 AGOSTO	31 AGOSTO	7 SEPTIEMBRE
C1	0	3	5	7	9	11	15	21
C5	0	2	3	5	9	12	13	18
C9	0	2	2	3	9	10	11	16
C10	0	3	4	10	11	11	13	16
C13	0	3	6	8	10	11	15	21
C16	0	2	4	8	8	10	12	15
C19	0	5	8	13	14	16	20	27
C24	0	0	2	6	7	10	13	24
C26	2	5	7	14	16	19	21	23
C27	0	4	6	12	14	17	18	23
C30	1	5	8	13	14	16	17	19
C32	2	5	8	12	16	19	21	22
C34	0	7	9	14	16	18	22	25

## ANEXO 6.1

### MORTALIDAD TRATAMIENTO BHF'S

TRATAMIENTO	10 AGOSTO	7 SEPTIEMBRE
BFH 1	1	2
BFH 2	1	2
BFH 3	0	0
BFH 4	0	1
BFH 5	2	4
BFH 6	1	7
BFH 7	0	6
BFH 8	3	6
BFH 9	0	7
BFH 10	0	5
BFH 11	0	5

**ANEXO 7.**

**ADULTOS OBTENIDOS EN LOS BIOENSAYOS**



**Tribu Sericini (*Astaena* spp)**



**Tribu Anomalini**



**Tribu Cyclocephalini  
(*Cyclocephala* spp)**