



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMIA

SENSIBILIDAD EN EL DESARROLLO DE *Bacillus subtilis* F. Cohn
AL EFECTO DE DIEZ PLAGUICIDAS DE SÍNTESIS QUÍMICA EN
CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO.

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRONOMA

AUTORA

KAROL SUSANA RUIZ TELLO

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMIA

**SENSIBILIDAD EN EL DESARROLLO DE *Bacillus subtilis* F. Cohn
AL EFECTO DE DIEZ PLAGUICIDAS DE SÍNTESIS QUÍMICA EN
CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRONOMA

AUTORA: KAROL SUSANA RUIZ TELLO

DIRECTORA: ING. NORMA SOLEDAD ERAZO SANDOVAL Ph.D

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Karol Susana Ruiz Tello

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Karol Susana Ruiz Tello, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 12 de mayo de 2023



Karol Susana Ruiz Tello

172698079-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **SENSIBILIDAD EN EL DESARROLLO DE *Bacillus subtilis* F. Cohn AL EFECTO DE DIEZ PLAGUICIDAS DE SÍNTESIS QUÍMICA EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO**, realizado por la señorita: **KAROL SUSANA RUIZ TELLO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova PhD.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



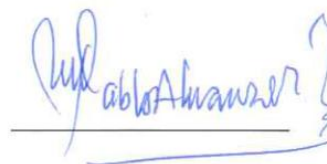
2023-05-12

Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval PhD.
**DIRECTORA DEL TRABAJO DE
INTEGRACIÓN CURRICULAR**



2023-05-12

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero, Dr. Sc
**ASESOR DEL TRABAJO DE
INTEGRACIÓN CURRICULAR**



2023-05-12

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi papá Manuel Ruiz, que siempre me apoyo, demostró la responsabilidad y el amor incondicional de un padre, aun en tu ausencia continuó trabajando para lograr todo lo que deseamos. De mi para ti hasta el cielo. A mi ángel en la tierra, mi mamá Susana Tello que ha sido un ejemplo de resiliencia y el pilar de mi vida. A mis hermanos Diva, Adry, Rony y Alex que siempre han confiado en que puedo lograr cosas grandes y están a mi lado en los momentos más importantes de mi vida, A mi sobrina Victoria que alegra mis días con su amor y travesuras. Son mi motor de amor y felicidad.

Karol

AGRADECIMIENTO

A mi amada familia por su apoyo constante y empujo para que yo pueda cumplir mis metas.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, A la facultad de Recursos Naturales y en especial a la carrera de Ingeniería Agronómica y profesores que han sido parte de mi formación académica.

A la Ing. Norma Erazo por permitirme ser parte de esta investigación y guiarme en la realización de este trabajo. Al Ing. Pablo Álvarez por su tiempo, paciencia y apoyo incondicional con el que me ha guiado en todo este tiempo. A la Ing. Gabriela Rosero por su confianza y paciencia en el desarrollo de esta investigación.

A mis amigas Madison y Micaela que han caminado conmigo desde el inicio, que han sido mis cómplices y han hecho mi vida universitaria más divertida.

Karol

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	xviii
SUMMARY / ABSTRACT.....	xix
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	2
1.1	Planteamiento del problema	2
1.2	Objetivos.....	2
1.2.1	<i>Objetivo general</i>	2
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	2
1.3	Justificación.....	2
1.4	Hipótesis	3
1.4.1	<i>Nula</i>	3
1.4.2	<i>Alterna</i>	3

CAPITULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Bacillus subtilis	4
2.1.1	<i>Taxonomía</i>	4
2.1.2	<i>Caracterización</i>	4
2.1.3	<i>Usos</i>	5
2.1.4	<i>Aplicaciones en el campo agrícola</i>	5

2.1.4.1	<i>Crecimiento de plantas</i>	5
2.1.4.2	<i>Aplicación a la biotecnología</i>	6
2.1.4.3	<i>Bioindicador de toxicidad</i>	6
2.2	Plaguicidas	6
2.2.1	<i>Generalidades</i>	6
2.2.2	<i>Ingrediente activo</i>	7
2.2.3	<i>Descripción de los ingredientes activos usados en la investigación</i>	7
2.2.4	<i>Clasificación toxicológica de los plaguicidas</i>	10
2.2.5	<i>Sensibilidad</i>	10
2.2.5.1	<i>Sensibilidad in vitro a plaguicidas</i>	11

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLOGICO	12
3.1	Características del lugar	12
3.1.1	<i>Localización</i>	12
3.1.2	<i>Ubicación geográfica</i>	12
3.1.3	<i>Condiciones climáticas</i>	12
3.2	Materiales y equipos	12
3.2.1	<i>Materiales de oficina</i>	12
3.2.2	<i>Materiales de laboratorio</i>	12
3.2.3	<i>Equipos de laboratorio</i>	13
3.2.4	<i>Material biológico</i>	13
3.2.5	<i>Insumos</i>	13
3.3	Especificaciones del diseño experimental	13
3.3.1	<i>Unidad experimental</i>	13
3.3.2	<i>Especificaciones del diseño experimental</i>	14
3.4	Factores y tratamientos en estudio	14
3.4.1	<i>Factores en estudio</i>	14

3.4.2	<i>Tratamientos en estudio</i>	15
3.5	Metodología	16
3.5.1	<i>Determinación de concentraciones de plaguicidas</i>	16
3.5.2	<i>Adición de distintas concentraciones de plaguicidas</i>	17
3.5.3	<i>Implementación de ensayo</i>	17
3.5.4	<i>Siembra de Bacillus subtilis al medio de cultivo</i>	18
3.5.5	<i>Conteo de número de UFC por mililitro.</i>	18
3.5.6	<i>Inhibición del crecimiento de las UFCs con las diferentes dosis de plaguicidas. ..</i>	18
3.5.7	<i>Análisis cualitativo de las colonias.</i>	19

CAPITULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	20
4.1	Procesamiento de resultados	20
4.1.1	<i>Determinación del número de UFC/mL de Bacillus subtilis.</i>	20
4.1.1.1	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Azadiractina.</i>	20
4.1.1.2	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Propamocarb.</i>	22
4.1.1.3	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Dimetomorf.</i>	24
4.1.1.4	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin.</i>	27
4.1.1.5	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Boscalid. .</i> 30	
4.1.1.6	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico.</i>	33
4.1.1.7	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Difenconazol.</i>	36
4.1.1.8	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap.</i>	39
4.1.1.9	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Glifosato..</i> 42	
4.1.1.10	<i>Crecimiento de Bacillus subtilis frente a distintas concentraciones de Deltametrina.</i>	45

4.1.2	<i>Análisis de las características cualitativas de las UFCS de Bacillus subtilis</i>	47
4.2	Discusión.....	52

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1	Conclusiones.....	56
5.2	Recomendaciones.....	57

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	4
Tabla 2-2:	Ingredientes activos usados en la investigación	7
Tabla 3-2:	Plaguicidas usados en la investigación.....	9
Tabla 4-2:	Clasificación toxicológica de plaguicidas	10
Tabla 5-3:	Lista de nombres comerciales e ingredientes activos que se usaron.	13
Tabla 6-3:	Tratamientos en estudio	15
Tabla 7-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azadiractina a las 24 h.....	20
Tabla 8-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azadiractina a las 48 h.....	21
Tabla 9-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Propamocarb a las 24 h.....	22
Tabla 10-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Propamocarb a las 48 h.....	23
Tabla 11-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 24 h.	24
Tabla 12-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 24 h.	25
Tabla 13-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 48h.	25
Tabla 14-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 48 h.	26
Tabla 15-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 24 h.	27
Tabla 16-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 24 h.	28
Tabla 17-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 48 h.	28

Tabla 18-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 48 h.	29
Tabla 19-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 24 h.	30
Tabla 20-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 48 h.	31
Tabla 21-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 48 h.	31
Tabla 22-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 24 h.	33
Tabla 23-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 24 h.	34
Tabla 24-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 48 h.	34
Tabla 25-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 48 h.	35
Tabla 26-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Difenconazol a las 24 h.	36
Tabla 27-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Difenconazol a las 24 h.	37
Tabla 28-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Difenconazol a las 48 h.	37
Tabla 29-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Difenconazol a las 48 h.	38
Tabla 30-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Clorhidrato de cartap a las 24 h.	39
Tabla 31-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap a las 24 h.	40
Tabla 32-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Clorhidrato de cartap a las 48 h.	40
Tabla 34-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Glifosato a las 24 h.	42

Tabla 35-4:	Test de Tukey al 0,05 de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Glifosato a las 24 h.	43
Tabla 36-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Glifosato a las 48 h.	43
Tabla 37-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Deltametrina a las 24 h.	45
Tabla 38-4:	Análisis de varianza de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones Deltametrina a las 48 h.	46
Tabla 39-4:	Características de las colonias expuestas a Azadiractina.	47
Tabla 40-4:	Características de las colonias expuestas a Propamocarb.	47
Tabla 41-4:	Características de las colonias expuestas a Dimetomorf.	48
Tabla 42-4:	Características de las colonias expuestas a Azoxystrobin.	48
Tabla 43-4:	Características de las colonias expuestas a Boscalid.	49
Tabla 44-4:	Características de las colonias expuestas a Sulfato cuprocálcico.	49
Tabla 45-4:	Características de las colonias expuestas a Difenconazol.	50
Tabla 46-4:	Características de las colonias expuestas a Clorhidrato de Cartap.	50
Tabla 47-4:	Características de las colonias expuestas a Glifosato.	51
Tabla 48-4:	Características de las colonias expuestas a Deltametrina.	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azadiractina a las 24 y 48 h.....	20
Ilustración 2-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Azadiractina vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	21
Ilustración 3-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Propamocarb a las 24 y 48 h.....	22
Ilustración 4-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Propamocarb vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	23
Ilustración 5-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 24 y 48 h.	24
Ilustración 6-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Dimetomorf vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	26
Ilustración 7-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 24 y 48 h.	27
Ilustración 8-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de azoxystrobin vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	29
Ilustración 9-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 24 y 48 h.....	30
Ilustración 10-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Boscalid vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	32
Ilustración 11-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 24 y 48 h.....	33
Ilustración 12-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de sulfato cuprocalcico vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.....	35
Ilustración 13-4:	Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Difenconazol a las 24 y 48 h.	36
Ilustración 14-4:	Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Difenconazol vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.....	38

Ilustración 15-4: Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap a las 24 y 48 h.	39
Ilustración 16-4: Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Clorhidrato de cartap vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	41
Ilustración 17-4: Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Glifosato a las 24 y 48 h.	42
Ilustración 18-4: Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Glifosato vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	44
Ilustración 19-4: Boxplot de las UFCs de <i>Bacillus subtilis</i> frente a distintas concentraciones de Deltametrina las 24 y 48 h.	45
Ilustración 20-4: Inhibición del crecimiento de UFCs a diferentes dosis de Deltametrina vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.	46

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y ADICIÓN DE CONCENTRACIONES DE PLAGUICIDAS.
- ANEXO B:** SIEMBRA DE *Bacillus subtilis* AL MEDIO DE CULTIVO.
- ANEXO C:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A AZADIRACTINA.
- ANEXO D:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A PROPAMOCARB.
- ANEXO E:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DIMETOMORF.
- ANEXO F:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A AZOXYSTROBIN.
- ANEXO G:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A BOSCALID.
- ANEXO H:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A SULFATO CUPROCALCICO.
- ANEXO I:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DIFENOCONAZOL.
- ANEXO J:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A CLORHIDRATO DE CARTAP.
- ANEXO K:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DIFENOCONAZOL
- ANEXO L:** CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DELTAMETRINA
- ANEXO M:** PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LAS DOSIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS VS EL CONTROL (DOSIS 0 PPM) A LAS 24 H.
- ANEXO N:** PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LAS DOSIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS VS EL CONTROL (DOSIS 0 PPM) A LAS 48 H.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la sensibilidad de *Bacillus subtilis* al efecto de plaguicidas de síntesis química en condiciones controladas de laboratorio. Los ingredientes activos usados para determinar la sensibilidad de la bacteria fueron azadiractina, propamocarb, dimetomorf, azoxystrobin, boscalid, sulfato cuprocálcico, difenoconazol, clorhidrato de cartap, glifosato y deltamtrina, las concentraciones usadas fueron, 0, 0,1; 1, 10 y 100 ppm. En laboratorio se realizó una solución madre con dosis de 100 ppm conforme a la concentración de ingrediente activo presente en cada producto. Las dosis menores se obtuvieron a partir de diluciones seriadas y se realizaron 3 repeticiones por cada concentración de plaguicida en cajas Petri. Una vez solidificado el medio de cultivo se sembró 50 µL de una suspensión de *B. subtilis* cuyo factor de dilución fue 10^{-7} y se introdujeron a la incubadora a una temperatura de 28 °C por 24 y 48 h. Una vez transcurridas el tiempo de incubación se registró el número de UFC/ml a partir de un conteo directo en caja y con los datos recolectados se determinó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento respecto a la dosis control (dosis 0 ppm). Además, se determinó las características morfológicas de las colonias considerando el registro de datos como: color, borde, elevación y pigmentos difusibles. Se concluyó que los ingredientes activos con mayor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *B. subtilis* fueron sulfato cuprocálcico y difenoconazol, mientras que los productos con menor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la bacteria fueron Azadiractina y Propamocarb. Se recomienda realizar pruebas que contribuyan a conocer el potencial de degradación de sustancias químicas de *B. subtilis* y otros microorganismos para conocer la compatibilidad que puede existir entre ciertos plaguicidas y el medio agrícola.

Palabras clave: <*Bacillus subtilis*>, <PLAGUICIDAS>, <INHIBICIÓN>, <INGREDIENTE ACTIVO>, <INHIBICIÓN>



DERAJ
Ing. Christian Castillo

1074-DBRA-UPT-2023

SUMMARY / ABSTRACT

This research aimed to determine the sensitivity of *Bacillus subtilis* to the effect of chemically synthesized pesticides under controlled laboratory conditions. The active ingredients used to determine the sensitivity of the bacteria were azadirachtin, propamocarb, dimethomorph, azoxystrobin, boscalid, cuprocalcium sulphate, difenoconazole, cartap hydrochloride, glyphosate and deltamtrin with concentrations of 0, 0.1, 1, 10 and 100 ppm. In the laboratory, a stock solution was made with doses of 100 ppm according to the concentration of active ingredient present in each product. The lower doses were obtained from serial dilutions and three replications were made for each pesticide concentration in Petri dishes. After culture medium was solidified, 50 µL of a suspension of *B. subtilis* with a dilution factor of 10⁻⁷ were seeded and placed in the incubator at 28 °C for 24 and 48 h. After incubation time had elapsed, the number of CFU/ml was recorded from a direct box count and with the data collected, the percentage of inhibition of each treatment regarding to the control dose (0 ppm dose) was determined. In addition, the morphological characteristics of the colonies were determined by recording of data such as: color, edge, elevation, and diffusible pigments. It was concluded that the active ingredients with the highest inhibitory effect on the development of *B. subtilis* were cuprocalcium sulphate and difenoconazole, whereas the products with the lowest inhibitory effect on the development of the bacteria were Azadirachtin and Propamocarb. It is recommended to carry out tests to find out the chemical degradation potential of *B. subtilis* and other microorganisms and the compatibility existing between certain pesticides and the agricultural environment.

Keywords: <*Bacillus subtilis*>, <PLAGUICIDES>, <INHIBITION>, <ACTIVE INGREDIENT>, <INHIBITION>.



Esthela Isabel Colcha Guashpa

0603020678

INTRODUCCIÓN

El suelo cuenta con una amplia diversidad microbiana que en conjunto les atribuyen a los cultivos beneficios en su desarrollo. El aprovechamiento de cepas seleccionadas de estos microorganismos ha dado lugar a biofertilizantes, inoculantes y más, que con su aplicación en los sistemas agrícolas maximizan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Rocafull et al., 2012: p.6).

Según Newton & Amstutz (2020: p.1-9) las bacterias promotoras del crecimiento tienen la capacidad de establecer relaciones simbióticas con las plantas promoviendo su crecimiento a partir de una variedad de medios. *Bacillus subtilis* es la especie más estudiada del género *Bacillus* gracias a su capacidad de aislarse en diversos entornos y sus múltiples aplicaciones, entre ellas, el control biológico de enfermedades en cultivos de interés agrícola (Kovács, 2019: pp.724-725).

El uso de plaguicidas coincide con la "era química", la cual ha aportado beneficios que por desgracia están ligados a muchos perjuicios, en su mayoría relacionados con la amenaza a largo plazo de importantes ecosistemas y la pérdida de biodiversidad (FAO, 1997: p.17).

Hoy por hoy la utilización indiscriminada de productos de síntesis química para el control de enfermedades en plantas ha ocasionado un desbalance en el equilibrio ecológico de microorganismos de interés biológico presentes en el suelo, acabar con ellos o limitar sus funciones (Sánchez, 2016: p.1). Dentro de los plaguicidas más empleados con fines agrícolas, están, insecticidas, herbicidas, fungicidas, bactericidas, rodenticidas y nematocidas, siendo estos productos los que facilitan la eliminación, control y manejo de distintas plagas y malezas que afectan las producciones agrícolas (Rivera et al., 2010: pp.94-102).

El estudio de la sensibilidad de microorganismos a plaguicida se basa en la exposición de estos a diferentes concentraciones de productos químicos con el objetivo de realizar valoraciones que permitan evidenciar el nivel de afectación o compatibilidad y minimizar su impacto sobre estos organismos (Escudero et al., 2008: pp.4773-4782).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 Planteamiento del problema

En Ecuador hay escasa y desactualizada información del efecto de plaguicidas en el desarrollo de *Bacillus subtilis* F. Cohn, microorganismo benéfico que al estar expuesto a estas sustancias sufre alteraciones y por tanto se promueve o inhibe su efecto promotor en el crecimiento de las plantas.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo general*

Determinar la sensibilidad en el desarrollo de *Bacillus subtilis* F. Cohn al efecto de diez plaguicidas de síntesis química en condiciones controladas de laboratorio.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Determinar el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. subtilis* desarrolladas sobre agar nutritivo (AN) contenidas en distintas concentraciones de diez plaguicidas de síntesis químicas.
- Analizar las características cualitativas de las unidades formadoras de colonias (ufc) crecidas en agar nutritivo (AN) contenidas en distintas concentraciones de diez plaguicidas de síntesis químicas.

1.3 Justificación

Las bacterias pueden desempeñar un rol cambiante como biodegradadores y transformadores de plaguicidas en el suelo, dependiendo de la concentración, movilidad, la toxicidad del principio activo y las propiedades fisicoquímicas de los suelos (Rivera et al., 2010: pp.94-102).

De acuerdo con Dueñas et al., (2007: p.55) dentro de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Bacillus subtilis* es un reconocido biorregulador por su acción fungicida, bactericida y su capacidad de aislarse en diversos entornos.

Uno de los problemas del empleo de plaguicidas radica en la ausencia de la selectividad, esto se debe a que al liberar estas sustancias la toxicidad tiende a extenderse hacia otras especies no objetivo, lo que justifica realizar investigaciones que permitan reducir el impacto sobre estos microorganismos (Rivera et al., 2010: pp.94-102).

Con la presente investigación se pretende identificar la sensibilidad en el desarrollo que tiene *Bacillus subtilis* al efecto de varios plaguicidas empleados en distintas concentraciones bajo condiciones controladas de laboratorio.

1.4 Hipótesis

1.4.1 Nula

H₀: La sensibilidad en el desarrollo de *Bacillus subtilis* F. Cohn no es afectada por ningún plaguicida de síntesis química utilizado.

1.4.2 Alternativa

H₁: La sensibilidad en el desarrollo de *Bacillus subtilis* F. Cohn es afectada por al menos un plaguicida de síntesis química utilizado.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Bacillus subtilis*

2.1.1 *Taxonomía*

La clasificación taxonómica de la bacteria *Bacillus subtilis* es la siguiente:

Tabla 1-2: clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*

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

Fuente: Schoch et al., 2020

Realizado por: Ruiz K, 2023

2.1.2 *Caracterización*

Bacillus es un género de bacterias presente en la rizosfera de múltiples cultivos agrícolas gracias a su capacidad en la formación de esporas, característica que le permite sobrevivir en la rizosfera vegetal (Calvo y Zúñiga, 2010: p.52). Dentro de este, podemos encontrar a *Bacillus subtilis* la cual es una de las especies más representativas y estudiadas del género *Bacillus* debido a su amplia distribución alrededor del mundo (Villarreal et al., 2017: p.95).

Según Setlow (2006: pp.514-525) en 1835 *Bacillus subtilis* fue denominado como *Vibrio subtilis* y no fue hasta 1872 que este organismo pasó a llamarse como lo conocemos actualmente. Adicional, otras denominaciones para esta bacteria incluyen: *Bacillus uniflagellatus*, *Bacillus globigii* y *Bacillus natto*.

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, catalasa-positiva, aerobia, cuya habilidad en la formación de una endosporra protectora resistente, le facilita tolerar condiciones ambientalmente extremas. Asimismo, es muy útil para la manipulación genética, por lo que ha

sido considerado como un organismo modelo para estudios de esporulación en laboratorio y también como un equivalente Gram positivo de *Escherichia coli* (Madigan y Martinko 2006: p.992).

En el caso específico de *B. subtilis* (Cobo 2017: p.21) menciona que esta es una bacteria presente en suelos agrícolas, raíces de plantas, tracto gastrointestinal de animales, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, la Antártida y desiertos.

2.1.3 Usos

Bacillus subtilis es una bacteria que destaca por sus beneficios y aplicaciones en varias áreas o campos. Lifeder (2015: p.1) menciona los siguientes:

- Elaboración de detergentes. -*Bacillus subtilis* produce un tipo de enzimas, que se conocen como proteasas, que se usan desde años atrás como aditivos en los detergentes. Esto se debe a la capacidad en la degradación de sustancias de origen proteico, lo que le confiere efectividad al detergente.
- Farmacología. -*Bacillus subtilis* produce sustancias con efecto antibiótico. Por lo que pueden eliminar cepas bacterianas patógenas. Como ejemplo se puede considerar a la Bacitracina que es un medicamento a manera de ungüento que se aplica en heridas, lesiones o quemaduras y actúa contra otras bacterias grampositivas.
- Gastronomía. - Existe una cepa de *Bacillus subtilis* que actúa en el proceso de fermentación de la semilla de la soja. Dando como resultado un alimento japonés que se conoce como Natto, un alimento poco común, pero con un gran valor nutricional.
- Control biológico. -*Bacillus subtilis* actúa como agente de biológico de enfermedades, capaz de combatir un amplio espectro de agentes patógenos (Control Bio 2015: p.1).

2.1.4 Aplicaciones en el campo agrícola

2.1.4.1 Crecimiento de plantas

Bacillus subtilis contribuye al crecimiento de las plantas al participar en la restitución de nutrientes del suelo al suministrar el ciclo del carbono terrestre y el ciclo del nitrógeno. Es capaz de formar biopelículas rugosas, que son densas comunidades de organismos, en la interfaz del aire y el agua que permiten el control de infecciones por patógenos vegetales y generan una interacción mutua con los sistemas de rizomas de las plantas, mismas que resultan beneficiadas por una colonización preventiva. Mientras que la bacteria se beneficia al obtener nutrientes y

área de superficie para la formación de biopelículas en la estructura de la raíz (Microbewiki 2015: p.8).

2.1.4.2 *Aplicación a la biotecnología*

Bacillus subtilis es uno de los organismos del género *Bacillus* responsables de la producción de antibióticos. La mejor actividad antibiótica se observó en *B. subtilis* MH-4. La actividad óptima ocurre a una temperatura de 37 °C y un pH de 8. Sin embargo, otros antibióticos que forma *Bacillus subtilis* son polimixina, que es eficaz contra bacterias Gram negativas, mientras que la difficidina tiene un espectro aún más amplio. Del mismo modo, secreta enzimas, “como amilasa, proteasa, pululanasa, quitinasa, xilanasas, lipasa, entre otras enzimas que representan alrededor del 60% de las enzimas industriales producidas comercialmente (Microbewiki 2015: p.8).

2.1.4.3 *Bioindicador de toxicidad*

Bacillus subtilis actúa como bioindicador de toxicidad. Su alta capacidad adaptación en su hábitat natural le brinda potencial no sólo de ser usado en ensayos de antimicrobianos, sino también en pruebas de toxicidad de pesticidas, los que incluyen estudios del efecto del compuesto activo con el organismo. (Benitez et al, 2009: pp.17-19).

2.2 **Plaguicidas**

2.2.1 *Generalidades*

Para FAO & Ongley (1997, p.17) 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, nematocidas y rodenticidas.

Los plaguicidas son sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, (Navas & García , 2022: p.14) mencionan que los agroquímicos pueden estar destinados a cualquiera de los fines siguientes:

- Combatir los o prevenir la acción de los agentes que afectan los productos vegetales.
- Promover la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- Destruir los vegetales indeseables.
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.

2.2.2 *Ingrediente activo*

Según Npic (2015: p.1) un ingrediente activo es un químico presente en los pesticidas, el cual controla o repele plagas. Es decir, según sea empleado, los ingredientes activos en un herbicida son aquellos que matan las malezas, los de un fungicida aquellos que matan hongos, etc. Por lo general los ingredientes activos constituyen la menor parte de todo el producto y su concentración está incluida en la etiqueta.

2.2.3 *Descripción de los ingredientes activos usados en la investigación*

Tabla 2-2: Ingredientes activos usados en la investigación

Ingrediente activo	Acción biocida	Modo de acción	movilidad
Azadiractina	Insecticida	Insecticida regulador del crecimiento, capaz de controlar insectos en todos sus estados larvarios y de pupa. Interfiere con el sistema neuroendocrino que controla la síntesis de la ecdisona, que es la responsable del proceso de la muda como inhibidor de la síntesis de la quitina, y de la hormona juvenil y también la inhibición de la liberación de ecdisona de la glándula que la produce, por lo que los insectos afectados no pueden completar su proceso de muda y mueren (De Liñán 2022, p.1).	Contacto
Propamocarb	Fungicida	Actúa afectando la síntesis de membranas, reduce el crecimiento micelial, así como el desarrollo de esporas, su transporte es acrópeto y es absorbido por raíces y hojas (IRET, 2022, p.1).	Sistémico
Dimetomorf	Fungicida	Participa en la inhibición de la formación de la pared celular del hongo, es hidrolítico y térmicamente estable en condiciones normales (IRET, 2022, p.1).	Sistémico

Azoxystrobin	Fungicida	Participa en la inhibición de la respiración mitocondrial de las células de los hongos, evitando la transferencia de electrones entre el citocromo b y c1, evitando así la formación de energía (ATP) necesaria para crecer y su desarrollo, además inhibe la germinación de esporas y las primeras etapas del crecimiento, lo que brinda protección contra enfermedades infecciosas (Liñan 2022, p.1).	Sistémico-traslaminar
Boscalid	Fungicida	Evita la germinación, interrumpe la formación de aporosios. En ciertos casos actúa sobre el crecimiento micelial y esporulación, se absorbe y mueve en dirección acrópeta hacia la parte superior y el borde de la hoja, el movimiento traslaminar es del haz al envés de la hoja. Así mismo, inhibe la enzima succinato ubiquinona reductasa, conocida como complejo citocrómico II, en la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial, el cual no solo contribuye a la producción de energía, sino que también regula la formación de los componentes básicos de aminoácidos y lípidos, lo que suprime el desarrollo de hongos al privar a la célula de energía y eliminar la formación de bloques para la síntesis de los componentes celulares esenciales (Terralia 2022, p.1).	Sistémico-traslaminar
Sulfato cuprocálcico	Fungicida	El sulfato cuprocálcico más conocido como Caldo Bórdeles, es un fungicida preventivo, muy estable almacenado en lugares frescos y secos, puede reaccionar con ácidos y álcalis fuertes, se descompone con el calor y es ampliamente utilizado en el control de hongos del follaje en diversos cultivos (IRET, 2022, p 1).	Contacto
Difenoconazol	Fungicida	Inhibe la desmetilación de esteroides, la biosíntesis de ergosterol en las membranas celulares, evitando el crecimiento de patógenos. Actúa sobre el crecimiento de micelios secundarios de patógenos en tejidos vegetales y sobre el crecimiento y la virulencia de esporas fúngicas (Syngenta 2021, p.1).	Sistémico

Clorhidrato de Cartap	Insecticida	Presenta acción rápida y duradera, es capaz de controlar diversos insectos, especialmente succionadores, masticadores y minadores cuando están en estado larval o adulto, presenta un amplio espectro con acción de contacto e ingestión (Point Chile 2021, p.1).	Sistémico
Glifosato (Sal isopropilamina)	Herbicida	Participa en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina), lo que le permite reducir la producción de proteínas, es un producto de postemergencia, no selectivo, usado en el control de un gran número de especies anuales y perennes tanto gramíneas como de hoja ancha, por sistema que se absorbe por las hojas y se trasloca hacia todas las partes de la planta, incluso hacia los órganos subterráneos (rizomas, bulbos, raíces, etc.) (Hortocampo 2022, p.1).	Sistémico
Deltametrina	Insecticida	La deltametrina contribuye en la inhibición de la transmisión del impulso nervioso. Es muy estable en el aire; a 190 °C bajo radiación UV y luz solar. Sobre todo, en medios ácidos. Es un insecticida no sistémico, de contacto, estomacal y residual, es muy usado para combatir plagas, entre ellos: Coleóptero, Heteróptero, Homóptera, Lepidóptera y Thysanóptera, en diversos cultivos (IRET, 2022, p.1).	contacto

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 3-2: Plaguicidas usados en la investigación

Nombre comercial	Ingrediente activo	Categoría	Modo de acción	Sitio de acción
Neem	Azadiractina	IV	Desconocido o no específico	Compuestos de modo de acción desconocido o incierto
Previcur	Propamocarb	III	F: transporte o síntesis de lípidos/ función o integridad de la membrana	Permeabilidad de la membrana celular, ácidos grasos (propuesto)
Salvador	Dimetomorf	III	H: biosíntesis de la pared celular	Celulosa sintasa
Satisfar	Azoxystrobin	III	C. Respiración	Complejo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cit b)
Cantus	Boscalid	III	C. Respiración	Complejo II: succinato deshidrogenasa

Caldo bordeles	Sulfato cuprocálcico	III	Multi-sitio: inorgánico	Desconocido
Score	Difenoconazol	II	G: biosíntesis de esterol en las membranas	C14- demetilasa en la biosíntesis de esteroles (erg11/cip51)
Circon	Clorhidrato de Cartap	II	-	-
Guadaña	Glifosato (sal isopropilamina)	II	-	-
Vactokill	Deltametrina	II	Nervioso y muscular	Moduladores del canal de sodio.

Fuente: FMCagro, 2019: pp.8-15

Realizado por: Ruiz, K, 2023

2.2.4 Clasificación toxicológica de los plaguicidas

Según Ulibarry (2019: p.1) un plaguicida se puede definir como una sustancia, mezcla o agente que tiene como fin su aplicación en el ambiente, plantas o animales, cuyo uso está orientado a la prevención y control de posibles daños causados por organismos. Los plaguicidas se clasifican de acuerdo con su toxicidad o peligrosidad considerando su capacidad de causar daños a la salud a partir de una o varias exposiciones. Dicha clasificación se divide en 5 categorías, que son: sumamente peligroso (Ia), muy peligroso (Ib), moderadamente peligroso (II), poco peligroso (III) y productos que normalmente no ofrecen peligro (IV).

Tabla 4-2: Clasificación toxicológica de plaguicidas

Clasificación de la OMS según Peligro	Clasificación del peligro	Color de la banda
Ia - Sumamente peligroso	Muy Tóxico	
Ib- Muy Peligroso	Tóxico	
II- Moderadamente Peligroso	Nocivo	
III- Poco Peligroso	Cuidado	
IV Productos que normalmente no ofrecen peligro		

Fuente: libarry, 2019, p.1

Realizado por: Ruiz, K, 2023

2.2.5 Sensibilidad

2.2.5.1 Sensibilidad in vitro a plaguicidas

La sensibilidad, así como la resistencia en condiciones de laboratorio pueden ser medibles al poner en contacto a una población de microorganismos o aislados a concentraciones cada vez más altas de un ingrediente activo presente en un plaguicida en cuestión, logrando así, medir su respuesta a diferentes dosis del compuesto. Las respuestas a la sensibilidad por lo general pueden basarse en la inhibición del crecimiento o desarrollo del organismo, de la germinación, etc (Escudero et al. 2008: pp.4773-4782).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLOGICO

3.1 Características del lugar

3.1.1 Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ESPOCH, ubicado en la parroquia Lizarzaburu, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

3.1.2 Ubicación geográfica

- Latitud: 01° 38' 51'' S
- Longitud: 78° 40' 59'' W
- Altitud: 2850 msnm.

Fuente: Estación Meteorológica ESPOCH, 2023

3.1.3 Condiciones climáticas

- Temperatura promedio: 23°C
- Humedad relativa: 43%

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Materiales de oficina

Computadora, impresora, libreta de apuntes, calculadora, cámara fotográfica, hojas, rotulador.

3.2.2 Materiales de laboratorio

Cajas Petri de plástico de 90 mm de diámetro, micropipetas y puntas de 100µL, parafilm, envases estériles de 100 mL, mandil, mascarilla, guantes, jeringas de 5 mL, asas y mechero.

3.2.3 Equipos de laboratorio

Autoclave Yamato modelo HL3030, cámara de flujo laminar Biobase modelo BBS110011A2-X e Incubadora Memmert REX-C900.

3.2.4 Material biológico

Bacteria (*Bacillus subtilis*)

3.2.5 Insumos

Agua destilada estéril, medio de cultivo: Agar nutritivo (AN) Difco™.

Ingredientes activos usados:

Tabla 5-3: Lista de nombres comerciales e ingredientes activos que se usaron.

Nombre comercial	Ingrediente activo
Neem-X 0.40 EC	Azadiractina
Previcur-N	Propamocarb
Salvador	Dimetomorf
Satisfar®	Azoxystrobin
Cantus®	Boscalid
Caldo bordeles	Sulfato cuprocalcico
Score	Difenoconazol
Circon®	Clorhidrato de Cartap
Guadaña	Glifosato (sal isopropilamina)
Vactokill 2.5	Deltametrina

Realizado por: Ruiz, K, 2023

3.3 Especificaciones del diseño experimental

3.3.1 Unidad experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar (DCA) diferente para cada plaguicida y tiempo, cuyo factor a analizar fueron las 5 concentraciones y se trabajó con 3 repeticiones por cada

tratamiento. Los datos registrados fueron transformados a valores logarítmicos con el fin de asegurar que tengan una distribución normal. Un total de 150 unidades experimentales (cajas Petri). Las variables en estudio fueron sometidas a un análisis de varianza para determinar la diferencia estadística entre las medias de los tratamientos usando la prueba de Tukey al 5 %.

3.3.2 Especificaciones del diseño experimental

- a) Número de tratamientos: 50.
- b) Número de repeticiones: 3.
- c) Número de unidades experimentales (cajas petri): 150.

3.4 Factores y tratamientos en estudio

3.4.1 Factores en estudio

- Plaguicidas

- a) Azadiractina
- b) Propamocarb.
- c) Dimetomorf.
- d) Azoxystrobin.
- e) Boscalid.
- f) Sulfato cuprocalcico
- g) Difenconazol.
- h) Clorhidrato de Cartap.
- i) Glifosato (sal isopropilamina).
- j) Deltametrina.

- Concentraciones en partes por millón (ppm)

- a) 100 ppm.
- b) 10 ppm.
- c) 1 ppm.
- d) 0,1 ppm.
- e) 0 ppm.

3.4.2 Tratamientos en estudio

Tabla 6-3. Tratamientos en estudio

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Azadiractina
T2	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Azadiractina
T3	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Azadiractina
T4	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Azadiractina
T5	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Azadiractina
T6	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Propamocarb
T7	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Propamocarb
T8	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Propamocarb
T9	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Propamocarb
T10	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Propamocarb
T11	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Dimetomorf
T12	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Dimetomorf
T13	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Dimetomorf
T14	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Dimetomorf
T15	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Dimetomorf
T16	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Azoxystrobin
T17	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Azoxystrobin
T18	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Azoxystrobin
T19	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Azoxystrobin
T20	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Azoxystrobin
T21	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Boscalid
T22	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Boscalid
T23	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Boscalid
T24	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Boscalid
T25	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Boscalid
T26	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Sulfato cuprocálcico
T27	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Sulfato cuprocálcico
T28	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Sulfato cuprocálcico
T29	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Sulfato cuprocálcico

T30	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Sulfato cuprocálcico
T31	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Difenconazol
T32	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Difenconazol
T33	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Difenconazol
T34	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Difenconazol
T35	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Difenconazol
T36	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Clorhidrato de Cartap
T37	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Clorhidrato de Cartap
T38	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Clorhidrato de Cartap
T39	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Clorhidrato de Cartap
T40	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Clorhidrato de Cartap)
T41	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Glifosato (sal isopropilamina)
T42	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Glifosato (sal isopropilamina)
T43	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Glifosato (sal isopropilamina)
T44	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Glifosato (sal isopropilamina)
T45	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Glifosato (sal isopropilamina)
T46	<i>Bacillus subtilis</i> + 100 ppm de Deltametrina
T47	<i>Bacillus subtilis</i> + 10 ppm de Deltametrina
T48	<i>Bacillus subtilis</i> + 1 ppm de Deltametrina
T49	<i>Bacillus subtilis</i> + 0,1 ppm de Deltametrina
T50	<i>Bacillus subtilis</i> + 0 ppm de Deltametrina

Realizado por: Ruiz, K, 2023

3.5 Metodología

3.5.1 Determinación de concentraciones de plaguicidas

La solución madre se realizó conforme a la concentración del ingrediente activo presente en cada plaguicida, como se muestra a continuación:

Concentración de fungicida Difenconazol en el producto: 250g/L.

$$250g/L \rightarrow 25\% = C_i$$

$$C_i = 25\% \rightarrow 250000 \text{ ppm}$$

Después de calcular la C_i se determinó la cantidad de plaguicida para lograr una solución stock de 100 mL. Para ello se usó la fórmula de Descroizilles (Bueno et al, 1824; citado en Dialnet, 2018: pp. 185-203).

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Donde:

C_i = Concentración inicial.

V_i = Volumen inicial.

C_f = Concentración final.

V_f = Volumen final.

$$250000 \text{ ppm} \times V_i = 100 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{100 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{250000 \text{ ppm}} = 0,040 \text{ mL} \rightarrow 40 \mu\text{L}$$

3.5.2 *Adición de distintas concentraciones de plaguicidas*

Luego de calcular la cantidad que se usó de cada plaguicida con ayuda de una micropipeta para los productos líquidos y una balanza analítica para los productos sólidos se tomó o peso la cantidad calculada de cada producto. Después, en la cámara de flujo laminar se adicionó dicha cantidad a un frasco estéril con agar nutritivo (AN) en estado líquido, considerando tener un volumen total de 100 mL que es el volumen de la solución madre con una dosis de 100 ppm. Las dosis menores se obtuvieron a partir de diluciones seriadas, excepto la dosis de 0 ppm.

100 ppm = solución madre 100 mL.

10 ppm = 90 mL de agar nutritivo + 10 mL de solución de 100 ppm.

1 ppm = 90 mL de agar nutritivo + 10 mL de solución de 10 ppm.

0,1 ppm = 90 mL de agar nutritivo + 10 mL de solución de 1 ppm.

0 ppm = 90 mL de agar nutritivo.

3.5.3 *Implementación de ensayo*

Una vez añadidas las respectivas concentraciones de plaguicidas en los frascos estériles con el medio de cultivo aun en estado líquido se realizaron 3 repeticiones por cada dosis de producto, colocando 30 mL de medio en cada caja Petri.

3.5.4 Siembra de *Bacillus subtilis* al medio de cultivo

Una vez solidificado el medio de cultivo con las respectivas concentraciones de los plaguicidas seleccionados, se tomó con una micropipeta 50 μL de una suspensión de *B. subtilis* cuyo factor de dilución fue 10^{-7} y se añadió a cada caja con el medio solido para después con ayuda de un asa de digralsky distribuir la bacteria por toda la caja, mismas que se etiquetaron, sellaron con Parafilm y se introdujeron a la incubadora a una temperatura de 28 °C por 24 y 48 h.

3.5.5 Conteo de número de UFC por mililitro.

Una vez transcurridas las 24 y 48 h se registró el número de unidades formadoras de colonias UFC/mL, para ello se realizó un conteo directo en caja. Los resultados obtenidos se agruparon en un documento de Excel con hojas separas de acuerdo con el producto usado, los datos obtenidos se multiplicaron por la cantidad inoculada en mL, que en el caso del presente trabajo es 0.05 mL y el factor de dilución, que es 10000000 ya que el factor de dilución en este caso fue 10^{-7} . Además, se usaron box-plot (diagramas de caja y bigote) para visualizar los resultados obtenidos.

$$UFC = \# \text{ Colonias} \times 0.05 \text{ mL} \times \text{factor de dilucion} = UFC/\text{mL}$$

3.5.6 Inhibición del crecimiento de las UFC_S con las diferentes dosis de plaguicidas.

Con los datos recolectados del número de UFC_S de cada dosis de plaguicidas, se determinó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento respecto a la dosis control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h, los resultados fueron promediados para evidenciar cual fue el producto que mayor y menor efecto inhibitorio tuvo sobre el crecimiento de la bacteria. Se usó la clasificación de la toxicidad de los plaguicidas según el valor de inhibición sobre el crecimiento de colonias propuesto en Viñuela et al (1993: p.18) que indica que cuando el porcentaje de inhibición de crecimiento es <30% se lo considerara como inofensivo, de 30 a 75% es ligeramente tóxico, de 75 a 90% moderadamente tóxico y mayor a 90% es toxico. Además, se utilizó gráficos de barras para evidenciar los resultados.

3.5.7 Análisis cualitativo de las colonias.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación en las cajas de Petri con el medio de cultivo con las concentraciones de plaguicidas establecidas, donde se evidenció las UFCs, se realizó una valoración de las características cualitativas de dichas colonias. Considerando el registro de datos como: borde, elevación y pigmentos difusibles basándonos en la caracterización de morfología de colonias propuesta por (Guillen 2020: p.1), para el registro de color de las colonias se usó una paleta Pantone®.

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Procesamiento de resultados

4.1.1 Determinación del número de UFC/mL de *Bacillus subtilis*.

4.1.1.1 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azadiractina.

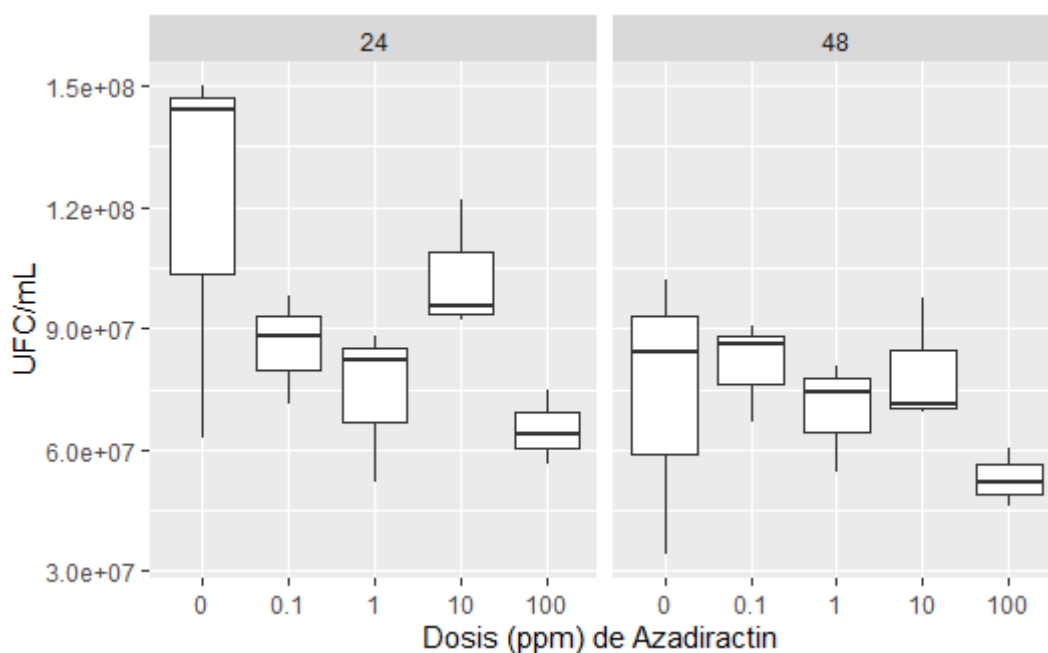


Ilustración 1-4. Boxplot de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azadiractina a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 7-4: Análisis de varianza de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azadiractina a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,12	0,03	1,98	0,174	n.s
Error	10	0,15	0,01			
Total	14					
CV	1,53					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Azadiractina a las 24 h ($P>0,05$) y el coeficiente de variación fue de 1,53 (**Tabla 7-4**).

Tabla 8-4: Análisis de varianza de las UFC_5 de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azadiractina a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,06	0,02	0,94	0,481	n.s
Error	10	0,18	0,02			
Total	14					
CV	1,69					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Azadiractina a las 48 h ($P>0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,69 (**Tabla 8-4**).

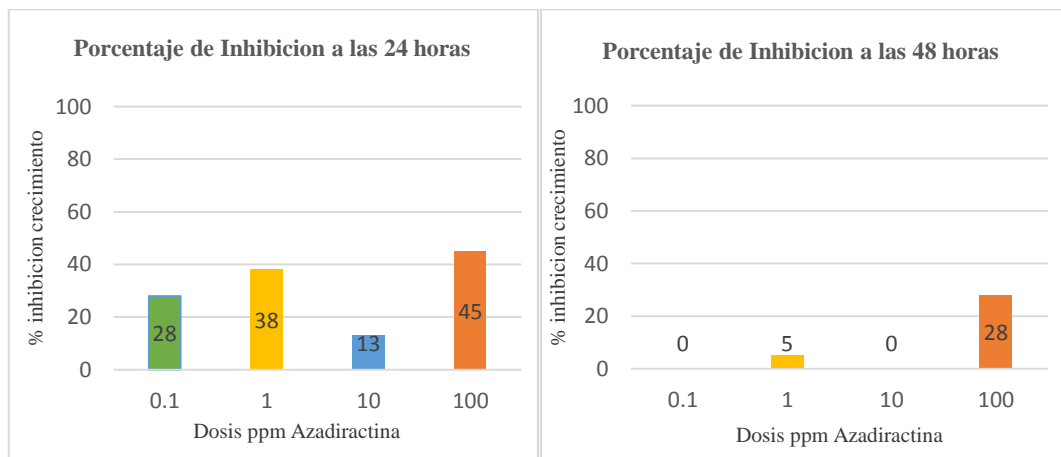


Ilustración 2-4. Inhibición del crecimiento de UFC_5 a diferentes dosis de Azadiractina vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de Azadiractina sobre *B. subtilis* in vitro evidenció la inhibición en el crecimiento de UFC_5 con todas las dosis usadas a las 24 h, siendo la de 100 ppm la que alcanzó un porcentaje de inhibición del 45 % (**Ilustración 2-4**). A las 48 h hubo un incremento de colonias con todas las dosis, en el caso de la dosis de 0,1 y 10 ppm para este tiempo no existió inhibición de crecimiento respecto al control (dosis 0 ppm), mientras que con la dosis de 1 y 100 ppm el porcentaje de inhibición fue de 5% y 28% respectivamente.

4.1.1.2 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Propamocarb.

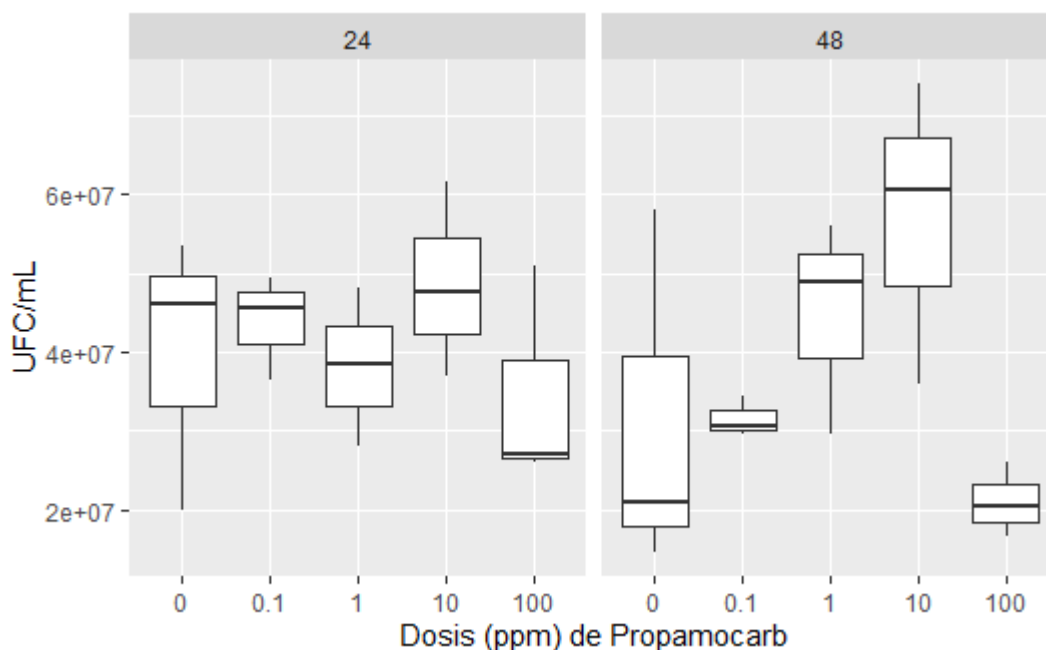


Ilustración 3-4. Boxplot de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Propamocarb a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 9-4: Análisis de varianza de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Propamocarb a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,04	0,01	0,55	0,704	n.s
Error	10	0,22	0,02			
Total	14					
CV	1,96					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Propamocarb a las 24 h ($P > 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,96 (**Tabla9-4**).

Tabla 10-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Propamocarb a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,34	0,08	2,73	0,0899	n.s
Error	10	0,31	0,03			
Total	14					
CV	2,35					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 ^ 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Propamocarb a las 48 h ($P>0,05$) y el coeficiente de variación fue 2,35 (Tabla 10-4).

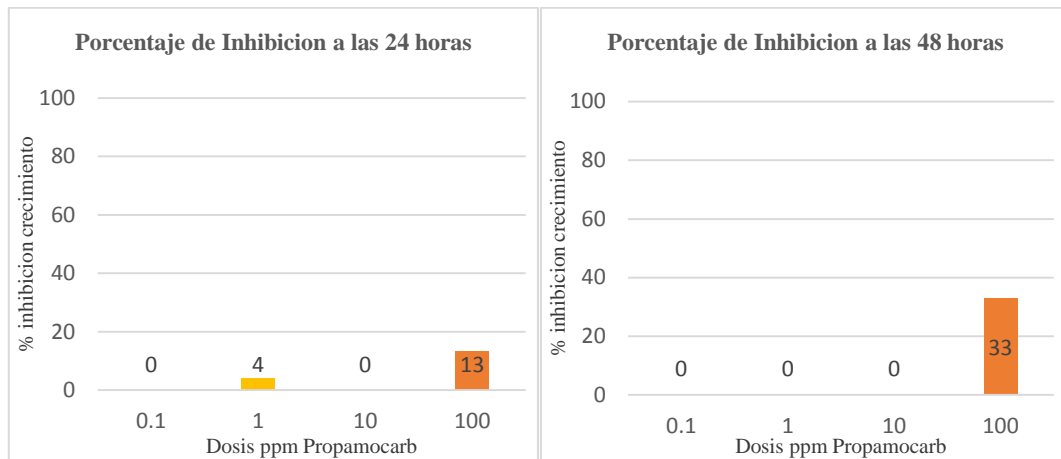


Ilustración 4-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Propamocarb vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de propamocarb sobre *B. subtilis* in vitro a las 24 h indicó inhibición de crecimiento de UFC_S con la dosis de 1 y 100 ppm con porcentajes de 4 % y 13% respectivamente (Ilustración 4-4), mientras que a las 48 h solo la dosis de 100 ppm alcanzó un porcentaje de inhibición de 33% respecto al control (dosis 0 ppm).

4.1.1.3 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Dimetomorf.

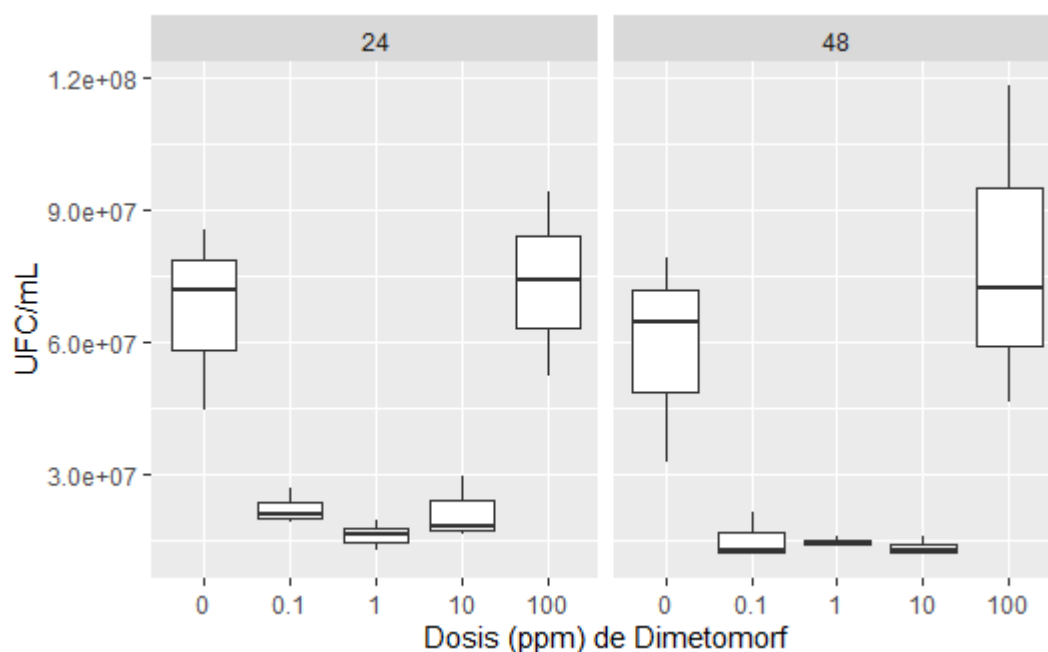


Ilustración 5-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 11-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	1,13	0,28	19,26	0,000109	***
Error	10	0,14	0,01			
Total	14					
CV	1,61					

Códigos de significancias: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Dimetomorf las 24 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,61 (**Tabla 11-4**).

Tabla 12-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_5 de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 24 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
100	7,33E+7	a*
0	6,72E+7	a
0,1	2,20E+7	b
10	2,12E+7	b
1	1,60E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Dimetomorf a las 24 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 100 y 0 ppm, mientras que, en el “b”, esta las dosis 0,1; 10 y 1 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_5 presentó el de 100 ppm con 73333333 UFC/mL y el de 1 ppm el que menor número presentó con 16000000 UFC/mL. (Tabla 12-4).

Tabla 13-4: Análisis de varianza de las UFC_5 de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 48h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	1,58	0,39	18,3	0,000135	***
Error	10	0,22	0,02			
Total	14					
CV	1,99					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Dimetomorf las 48 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,99 (Tabla 13-4).

Tabla 14-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Dimetomorf a las 48 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
100	7,87E+7	a*
0	5,87E+7	ab
0,1	1,50E+7	b
1	1,43E+7	b
10	1,32E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Dimetomorf a las 48 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 100 y 0 ppm, en el “b”, esta las dosis 0; 0,1; 1 y 10 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 100 ppm con 7866667 UFC/mL y el de 10 ppm el que menor número presentó con 1316667 UFC/mL (**Tabla 14-4**).

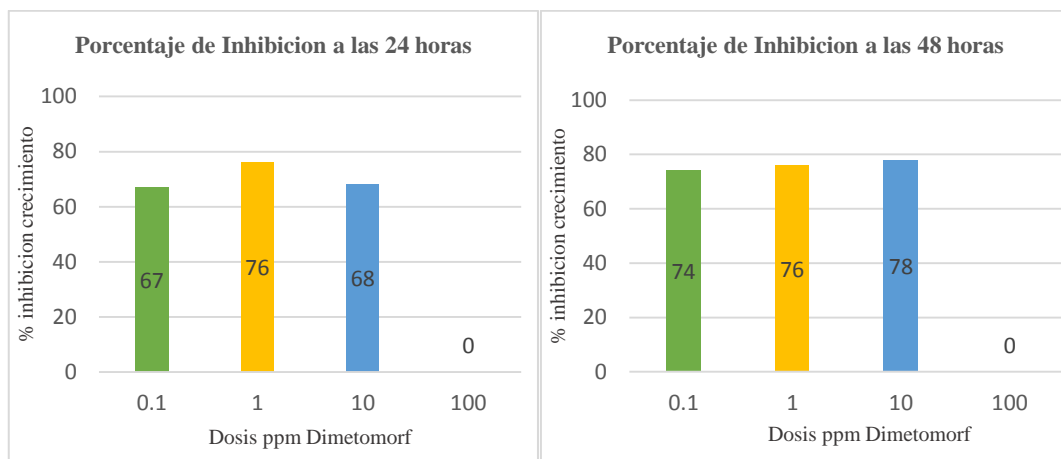


Ilustración 6-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Dimetomorf vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de dimetomorf sobre *B. subtilis* *in vitro* a las 24 h alcanzó un efecto inhibitor en el crecimiento de UFC_S de 67%, 76% y 68% con las dosis 0,1; 1 y 10 ppm respectivamente (**Ilustración 6-4**), a las 48 h el efecto inhibitor se mantuvo entre 74% y 78% para las dosis 0,1; 1 y 10 ppm, sin embargo, la dosis de 100 ppm no presentó inhibición frente al control (dosis 0 ppm) en ningún momento.

4.1.1.4 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin.

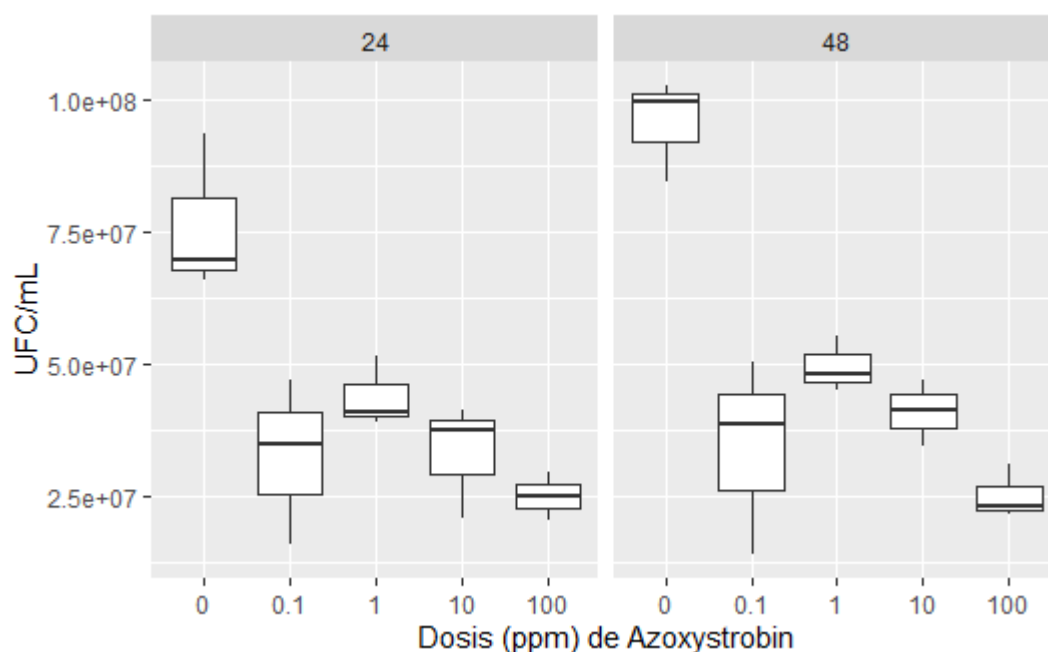


Ilustración 7-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 15-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,43	0,11	5,34	0,0146	*
Error	10	0,20	0,02			
Total	14					
CV	1,88					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 . 0,1 ' 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Azoxystrobin a las 24 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,88 (**Tabla 15-4**).

Tabla 16-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 24 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0	7,63E+7	a*
1	4,38E+7	b
10	3,33E+7	b
0,1	3,27E+7	b
100	2,50E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Azoxystrobin a las 24 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0 ppm, mientras que en el “b”, está la dosis 1, 10, 0,1 y 100 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC₅ presentó el de 0 ppm con 76333333 UFC/mL y el de 100 ppm el que menor número presentó con 25000000 UFC/mL (Tabla 16-4).

Tabla 17-4: Análisis de varianza de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,61	0,15	7,45	0,00467	**
Error	10	0,20	0,02			
Total	14					
CV	1,87					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Azoxystrobin a las 48 h (P<0,05) y el coeficiente de variación fue 1,87 (Tabla 17-4).

Tabla 18-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Azoxystrobin a las 48 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0	9,55E+7	a*
1	4,95E+7	b
10	4,10E+7	b
0,1	3,43E+7	b
100	2,52E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Azoxystrobin a las 48 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0 ppm, mientras que en el “b”, está la dosis 1, 10 0,1 y 100 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 0 ppm con 95500000 UFC/mL y el de 100 ppm el que menor número presentó con 25166667 UFC/mL(Tabla 18-4).

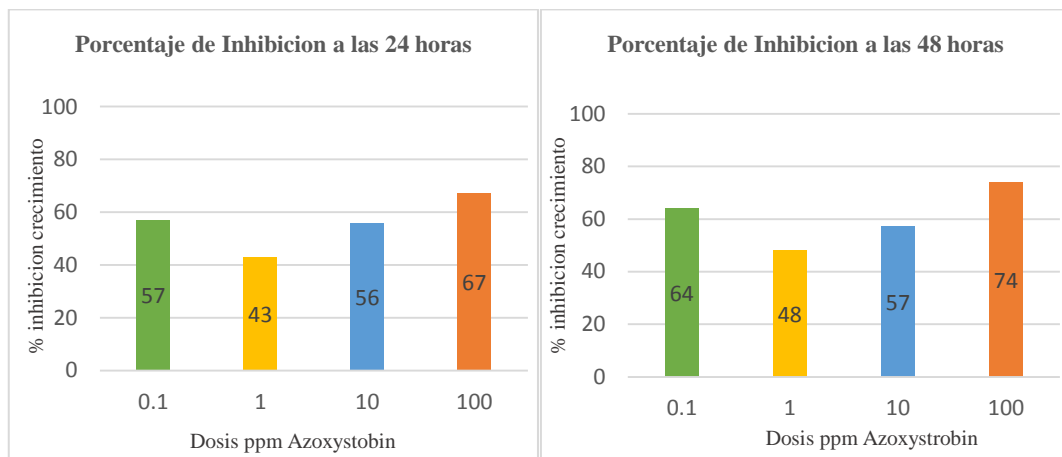


Ilustración 8-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de azoxystrobin vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de azoxystrobin sobre *B. subtilis* in vitro mostró efecto inhibitor en el crecimiento de UFC_S con todas las dosis usadas, a las 24 h se registró porcentajes de inhibición de 57%, 43%, 56% y 67% para las dosis 0,1; 1, 10 y 100 ppm respectivamente, mientras que a las 48 h los porcentajes de inhibición fueron del 64%, 48%, 57% y 74% para las dosis 0,1; 1, 10 y 100 ppm respecto al control (dosis 0 ppm) (Ilustración 8-4).

4.1.1.5 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Boscalid.

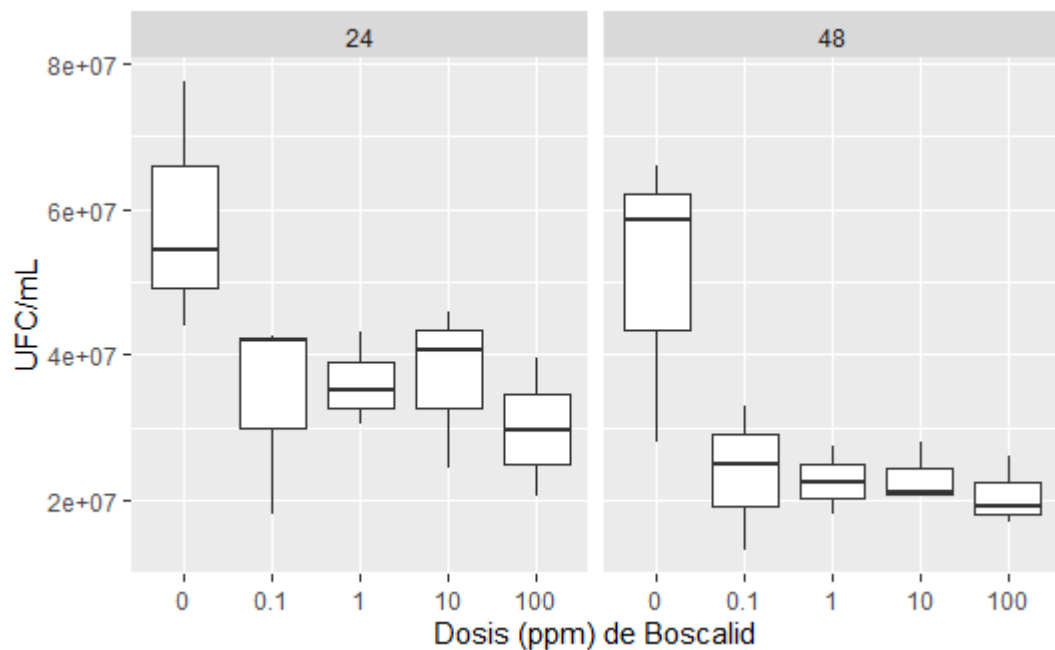


Ilustración 9-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 19-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,16	0,04	1,80	0,205	n.s
Error	10	0,22	0,02			
Total	14					
CV	1,94					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Boscalid a las 24 h ($P>0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,94 (**Tabla 19-4**).

Tabla 20-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,36	0,09	5,97	0,0125	*
Error	10	0,13	0,01			
Total	14					
CV	1,65					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Boscalid a las 48 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,699546 (Tabla 20-4).

Tabla 21-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Boscalid a las 48 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0	5,08E+7	a*
0,1	2,37E+7	ab
10	2,32E+7	ab
1	2,27E+7	ab
100	2,07E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Boscalid a las 48 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0; 0,1; 10 y 1 ppm, en el “b”, esta las dosis 0,1; 10; 1 y 100 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 0 ppm con 50833333 UFC/mL y el de 100 ppm el que menor número presentó con 20666667 UFC/mL (Tabla 21-4).

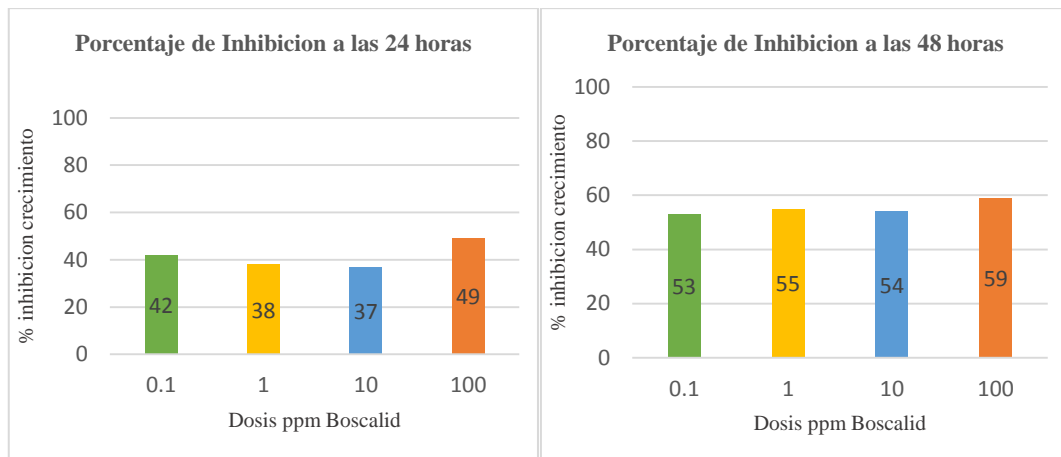


Ilustración 10-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Boscalid vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de Boscalid sobre *B. subtilis* in vitro presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de UFC_S con todas las dosis usadas, a las 24 h se presentaron porcentajes de inhibición de 42%, 38%, 37 % y 49 % para las dosis 0,1; 1, 10 y 100 ppm respectivamente ((**Ilustración 10-4**)), a las 48 h el número de UFC_S descendió por lo que los porcentajes de inhibición incrementaron siendo estos, 53%, 55%, 54% y 59% para las dosis 0,1; 1, 10 y 100 ppm respectivamente.

4.1.1.6 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico.

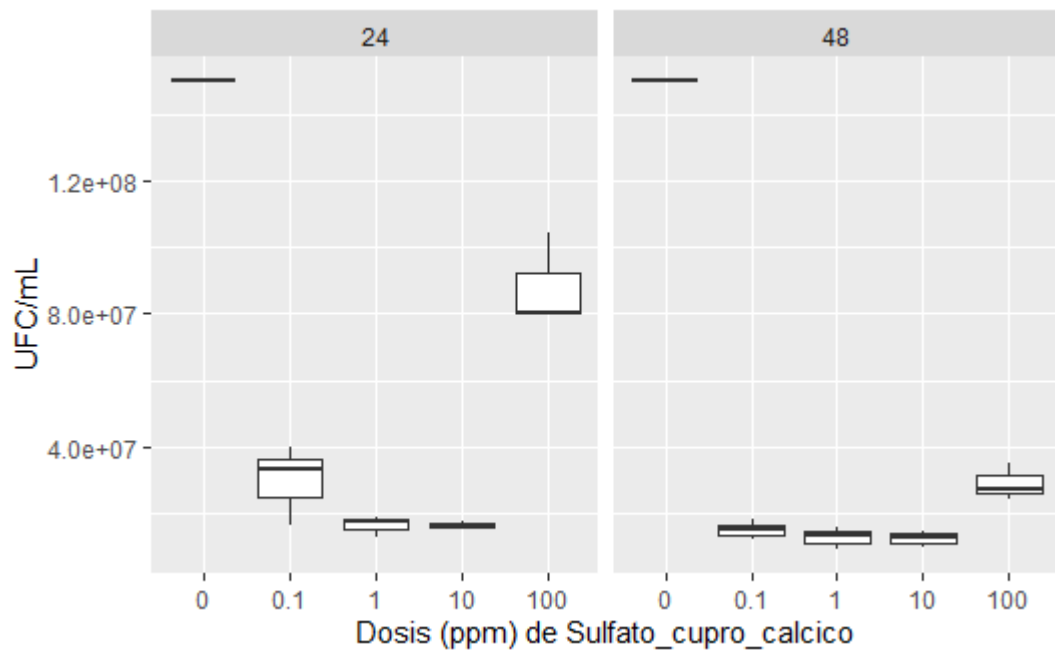


Ilustración 11-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 22-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	2,33	0,58	53,38	0,00000104	***
Error	10	0,11	0,01			
Total	14					
CV	1,37					

Códigos de significancias: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Sulfato cuprocálcico a las 24 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,37 (**Tabla 22-4**).

Tabla 23-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 24 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0	1,50E+8	a*
100	8,82E+7	b
0,1	2,98E+7	c
10	1,65E+7	c
1	1,62E+7	c

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Sulfato cuprocálcico a las 24 h evidenció tres grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0 ppm, en el “b”, esta la dosis 100 ppm y en el “c”, está la dosis 0,1; 10 y 1 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 0 ppm con 150000000 UFC/mL y el de 1 ppm el que menor número presentó con 16166667 UFC/mL (Tabla 23-4).

Tabla 24-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	2,56	0,64	82,39	0,00000017	***
Error	10	0,08	0,01			
Total	14					
CV	1,19					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Sulfato cuprocálcico a las 48 h (P<0,05) y el coeficiente de variación fue 1,19 (Tabla 24-4).

Tabla 25-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Sulfato cuprocálcico a las 48 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0	1,50E+8	a*
100	2,88E+7	b
0,1	1,50E+7	C
1	1,27E+7	C
10	1,23E+7	C

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Sulfato cuprocálcico a las 48 h evidenció tres grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0 ppm, en el “b”, está la dosis 100 ppm y en el “c”, está la dosis 0,1; 10 y 1 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 0 ppm con 150000000 UFC/mL y el de 10 ppm el que menor número presentó con 123333333 UFC/mL (Tabla 25-4).

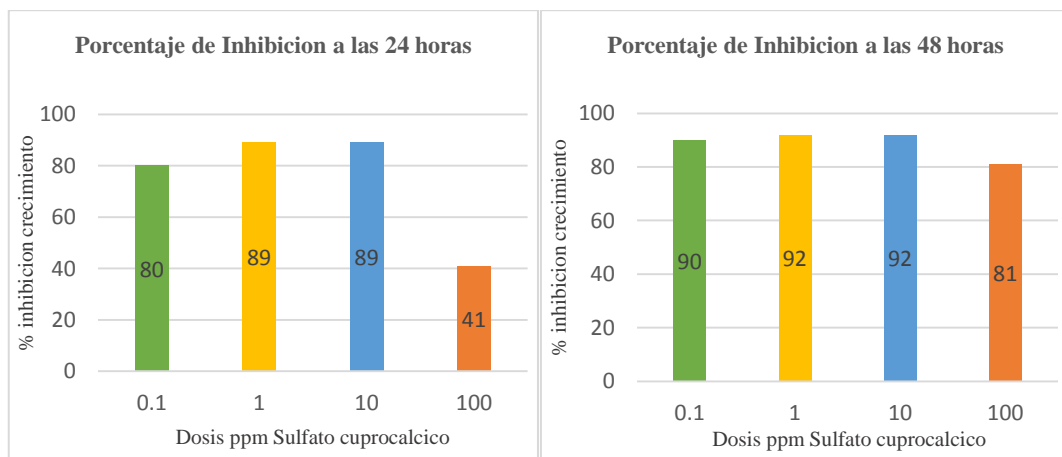


Ilustración 12-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de sulfato cuprocálcico vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de sulfato cuprocálcico sobre *B. subtilis* presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de UFC_S con todas las dosis, a las 24 h se registraron porcentajes de inhibición de 80% para la dosis de 0,1 ppm, 89% para la dosis de 1 y 10 ppm, sin embargo, para la dosis de 100 ppm el porcentaje de inhibición fue de 41% (Ilustración 12-4), a las 48 h los datos de inhibición incrementaron, siendo estos alrededor del 90% para las dosis de 0,1; 1 y 10 ppm, mientras que para la dosis de 100 ppm el porcentaje fue de 81%.

4.1.1.7 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Difenconazol.

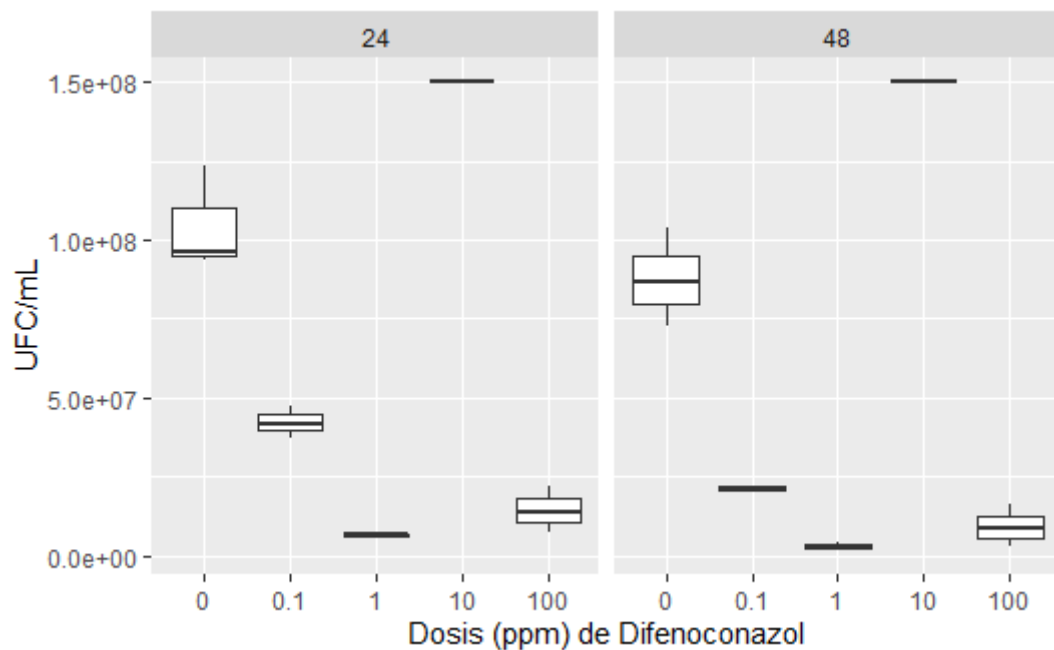


Ilustración 13-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Difenconazol a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 26-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Difenconazol a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	4,04	1,01	75,76	0,000000194	***
Error	10	0,13	0,01			
Total	14					
CV	1,53					

Códigos de significancias: 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '.' 0,1 '^' 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Difenconazol a las 24 h (P<0,05) el coeficiente de variación fue 1,529392 (Tabla 26-4).

Tabla 27-4: Test de Tukey al 0,05 de las **UFC_S** de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Difenconazol a las 24 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
10	1,50E+8	a*
0	1,05E+8	b
0,1	4,22E+7	c
100	1,45E+7	d
1	6,50E+6	d

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis Difenconazol a las 24 evidenció cuatro grupos estadísticos, en el “**a**”, está la dosis 10 ppm, en el “**b**”, está la dosis 0 ppm, en el “**c**”, está la dosis 0,1 ppm y en el “**d**”, está la dosis 100 y 1 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 10 ppm con 15000000 UFC/mL y el de 1 ppm el que menor número presentó con 6500000 UFC/mL (**Tabla 27-4**).

Tabla 28-4: Análisis de varianza de las **UFC_S** de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Difenconazol a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	6,28	1,57	39,43	0,0000043	***
Error	10	0,39	0,04			
Total	14					
CV	2,71					

Códigos de significancias: 0 ‘***’ 0,001 ‘**’ 0,01 ‘*’ 0,05 ‘.’ 0,1 ‘.’ 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Difenconazol a las 48 h (P<0,05) y el coeficiente de variación fue 2,71(**Tabla 28-4**).

Tabla 29-4: Test de Tukey al 0,05 de las **UFC_S** de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Difenonazol a las 48 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
10	1,50E+8	a*
0	8,75E+7	b
0,1	2,13E+7	c
100	9,17E+6	c
1	3,00E+6	c

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis Difenonazol a las 48 h evidenció tres grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 10 ppm, en el “b”, está la dosis 0 ppm y en el “c”, está la dosis 0,1; 100 y 1 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 10 ppm con 15000000 UFC/mL y el de 1 ppm el que menor número presentó con 3000000 UFC/mL (**Tabla 29-4**).

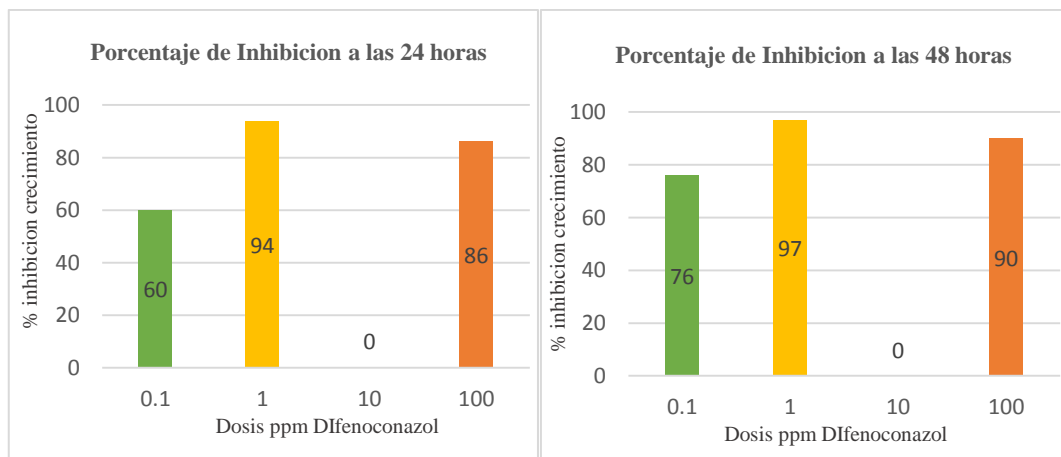


Ilustración 14-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Difenonazol vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de difenoconazol sobre *B. subtilis* indicó un efecto inhibitorio en el crecimiento de UFC_S en todas las dosis a excepción de la dosis de 10 ppm, a las 24 h los porcentajes de inhibición fueron 60%, 94% y 86% para las dosis 0,1; 1 y 100 ppm (**Ilustración 14-4**), mientras que a las 48 h la inhibición fue de 76%, 97% y 90% respectivamente frente al control (dosis 0 ppm).

4.1.1.8 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap.

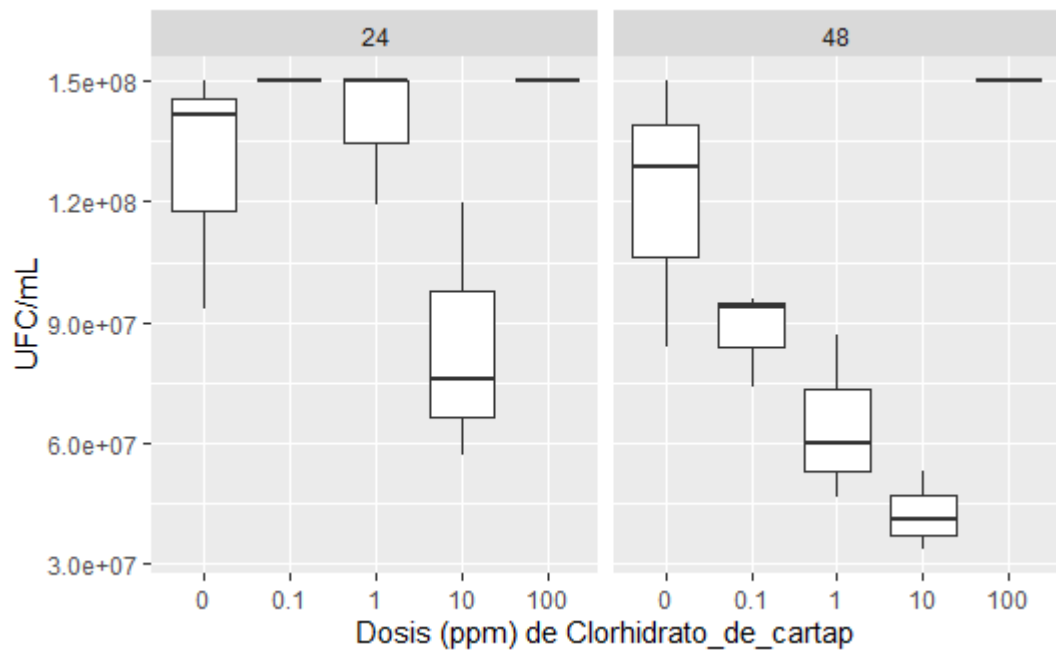


Ilustración 15-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 30-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Clorhidrato de cartap a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,15	0,04	4,58	0,0232	*
Error	10	0,08	0,01			
Total	14					
CV	1,13					

Códigos de significancias: 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '.' 0,1 '.' n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Clorhidrato de cartap a las 24 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,133738 (**Tabla 30-4**).

Tabla 31-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_5 de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap a las 24 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0,1	1,50E+8	a*
100	1,50E+8	a
1	1,40E+8	ab
0	1,28E+8	ab
10	8,42E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Clorhidrato de cartap a las 24 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0,1; 100; 1 y 0 ppm, en el “b”, está la dosis 1; 0 y 10 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_5 presentó el de 0,1 ppm con 150000000 UFC/mL y el de 10 ppm el que menor número presentó con 84166667 UFC/mL (Tabla 31-4).

Tabla 32-4: Análisis de varianza de las UFC_5 de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Clorhidrato de cartap a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,58	0,14	14,63	0,000349	***
Error	10	0,09	0,01			
Total	14					
CV	1,26					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Clorhidrato de cartap a las 48 h ($P < 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,26 (Tabla 32-4).

Tabla 33-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Clorhidrato de cartap a las 48 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
100	1,50E+8	a*
0	1,21E+8	ab
0,1	8,80E+7	bc
1	6,45E+7	c
10	4,25E+7	c

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Clorhidrato de cartap a las 48 h evidenció tres grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 100 y 0 ppm, en el “b”, está la dosis 0 y 0,1 ppm, en el “c”, está la dosis 0,1;1 y 10 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC_S presentó el de 100 ppm con 150000000 UFC/mL y el de 10 ppm el que menor número presentó con 42500000 UFC/mL (**Tabla 33-4**).

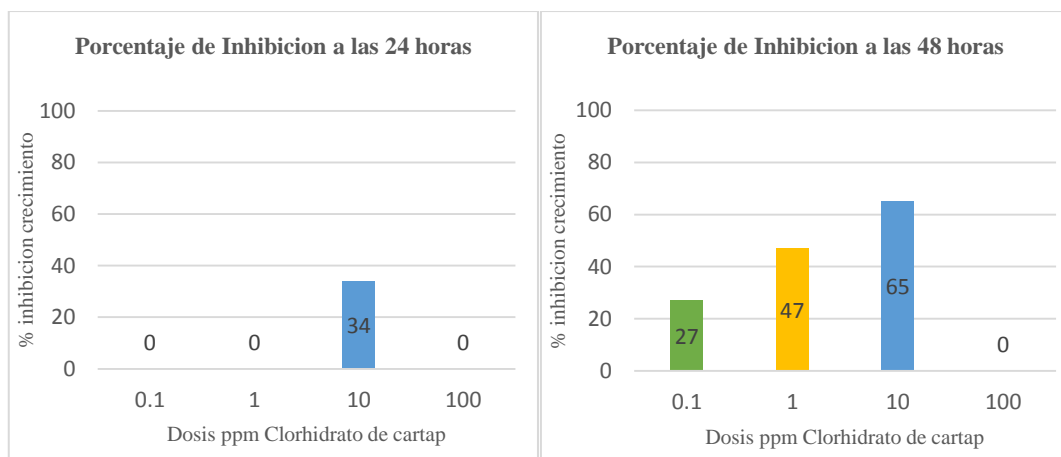


Ilustración 16-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Clorhidrato de cartap vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de clorhidrato de cartap sobre *B. subtilis* a las 24 h no mostró efecto inhibitorio en el crecimiento de UFC_S a excepción de la dosis de 10 ppm cuyo porcentaje de inhibición fue de 34% (**Ilustración 16-4**) sin embargo a las 48 h se presentó un descenso en el número de colonias lo que generó un incremento en los porcentajes de inhibición de 27%, 47% y 65% para las dosis de 0,1; 1 y 10 ppm, únicamente la dosis de 100 ppm no presentó inhibición en ningún momento.

4.1.1.9 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Glifosato.

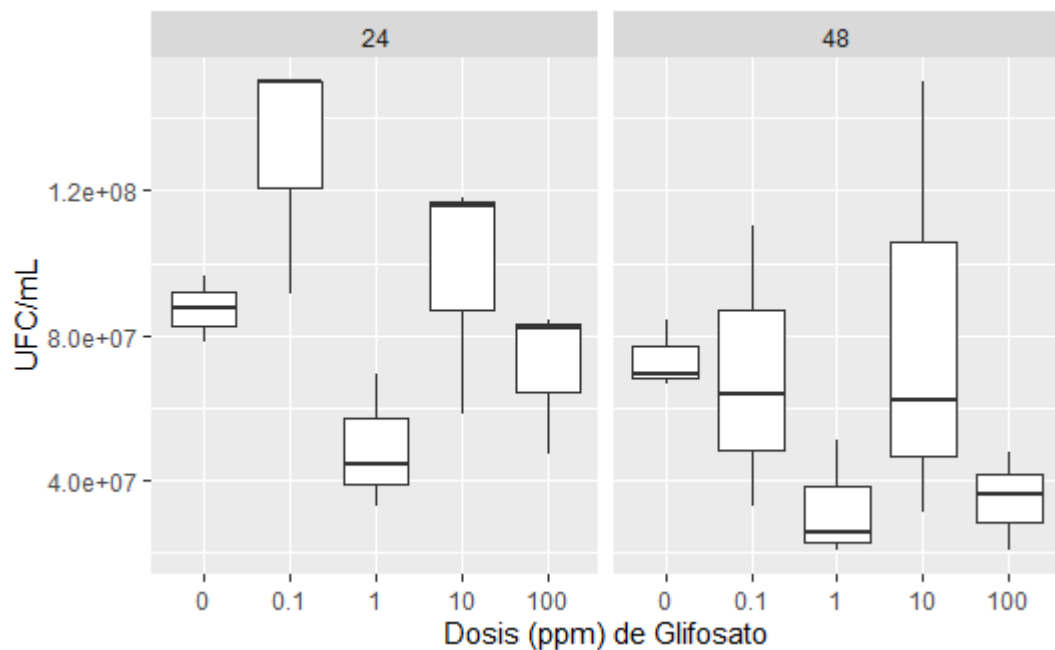


Ilustración 17-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Glifosato a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 34-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Glifosato a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,31	0,08	4,16	0,0306	*
Error	10	0,19	0,02			
Total	14					
CV	1,74					

Códigos de significancias: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las dosis de Glifosato a las 24 h (P<0,05) y el coeficiente de variación fue 1,74 (**Tabla 34-4**).

Tabla 35-4: Test de Tukey al 0,05 de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Glifosato a las 24 h.

Dosis	Número de UFC/mL	Rango de significancia
0,1	1,31E+8	a*
10	9,75E+7	ab
0	8,73E+7	ab
100	7,10E+7	ab
1	4,90E+7	b

*Letras iguales denotan medias sin diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 0,05.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

La prueba de Tukey al 0,05 para las distintas dosis de Glifosato a las 24 h evidenció dos grupos estadísticos, en el “a”, está la dosis 0,1;10;0 y 100 ppm, en el “b”, está la dosis 10; 0; 100 y 1 ppm. Siendo el tratamiento que mayor número de UFC₅ presentó el de 0,1 ppm con 130500000 UFC/mL y el de 1 ppm el que menor número presentó con 49000000 UFC/mL (**Tabla 35-4**).

Tabla 36-4: Análisis de varianza de las UFC₅ de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Glifosato a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,40	0,10	1,87	0,191	n.s
Error	10	0,53	0,05			
Total	14					
CV	3,01					

Códigos de significancias: 0 ‘****’ 0,001 ‘***’ 0,01 ‘**’ 0,05 ‘.’ 0,1 ‘.’ 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indico que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Glifosato a las 48 h (P>0,05) y el coeficiente de variación fue 3,01 (**Tabla 36-4**).

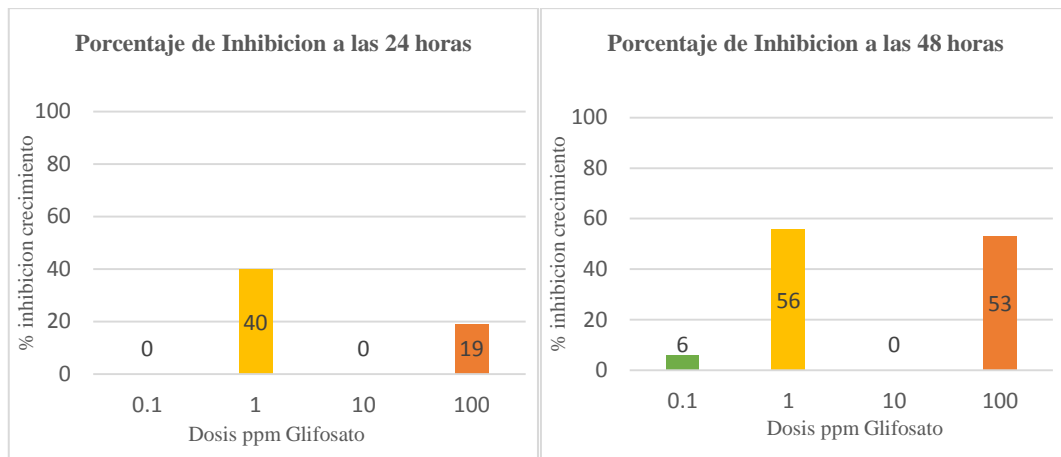


Ilustración 18-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Glifosato vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de glifosato sobre *B. subtilis* a las 24 h indicó efecto inhibitorio en el crecimiento de UFC_S con la dosis de 1 y 100 ppm con porcentajes de 40% y 19% (**Ilustración 18-4**). A las 48 h se produjo un descenso en el número de colonias alcanzando un porcentaje de inhibición de 6%, 56% y 53% para las dosis de 0,1; 1 y 100 ppm frente al control (dosis 0 ppm).

4.1.1.10 Crecimiento de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Deltametrina.

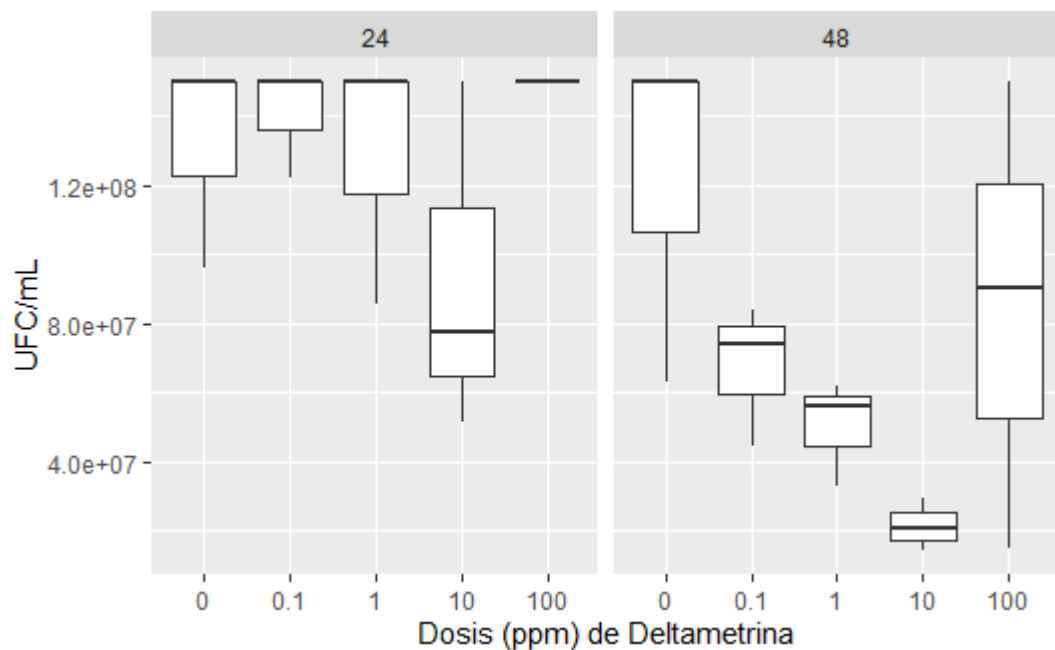


Ilustración 19-4. Boxplot de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones de Deltametrina las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Tabla 37-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Deltametrina a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,11	0,03	1,59	0,251	n.s
Error	10	0,18	0,02			
Total	14					
CV	1,66					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 . 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Deltametrina a las 24 h ($P > 0,05$) y el coeficiente de variación fue 1,656832 (**Tabla 37-4**).

Tabla 38-4: Análisis de varianza de las UFC_S de *Bacillus subtilis* frente a distintas concentraciones Deltametrina a las 48 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(<F)	
Dosis	4	0,87	0,22	2,765	0,0875	n.s
Error	10	0,78	0,08			
Total	14					
CV	3,63					

Códigos de significancias: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 ' ' 1 n.s (no significancia)

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El análisis de varianza indico que no existieron diferencias significativas entre las dosis de Deltametrina a las 48 h ($P>0,05$) y el coeficiente de variación fue 3,63 (Tabla 38-4).

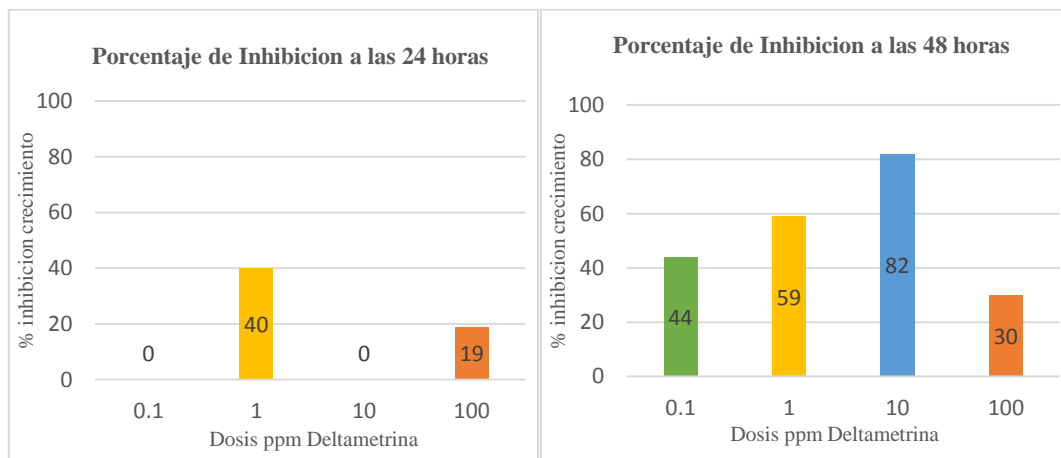


Ilustración 20-4. Inhibición del crecimiento de UFC_S a diferentes dosis de Deltametrina vs el control (dosis 0 ppm) a las 24 y 48 h.

Realizado por: Ruiz, K, 2023

El uso de deltametrina sobre *B. subtilis* evidenció un efecto inhibitorio en el crecimiento de UFC_S con la dosis de 1 y 10 ppm con porcentajes de 35 y 30% a las 24 h (Ilustración 20-4). A las 48 h se presentó un efecto inhibitorio superior con todas las dosis con porcentajes de inhibición de 44%, 59%, 82% y 30% para las dosis 0,1; 1,10 y 100 ppm.

4.1.2 Análisis de las características cualitativas de las UFC_S de *Bacillus subtilis*

Tabla 39-4. Características de las colonias expuestas a Azadiractina.

Azadiractina	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Convexa	Redondeado Irregular	-
10 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-
1 ppm	Crema	Planoconvexa	Lobulado Redondeado	-
0,1 ppm	Crema	Convexa	Redondeado Rizoide	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC_S de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Azadiractina no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue convexa en todas las concentraciones a excepción de la dosis de 1 ppm que fue planoconvexa, se evidenciaron colonias con borde redondeado con todas las dosis usadas y algunas con borde irregular, lobulado y rizoide en las dosis de 100, 1 y 0,1 ppm. No hubo presencia de pigmentos difusibles (ANEXO C).

Tabla 40-4. Características de las colonias expuestas a Propamocarb.

Propamocarb	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Umbonada convexa	Ondulado Lobulado	-
10 ppm	Crema	Umbonada Convexa	Ondulado	-
1 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado Redondeado	-
0,1 ppm	Crema	Convexa	Ondulado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado Lobulado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC_S de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Propamocarb no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue convexa en todas las

concentraciones a excepción de la dosis de 1 ppm que fue umbonada al igual que en la dosis de 100 y 10 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado, redondeado y lobulado. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO D**).

Tabla 41-4. Características de las colonias expuestas a Dimetomorf.

Dimetomorf	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Ondulado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado	-
1 ppm	Crema	Plana Convexa	Ondulado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado Filamentoso	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC_S de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Dimetomorf no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 100, 10 y 0,1 ppm, plana en la dosis de 1 ppm y convexa en las dosis de 1 y 0 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado y redondeado, solo la dosis con 0,1 ppm presento borde filamentoso. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO E**).

Tabla 42-4. Características de las colonias expuestas a Azoxystrobin.

Azoxystrobin	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Ondulado	-
1 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Ondulado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado Ondulado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC_S de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Azoxystrobin no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 100, 10

y 0,1 ppm, y convexa en las dosis de 1 y 0 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado y redondeado. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO F**).

Tabla 43-4. Características de las colonias expuestas a Boscalid.

Boscalid	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Plana	Ondulado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado	-
1 ppm	Crema	Plana	Ondulado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC_S de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Boscalid no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 10 y 0,1 ppm, plana en la dosis de 100 y 1 ppm y convexa en la dosis de 0 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado y redondeado en la dosis de 0 ppm. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO G**).

Tabla 44-4. Características de las colonias expuestas a Sulfato cuprocálcico.

Sulfato cuprocálcico	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Ondulado	-
1 ppm	Crema	Plana Umbonada	Ondulado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Erosionado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado Lobulado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC_S de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Sulfato cuprocálcico no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 10, 0,1 y 1 ppm y convexa en la dosis de 0 y 100 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado y redondeado en la dosis de 0 ppm, solo la dosis de 0,1 ppm presentó colonias con borde erosionado. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO H**).

Tabla 45-4. Características de las colonias expuestas a Difenoconazol.

Difenoconazol	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Plana Convexa	Lobulado Rizoide Redondeado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Lobulado	-
1 ppm	Crema	Umbonada	Lobulado Rizoide	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Erosionado Redondeado Lobulado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC₅ de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Difenoconazol no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 10, 1 y 0,1 ppm y convexa en la dosis de 100 y 0 ppm, se evidenciaron colonias con borde lobulado y redondeado, rizoide en la dosis de 100 y 1 ppm y erosionado con la dosis de 0,1 ppm. No hubo presencia de pigmentos difusibles (ANEXO I).

Tabla 46-4. Características de las colonias expuestas a Clorhidrato de Cartap.

Clorhidrato de Cartap	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Convexa Umbonada	Redondeado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Ondulado	-
1 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC₅ de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Clorhidrato de cartap no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada en todas las dosis a excepción de la de 0 ppm que presentó colonias con elevaciones convexas, se evidenciaron colonias con borde redondeado y ondulado únicamente con la dosis de 10 ppm. No hubo presencia de pigmentos difusibles (ANEXO J).

Tabla 47-4. Características de las colonias expuestas a Glifosato.

Glifosato	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado Redondeado	-
1 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado Lobulado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado Redondeado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC₅ de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Glifosato no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 10, 1 y 0,1 ppm y convexa en la dosis de 100 y 0 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado y redondeado. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO K**).

Tabla 48-4. Características de las colonias expuestas a Deltametrina.

Deltametrina	Color	Elevación	Borde	Pigmentos difusibles
100 ppm	Crema	Convexa Umbonada	Redondeado	-
10 ppm	Crema	Umbonada	Ondulado lobulado	-
1 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado Ondulado	-
0,1 ppm	Crema	Umbonada	Redondeado	-
0 ppm	Crema	Convexa	Redondeado	-

Realizado por: Ruiz, K, 2023

Las UFC₅ de *B. subtilis* expuestas a las diferentes concentraciones de Deltametrina no presentaron diferencias en cuanto a su color, la elevación fue umbonada con las dosis de 100, 10, 1 y 0,1 ppm, convexa en la dosis de 100y 0 ppm, se evidenciaron colonias con borde ondulado y redondeado. No hubo presencia de pigmentos difusibles (**ANEXO L**).

4.2 Discusión

Los pesticidas pueden presentar tres posibles efectos sobre los microorganismos, entre ellos: estimulación, inhibición o un no efecto, sin embargo, su acción puede variar por su concentración, por el tipo de microorganismo o por el ambiente en el que se desarrolla (Dragun, 1998; citado en Calva, 2014: p. 52).

Los resultados obtenidos demostraron el efecto causado en los dos tiempos de exposición (24 y 48 h) de los principios activos sobre la bacteria *B. subtilis*. De acuerdo con la clasificación de la toxicidad de los plaguicidas según el valor de inhibición sobre el crecimiento de colonias propuesto en (Viñuela et al, 1993: p.18), cuando el porcentaje de inhibición de crecimiento es <30% se lo considerara como inofensivo, de 30 a 75% es ligeramente tóxico, de 75 a 90% moderadamente tóxico y mayor a 90% es toxico.

El uso de Azadiractina sobre *B. subtilis in vitro* evidenció una inhibición promedio en el crecimiento de las UFC_S de 31% a las 24 h (**Anexo M**) y 8,25% a las 48 h (**Anexo N**), siendo la dosis de 100 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó, por lo que se lo pudo clasificar como inofensivo. Según Reyes (2013, citado en Flores, 2014: p. 70) el extracto de Neem (azadiractina) posee actividad bacteriostática y bactericida en las bacterias Gram positivas y Gram negativa. Además se reportó que la azadiractina formulada tiene efectos inhibidores en suelos con presencia *Bacillus subtilis* grampositivo (Williams et al., 1998: p. 262).

El uso de propamocarb sobre *B. subtilis in vitro* mostró una inhibición promedio en el crecimiento de las UFC_S de 4,25% a las 24 h (**Anexo M**) y 8,25% a las 48 h (**Anexo N**), siendo la dosis de 100 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó. Los resultados registrados coinciden con lo descrito por Carreño (2020: pp.18-20). en donde propamocarb mostró un efecto inhibitor en el crecimiento de microorganismo benéficos de entre 12,72% y 18,87% durante 10 días, lo que lo mantuvo con una clasificación de inofensivo al igual que en este caso.

El uso de dimetomorf sobre *B. subtilis in vitro* alcanzó una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 52,75% a las 24 h (**Anexo M**) y 57% a las 48 h (**Anexo N**), siendo la dosis de 10 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó, por lo que se le pudo clasificar como ligeramente tóxico. Rivera et al, (2010: pp.94-102) en un estudio realizado del efecto de plaguicidas sobre *A. chroococcum* mencionaron que con las dosis más altas algunos productos estimulan el crecimiento masivo sin afectar la biomasa de la bacteria. Esto puede deberse a que

la molécula del plaguicida no permanece intacta por tiempo indefinido, debido a que con el tiempo sufre una degradación influenciada por el microorganismos (Jáquez et al., 2010: p.7).

El uso de azoxystrobin sobre *B. subtilis in vitro* mostró una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 55,75% a las 24 h (**Anexo M**) y 60,75% a las 48 h (**Anexo N**), siendo la dosis de 100 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó, por lo que se lo pudo clasificar como ligeramente tóxico. Estos resultados concuerdan con los resultados de Silva et al, (2020: pp.95-100) donde azoxystrobin presentó toxicidad a aislados de *B. subtilis* y *B. japonicum* a todas las dosis hasta las 96 horas después de la inoculación. A pesar de que es un producto recomendado para el control de hongos, cuenta con componentes que afectan de forma negativa a las bacterias, como los triazoles que rompen la membrana celular lo que provoca la fuga de solutos iónicos (FRAC-BRASIL; citado en Silva et al, 2014; pp.95-100).

El uso de Boscalid sobre *B. subtilis in vitro* presentó una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 41,5% a las 24 h (**Anexo M**) y 55,25% a las 48 h (**Anexo N**), siendo la dosis de 100 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó, por lo que se lo pudo clasificar como ligeramente tóxico. Los resultados registrados difieren con lo mostrado por Perez (2009; citado en Moreno et al, 2015: p.265). Donde Boscalid no fue considerado toxico para cepas de *Bacillus*, sin embargo, se reportó una inhibición del 100% en algunas cepas de hongos.

El uso de sulfato cuprocalcico sobre *B. subtilis in vitro* presentó una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 74,75% a las 24 h (**Anexo M**) y 88,75% a las 48 h (**Anexo N**), siendo las dosis de 0,1; 1 y 10 ppm las que mayor porcentaje de inhibición presentaron por lo que se lo pudo clasificar como moderadamente tóxico. Los resultados registrados coinciden con lo presentado por (Carreño, 2020: p.24) donde plaguicidas a base de cobre inhibieron el crecimiento de *T. harzianum* en un 94,67 % en condiciones de laboratorio hasta las primeras 72 horas, posterior a este tiempo se el porcentaje se redujo a 76,11% a los 10 días.

El uso de difenoconazol sobre *B. subtilis in vitro* mostró una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 60% a las 24 h (**Anexo M**) y 65,75% a las 48 h (**Anexo N**), siendo las dosis de 1 y 100 ppm las que mayor porcentaje de inhibición presentaron, por lo que se lo pudo clasificar como ligeramente tóxico. Resultados reportados por Gaviria et al, (2013: p.67) indicaron que, al trabajar con dosis de 50, 100 y 150 ppm del fungicida Score 250® EC (difenoconazol) se reportó un efecto inhibitorio de entre el 90 y 100% del crecimiento de microorganismos presentes en el suelo.

El uso de clorhidrato de cartap sobre *B. subtilis in vitro* mostró una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 8,5% a las 24 h (**Anexo M**) y 34,75% a las 48 h (**Anexo N**), siendo las dosis de 10 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó, por lo que se lo pudo clasificar como inofensivo hasta las 24 horas y ligeramente tóxico a las 48 horas. Cartap muestra una alta degradabilidad aeróbica y anaeróbica bacteriana y fúngica en el suelo por lo que se considera que su impacto sobre la microbiota del suelo es moderadamente toxico a nivel del campo en comparación a los resultados a nivel del laboratorio (Iannacone y Alvaríño, 2005: p.92).

El uso de glifosato sobre *B. subtilis in vitro* indicó una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 14,75% a las 24 h (**Anexo M**) y 28,75% a las 48 h (**Anexo N**), siendo las dosis de 1 ppm la que mayor porcentaje de inhibición presentó, por lo que se lo pudo clasificar como inofensivo. Carlisle & Trevors (1986; citado en Bortoli et al., 2012: p.39) mencionó que el glifosato puede presentar dos efectos sobre microorganismos del suelo ya sea estimulando o inhibiendo su biomasa, además se reportó una acelerada reducción de 19% de actividad microbiana con concentraciones altas de glifosato en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la actividad microbiana respondió de manera diferencial a la aplicación de este producto.

Al usar deltametrina sobre *B. subtilis in vitro* se evidenció una inhibición promedio en el crecimiento de UFC_S de 8,25% a las 24 h (**Anexo M**) y 53,75% a las 48 h (**Anexo N**), siendo las dosis de 1 y 10 ppm las que mayores porcentajes de inhibición presentó por lo que se lo pudo clasificar como inofensivo a las 24 horas y como ligeramente tóxico a partir de las 48 h, lo que concuerda con lo descrito por (Bhuaneshwari et al, 2018: pp.15-21).donde se realizó un estudio de degradación a corto plazo y se encontró que *Bacillus subtilis* podía crecer en medios suplementados con deltametrina y que la máxima degradación del producto se produjo en dosis superiores a los 100 ppm y pudo alcanzar su punto máximo de degradación a los 8 días posteriores a la exposición del producto.

Dimetomorf y Clorhidrato de cartap no inhibieron el crecimiento de UFC_S con las dosis de 100 ppm en comparación al control (dosis de 0 ppm), aun transcurridas las 48 horas, por lo que es posible deducir que se generó alguna sustancia o metabolito secundario *in vitro* lo que favoreció el desarrollo de la bacteria con las dosis más altas (Gallego et al., 2014: p. 183).

De acuerdo con Rivera et al., (2010: pp.94-102) al realizar pruebas con plaguicidas en laboratorio estos pueden tener dificultades para difundirse en el agar en la prueba por diferentes razones, como, la porosidad, procesos de adsorción, naturaleza del compuesto químico, solubilidad,

viscosidad, reactividad química, y más. Esto pudo dificultar la exposición de la bacteria a plaguicidas como propamocarb, dimetomorf, difenoconazol, clorhidrato de cartap y glifosato con algunas dosis, lo que hizo que no se refleje un descenso en el crecimiento de *B. subtilis*.

Es importante mencionar que según autores ya mencionados *B. subtilis* cuenta con mecanismos de resistencia utilizados por ciertos grupos de hongos para sobrevivir a la acción de diferentes fungicidas y otros productos de origen químico, aunque la sensibilidad de los microorganismos y el efectos de los plaguicidas varía de acuerdo a la técnica con la que se evalúa ya que muchos autores sugieren que la sensibilidad de la bacteria puede ser mucho más baja a nivel de campo que en condiciones *in vitro*.

Por otro lado, en el caso del análisis cualitativo, las UFC₅ de *Bacillus subtilis* las colonias presentaron color crema en todos los casos y no hubo presencia de pigmentos difusibles. Las colonias tuvieron características semejantes en presencia de todos los productos de forma independiente a la dosis que se usó y presentaron elevaciones convexa, planoconvexa o umbonada, respecto al borde el más común fue redondeado, ondulado y lobulado.(Calvo y Zúñiga, 2010: p.52) en su estudio reportaron que la apariencia colonias de *Bacillus* presentaron forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes de las colonias varía entre aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada; las elevaciones de la colonias suelen ser planas o acuminadas lo cual coincide con los resultados registrados.

De acuerdo con Mendez et al., (2017, p.101) las bacterias del genero *Bacillus* cuentan con la presencia de endosporas bacterianas mismas que le proporcionan una estructura de resistencia que puede permanecer viable por largos lapsos de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para su desarrollo esto le permite a las especies de este género estar presente en un diferentes hábitats.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Los ingredientes activos con mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las UFC₅ *B. subtilis*. fueron Dimetomorf, Azoxystrobin, Boscalid, Deltametrina, Sulfato cuprocalcico y difenoconazol, siendo los dos últimos los que mayor efecto de inhibición presentaron por lo que se los catalogó como ligera y moderadamente tóxicos.
- Los ingredientes activos con menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las UFC₅ *B. subtilis*. fueron Azadiractina, Propamocarb, clorhidrato de cartap y glifosato por lo que se los catalogó como inofensivos. Sin embargo, Azadiractina, propamocarb y clorhidrato de cartap son lo que menor efecto de inhibición presentaron transcurridas las 48 h.
- El análisis de las características cualitativas de las UFC₅ de *B. subtilis* evidenció que ningún plaguicida afecto la morfología de las colonias.

5.2 Recomendaciones

- Realizar más estudios que faciliten la comprensión de los efectos de los productos agroquímicos sobre microorganismos que actúen como agentes de control biológico para evaluar su comportamiento.
- Llevar a cabo pruebas que contribuyan a conocer el potencial de degradación de sustancias químicas de *B. subtilis* y otros microorganismos para conocer la compatibilidad que puede existir entre ciertos plaguicidas y el medio agrícola.
- Realizar ensayos con Azadiractina, propamocarb y clorhidrato de cartap a nivel de campo para comprobar la compatibilidad de los ingredientes activos con *B. subtilis*.

GLOSARIO (OPCIONAL)

Abreviaturas

ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
H	Hora
MI	Mililitro
Ppm	Parte por millón
UFC	Unidad formadora de colonia
mL	Microlitro
AN	Agar Nutritivo
FRAC	Comité de acción de resistencia a fungicidas
IRAC	Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas

Términos

Biocida: Sustancias o compuestos conformadas por sustancias activas que tienen como fin destruir, contrarrestar, neutralizar; es decir controlan a un organismo nocivo, ya sea con acción física o mecánica (Ministerio para la Transición Ecológica, 2020, p. 1).

Concentración: Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es el mol por metro cúbico (mol/m^3) (RAE, 2021, p. 1).

Dosis: Es una ración o una cantidad de algo (Definición. De, 2018, p. 1).

Efecto inhibitorio: Capacidad para inhibir o controlar las respuestas impulsivas (o automáticas) (Cognifit, 2021, p. 3).

Ingrediente activo: Nombre genérico de la parte biológicamente activa (que ejerce una acción específica sobre el organismo blanco) del plaguicida, y con el cual se importa al país (Manual de plaguicidas de Centroamérica, 2021, p. 1).

Sensibilidad: Predicción a través de una prueba in vitro, para observar la respuesta del paciente a un determinado principio activo, la evolución de una enfermedad y detectar una resistencia relevante del organismo que está causando este proceso infeccioso (Westreicher, 2020, p. 1).

Stock: Es una cantidad de bienes o productos, con la que se parte para la venta o distribución de un objeto (Westreicher, 2020, p. 1).

BIBLIOGRAFÍA

BENITEZ, N., VIVAS, D., ROSERO, E. “Toxicity of the main pesticides used in popayán valley with *Bacillus subtilis*”. *Scielo*. Vol 7, No. 1 (2009) pp. 17-19. [Consulta: 22 septiembre 2022]. ISSN 1692-3561

BHUVANESHWARI, S., GHANA, D., THATHEYUS, J. “Biodegradation of the synthetic pyrethroid pesticide deltamethrin by *Bacillus subtilis*”. *Revista Internacional de Investigaciones Multidisciplinarias*. Vol 4, No. 9 (2019) pp. 15-21. [Consulta: 16 febrero 2023]. ISSN 2349-8684

BÓRTOLI, P., VERDENELLI, R., CONFORTO, C., VARGAS, S., MERILES, J “Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo”. *Scielo*. Vol 22, No. 1 (2012) pp. 33-42. [Consulta: 16 febrero 2023]. ISSN 1692-3565

CALVA, M. Biodegradación de plaguicidas en suelos agrícolas de tepetitla por bioestimulación y bioaumentación. (Trabajo de titulación) Instituto Politécnico Nacional Centro De Investigación En Biotecnología Aplicada, Tepetitla de Lardizábal. 2014, p. 52 [Consulta: 01 febrero 2023]. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/30080/MARIA%20LILIA%20CALVA%20RODRIGUEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CALVO, P. y ZÚÑIGA, D. “Physiological characterization of *Bacillus spp.* strains from potato (*solanum tuberosum*) rhizosphere”. *Ecología Aplicada* [en línea], 2010, vol. 9, no. 1, p. 52 [Consulta: 22 septiembre 2022]. ISSN 1726-2216. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004

CARREÑO, R. Efecto de plaguicidas sobre el crecimiento, *in vitro*, de dos cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai y una de *Paecilomyces* (Trabajo de titulación) Universidad de Tarapacá, Arica, Chile. 2020. pp. 18-20 [Consulta: 16 febrero 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uta.cl/jspui/bitstream/123456789/862/1/79066-Carre%C3%B1o%20Rodrigo.pdf>

COBO, C. Evaluación de medios líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis* [en línea] (Trabajo de titulación) Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito, Ecuador. 2017. p. 21 [Consulta: 11 septiembre 2022]. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>.

COGNIFIT. *Inhibición.* [en línea] 2021. p. 3. [Consulta: 15 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.cognifit.com/es/habilidad-cognitiva/inhibicion>.

CONTROL BIO. *Uso de Bacillus subtilis como biofungicida en agricultura y jardinería.* [blog]. [Consulta: 12 septiembre 2022]. Disponible en: https://controlbio.es/es/blog/c/76_uso-de-bacillus-subtilis-como-biofungicida-en-agricultura-y-jardineria.html.

DE LIÑÁN, C. *Azadiractina. Vademécum de México.* [en línea]. México: Portal Tecniagrícola, [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.buscador.portaltecnologico.com/vademecum/mex/producto-tecnico/7953/AZADIRACTINA>.

DEFINICION. DE. *Dosis* [en línea]. 2010. p. 1. [Consulta: 11 marzo 2022]. Disponible en: <https://definicion.de/dosis/>

DUEÑAS, M., ESTRADA, J., MORALES, N. y CATILLO, B. Temas de Ciencia y Tecnología [en línea], vol. 11, no. 33, pp. 55. [Consulta: 18 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.utm.mx/~temas/temas-docs/nota2t33.pdf>.

ESCUADERO, M., MONTOYA, M., VILLEGAS, J. y TORRES, J. Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas Qoi – fenamidone: Caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín, Colombia, 2007 vol. 62, no. 1, pp. 4773-4782

FAO. *Los fertilizantes, en cuanto contaminantes del agua. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos.* (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55) [en línea]. 1997 pp. 1-17. [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w2598s/w2598s05.htm>.

FMCAGRO. *Clasificación de los modos de acción de FRAC e IRAC.* [en línea]. FMC España 2019, pp. 8-15 [Consulta: 7 noviembre 2022]. Disponible en: <https://fmcagro.es/blog/ver-entrada/clasificacióndelosmodosdeaccióndeFRACeIRAC>.

GALLEGO, J., CARDONA, N., RESTREPO, F. “Compatibility of the entomopathogenic fungus *Purpureocillium sp.* cepa UdeA0106 with biocontrollers fungi and plant protection products, used on *chrysanthemum crops*”. *Scielo*. Vol 36, No. 101 (2014) p. 183 [Consulta: 16 febrero 2023]. ISSN 1352-3561

GUILLEN, A. *Morfología colonial – Microbiología.* [en línea]. 2020. [Consulta: 20 diciembre 2022]. Disponible en: <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>.

HORTOCAMPO. *Glifosato (sal isopropilamina)*: [blog]. 2022, p. 1. [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.hortocampo.com/principio-activo/glifosato-sal-isopropilamina-36>.

IANNACONE, J., ALVARIÑO, L., “Selectivity of the cartap insecticide employing bioassays with non target organism”. *Scielo*. Vol 4, No. 1 (2005) p.95 [Consulta: 14 febrero 2023]. ISSN 1726-5474

IRET. *Deltametrina*. [blog]. 2022, p. 1. [Consulta: 14 septiembre 2022]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/171-deltametrina>.

IRET. *Dimetomorf*. [blog]. 2022, p. 1. [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/200-dimetomorf>.

IRET. *Sulfato cuprocálcico*. [blog]. 2022, p. 1. [Consulta: 14 septiembre 2022]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/499-sulfato-cuprocálcico>.

KOVÁCS, Á.T. “*Bacillus subtilis*”. *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 8 (2019) pp. 724-725. ISSN 18784380. DOI 10.1016/J.TIM.2019.03.008.

LIFEDER. *Bacillus subtilis: qué es, taxonomía, morfología, características*. [en línea]. 2015, p. 1 [Consulta: 10 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/bacillus-subtilis/>.

LIÑAN, C. *Azoxystrobin. Vademécum de México*. [en línea]. México: Portal Tecnigrícola. [en línea]. 2022 [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.buscador.portaltecnogrícola.com/vademecum/mex/producto-tecnico/8393/AZOXYSTROBIN>.

MADIGAN, M.T. y MARTINKO, J.M. “Biology of Microorganisms”. Eleventh E [en línea], 2006, p. 992. [Consulta: 11 septiembre 2022]. Disponible en: <https://colombia.inaturalist.org/taxa/245605-Bacillus-subtilis>.

MANUAL DE PLAGUICIDAS DE CENTROAMERICA. *Características generales y agronómicas*. [en línea] (2021). UNA. (Costa Rica), p. 1. [Consulta: 11 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/caracteristicasgenerales->

yagronomicas#:~:text=Ingrediente%20activo%20(i.a.)%20(4,cual%20se%20importa%20al%20p a%C3%ADs.

MENDEZ, J., FLORES, M., PARAMO, L. “Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and evaluation of antagonism in vitro against phytopathogenic fungi”. *Nexo*. Vol 30, No. 2 (2009) pp. 96-110. [Consulta: 14 febrero 2023]. ISSN 1995-9516

MICROBEWIKI. *Bacillus subtilis* - *microbewiki*. [en línea]. 2015 ,p. 8 [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis.

MINISTERIOS DE TRANSICION ECOLOGICA. *Que es un biocida* [en línea]. España: 2020, p. 1. [Consulta: 03 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-yevaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/>

MORENO, L., BELMONTE, J., GON DON, H., GÚZMAN, R., MENDOZA, B. “In vitro sensitivity of two species of *Sclerotinia spp.* and *Sclerotium cepivorum* to agents of biological control and fungicides”. *Scielo*. Vol 33, No. 2 (2015) pp. 17-19. [Consulta: 22 septiembre 2022]. ISSN 256-267

NAVAS, I. y GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. *Plaguicidas y biocidas: generalidades, clasificación toxicológica y de riesgos, legislación europea aplicable*. [en línea], 2022 [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed.

NEWTON, R. y AMSTUTZ, J. 2020. “La formación de biopelículas por *Bacillus subtilis* se altera en presencia de pesticidas.” [en línea], 2020, pp. 1-9. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/msar/v48n2/0122-9761-mar-48-02-71.pdf>

NPIC. *Ingredientes activos de plaguicidas*. [en línea], 2015 [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <http://npic.orst.edu/ingred/active.es.html>.

POINT CHILE. *Cartap 50% WP - Point Chile* [en línea]. 2021, p.1 [Consulta: 18 septiembre 2022]. Disponible en: <https://point.cl/producto/cartap-50-wp/>.

RAE. *Concentración* [en línea]. 2021, p. 1. [Consulta: 10 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://dle.rae.es/concentraci%C3%B3n>

RIVERA, D., CAMELO, M., ESTRADA, G., OBANDO, M. y BONILLA, R. 2010. “Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*”. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], vol. 12, no. 1, (2010) pp. 94-102. [Consulta: 18

septiembre 2022]. ISSN 0123-3475. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752010000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

ROCAFULL, Y., RODRIGUEZ, J., ORTEGA, M., VEITÍA, M., FERNANDEZ, R., FEY, L. y DIBUT B. Efecto de plaguicidas químicos frente a microorganismos de interés agrícola. [en línea]. 2012, p. 6. [Consulta: 30 octubre 2022]. Disponible en: https://www.grupoagricoladecuba.gag.cu/media/Agrotecnia/pdf/36_2012/Revista2/11.pdf.

SÁNCHEZ, F. “Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value”. *Bionatura* [en línea], vol. 1, no. 3, (2016) pp. 1. [Consulta: 18 septiembre 2022]. Disponible en: <http://www.revistabionatura.com>.

SCHOCH, C.L., CIUFO, S., DOMRACHEV, M., HOTTON, C.L., KANNAN, S., KHOVANSKAYA, R., LEIPE, D., MCVEIGH, R., O’NEILL, K., ROBERTSE, B., SHARMA, S., SOUSSOV, V., SULLIVAN, J.P., SUN, L., TURNER, S. y KARSCHMIZRACHI, I. *NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools.* Database, vol. 7, (2020), p. 22. ISSN 17580463. DOI 10.1093/DATABASE/BAAA062.

SETLOW. “Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals”. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, no. 3, (2006) pp. 514-525. ISSN 13645072. DOI 10.1111/J.1365-2672.2005.02736. X.

SYNGENTA. *Score® 250 EC - Fungicidas Syngenta.* [en línea]. 2021, p.1 [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.syngenta.cl/product/crop-protection/fungicidas/score-r-250-ec-1>.

TERRALIA. BOSCALID: Agroquímicos de México. [en línea]. 2022, p.1 [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: https://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/view_composition?composition_id=12957.

ULIBARRY, P.G. *Función y toxicidad de los ingredientes activos Clasificación de toxicidad Ia e Ib.* [en línea], 2019 pp. 1. [Consulta: 18 septiembre 2022]. Disponible en: <http://bcn.cl/26jqf>.

VILLARREAL, F., VILLA, E., CIRA, L. y ESTRADA, M. *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola.* [en línea], 2017 [Consulta: 12 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v36n1/2007-8080-rmfi-36-01-95-en.pdf>.

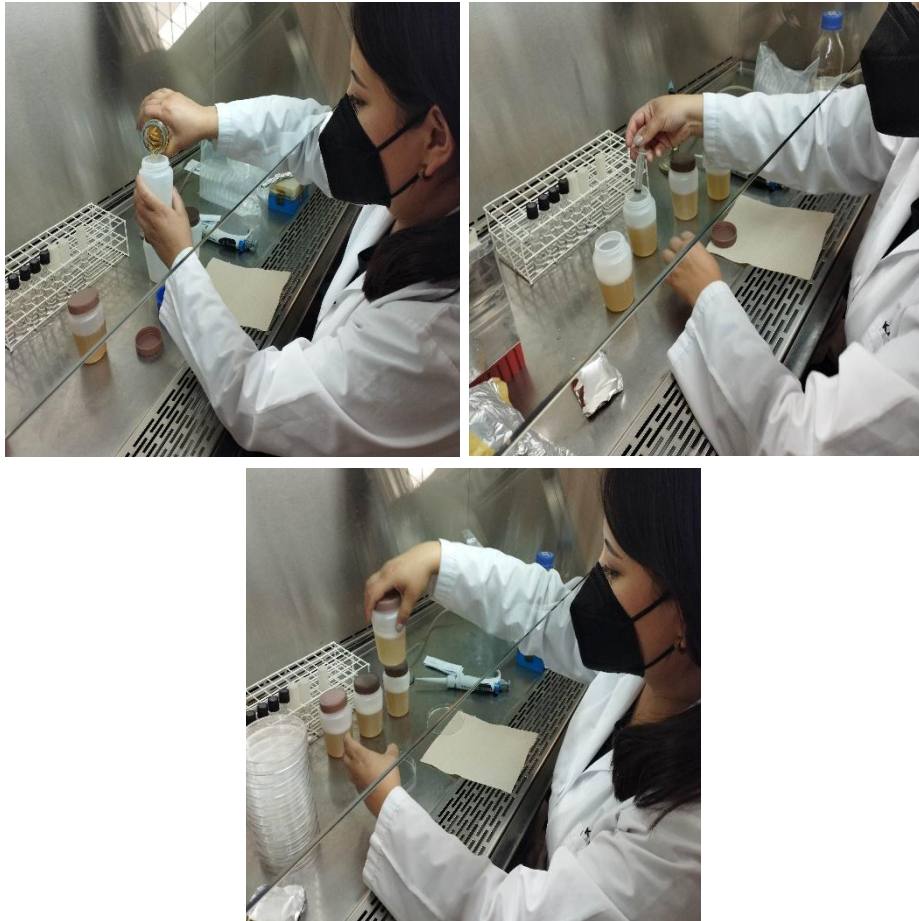
WESTREICHER, G. *Sensibilidad* [en línea]. Economipedia, 2020, p. 1. [Consulta: 15 marzo 2022]. Disponible en: <https://economipedia.com/definiciones/sensibilidad.html>.

WILLIAMS, R., PENG, S., CHUANG, Y., DOI, H. “The inhibitory effect or azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. J Invert Pathol”. *Mussen EC*. 1998; volume. p. [Consulta: 12 febrero 2022. ISSN: 0022-2011



ANEXOS

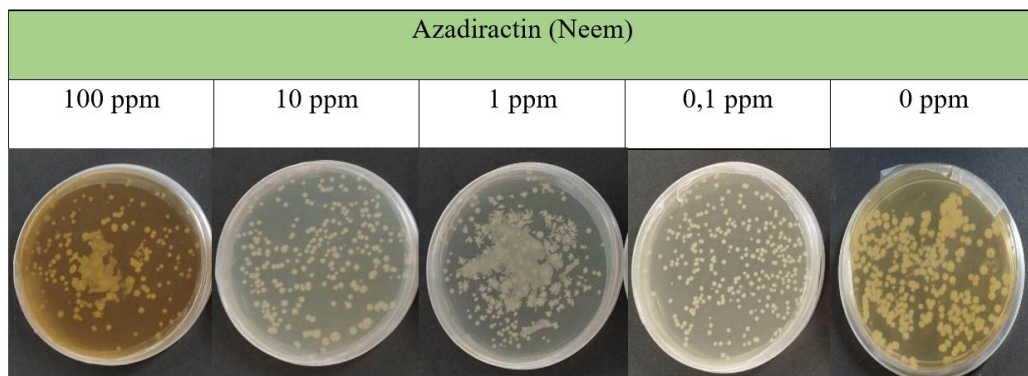
ANEXO A: PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y ADICIÓN DE CONCENTRACIONES DE PLAGUICIDAS.



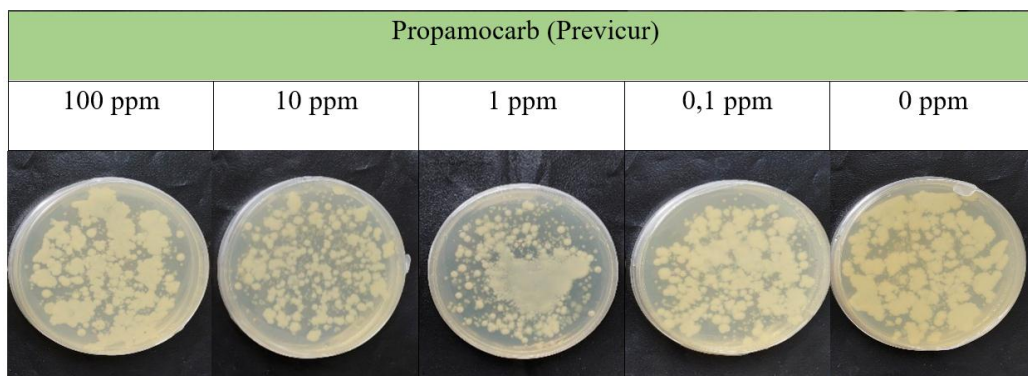
ANEXO B: SIEMBRA DE *Bacillus subtilis* AL MEDIO DE CULTIVO.



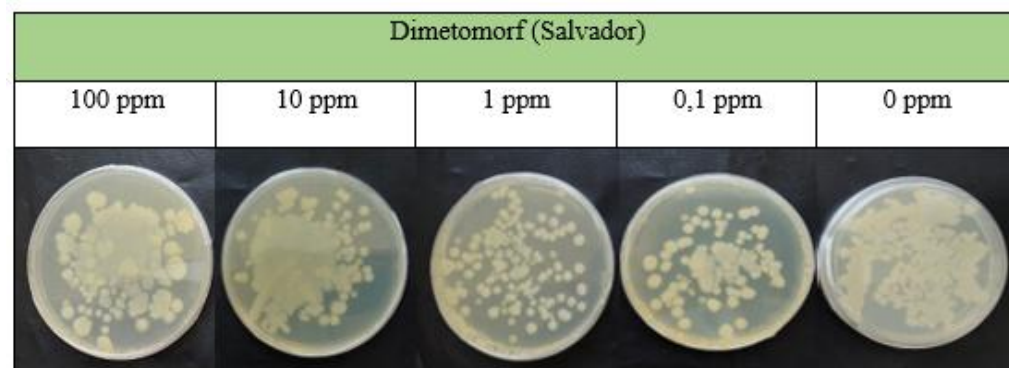
ANEXO C: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A AZADIRACTINA



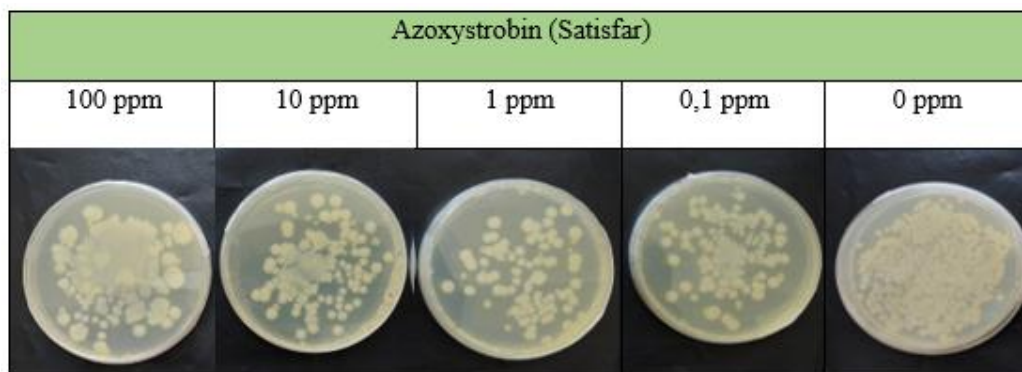
ANEXO D: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A PROPAMOCARB



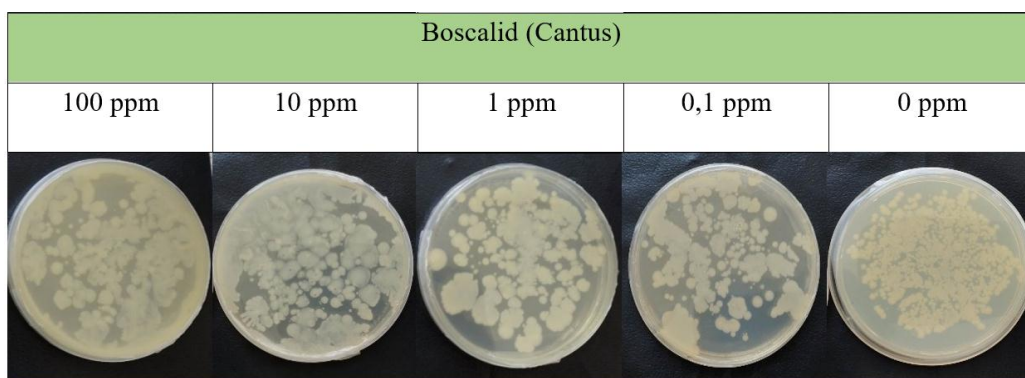
ANEXO E: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DIMETOMORF



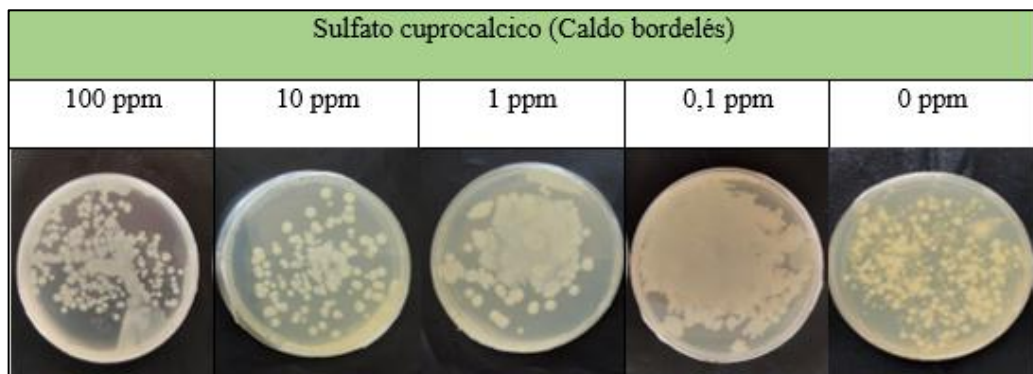
ANEXO F: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A AZOXYSTROBIN



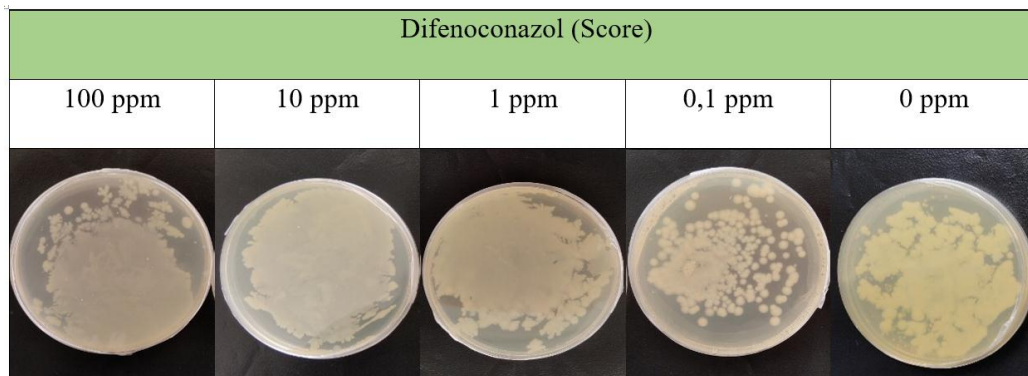
ANEXO G: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A BOSCALID



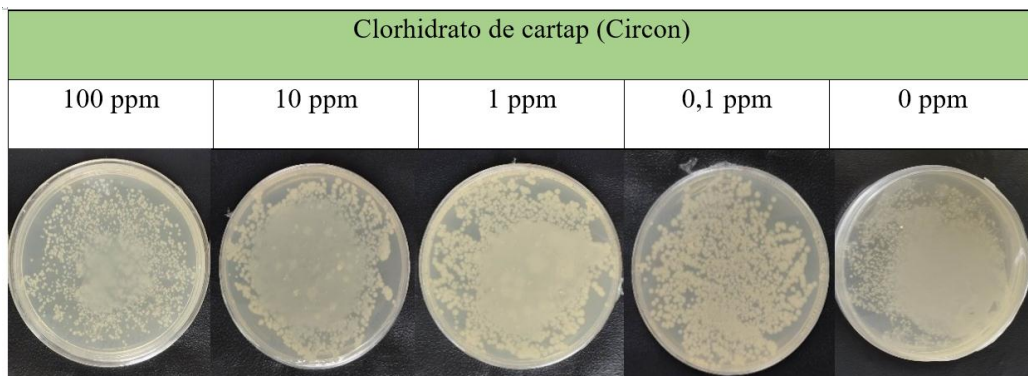
ANEXO H: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A SULFATO CUPROCALCICO



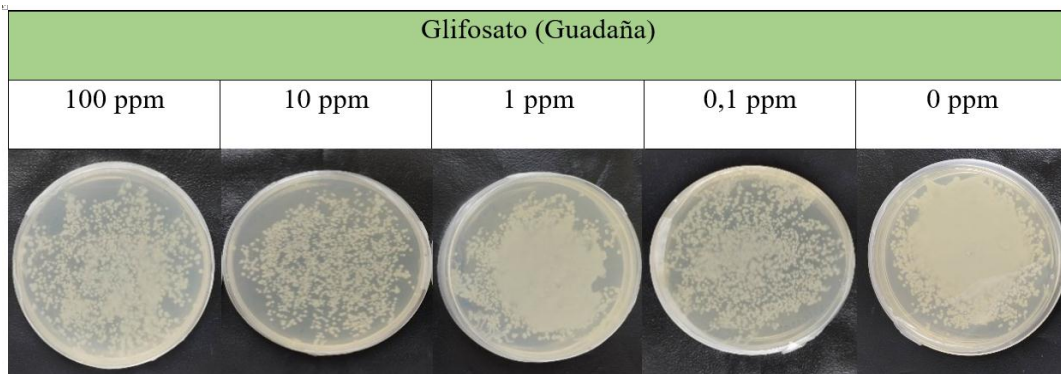
ANEXO I: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DIFENOCONAZOL



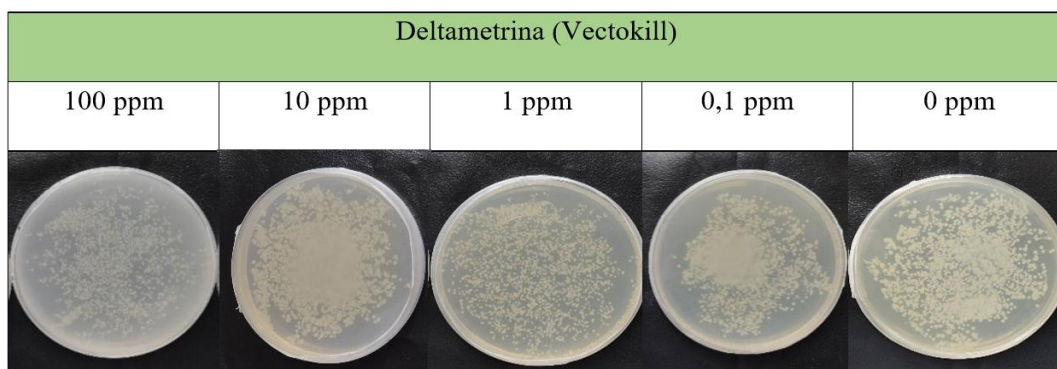
ANEXO J: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A CLORHIDRATO DE CARTAP



ANEXO K: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DIFENOCONAZOL



ANEXO L: CRECIMIENTO DE UFC DE *Bacillus subtilis* FRENTE A DELTAMETRINA



**ANEXO M: PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LAS DOSIS DE LOS PRINCIPIOS
ACTIVOS VS EL CONTROL (DOSIS 0 PPM) A LAS 24 H.**

Principio activo usado	Dosis					% inhibición promedio
	0	0,1	1	10	100	
Azadiractina	Control	28	38	13	45	31
propamocarb	Control	0	4	0	13	4,25
Dimetomorf	Control	67	76	68	0	52,75
Azoxystrobin	Control	57	43	56	67	55,75
Boscalid	Control	42	38	37	49	41,5
Sulfato cuprocálcico	Control	80	89	89	41	74,75
Difenoconazol	Control	60	94	0	86	60
Clorhidrato de cartap	Control	0	0	34	0	8,5
Glifosato	Control	0	40	0	19	14,75
Deltametrina	Control	0	3	30	0	8,25

Realizado por: Ruiz, K, 2023

**ANEXO N: PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LAS DOSIS DE LOS PRINCIPIOS
ACTIVOS VS EL CONTROL (DOSIS 0 PPM) A LAS 48 H.**

Principio activo usado	Dosis					% inhibición promedio
	0	0,1	1	10	100	
Azadiractina	Control	0	5	0	28	8,25
propamocarb	Control	0	0	0	33	8,25
Dimetomorf	Control	74	76	78	0	57
Azoxystrobin	Control	64	48	57	74	60,75
Boscalid	Control	53	55	54	59	55,25
Sulfato cuprocálcico	Control	90	92	92	81	88,75
Difenoconazol	Control	76	97	0	90	65,75
Clorhidrato de cartap	Control	27	47	65	0	34,75
Glifosato	Control	6	56	0	53	28,75
Deltametrina	Control	44	59	82	30	53,75

Realizado por: Ruiz, K, 2023



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 15 / 06 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Karol Susana Ruiz Tello
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Agronomía
Título a optar: Ingeniera Agrónoma
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

1074-DBRA-UTP-2023