

PROCESO PARA OBTENER UN EXTRACTO BIOCIDA

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se enmarca en el campo de los bioprocesos, particularmente en procesos para obtener extractos bacterianos con actividad biocida.

DESCRIPCION DEL ESTADO DE LA TECNICA

- 10 Se han reportado varios métodos de obtención de extractos activos a partir de microorganismos. El documento US5494809 describe un método para obtener metabolitos secundarios (Iturina A) con actividad antifúngica a partir de bacterias del género *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens*), para lo cual inicialmente se cultiva el microorganismo en un medio de cultivo bajo condiciones aeróbicas a 30°C y agitación de 150 rpm. Luego, el
15 medio de cultivo se filtra para separar la biomasa y la fracción filtrada se pasan por una columna hidrofóbica adsorbente ODS C-18.

- El documento US20160073642 describe un proceso para incrementar la producción de biomasa de microorganismos del género *Bacillus*, entre ellos *Bacillus subtilis* y *Bacillus*
20 *amyloliquefaciens*, así como la de sus metabolitos biológicamente activos (lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas). Los metabolitos activos se extraen mediante procedimientos de extracción con solventes, precipitación, adsorción o cromatografía.

- 25 El documento US9125419 divulga una cepa de *Bacillus* (*Bacillus* sp. F727) aislada y sus metabolitos con actividad biocida. El microorganismo se cultiva empleando un medio de cultivo convencional. Los metabolitos secundarios se extraen del cultivo bacteriano con una resina adsorbente hidrofóbica (Amberlite XAD-7). La resina y las células filtradas se dejan durante 2 horas en acetona, después de lo cual se filtra y se seca al vacío hasta
30 obtener el extracto bacteriano crudo, del cual se pueden obtener fracciones con actividad fungicida.

- Se han reportado estudios para utilizar las bacterias *Bacillus mojavensis*, *Xenorhabdus nematophila*, *Xenorhabdus* sp. y *Photorhabdus* sp. en programas de control de diferentes
35 hongos y protistas generalmente causales de enfermedades en diferentes cultivos. San-Blas (2012)¹ reporta que *Xenorhabdus* sp. y *Photorhabdus* sp., en cultivos axénicos, tienen una acción antifúngica de hasta el 97% sobre el hongo *Moniliophthora roreri*, agente causal de una de las enfermedades más devastadoras en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*). Por

¹ San-Blas, E., Carrillo, Z., & Parra, Y. (2012). Effect of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their exudates on *Moniliophthora roreri*. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 45(16), 1950–1967. doi:10.1080/03235408.2012.718688.

su parte, Fang (2014)² determinó la capacidad antimicrobiana de *Xenorhabdus nematophila* contra *Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*, dos microorganismos causantes de diversas enfermedades en cultivos de hortalizas alrededor del mundo. Los autores probaron los extractos (metabolitos libres de células bacterianas) contra estos patógenos, encontrando
5 que causan una protección a las plantas hasta de un 70%.

La necesidad permanente de buscar nuevos compuestos para satisfacer la demanda de productos con actividad biocida, ha conllevado a los investigadores a desarrollar un proceso más eficiente de obtención de extractos biocidas a partir de diferentes tipos de
10 microorganismos, de forma tal que se amplíe su espectro de acción y sea más viable su escalado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Fotografías correspondientes a diferentes tiempos de observación del extracto UNCSAB03-07-05, el lado izquierdo corresponde al papel filtro con extracto bacteriano, lado derecho corresponde a papel filtro con agua destilada.

FIG. 2 Gráfica del porcentaje de participación de extractos que causan la muerte al 100%
20 de las hormigas a las 24, 48 y más de 48 horas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un proceso para obtener extractos biocidas a partir de
25 microorganismos del género *Bacillus* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp, *Brevundimonas* sp, *Escherichia* sp, *Delftia* sp, *Acinetobacter* sp, *Photorhabdus* sp y *Xenorhabdus* sp, que comprende las etapas de aislamiento y cultivo del microorganismo; preparación de un pre-inóculo y ponerlo en contacto con una resina adsorbente hidrofóbica, y por último, eluir con un solvente orgánico hasta obtener el extracto. Los extractos
30 obtenidos exhiben actividad fungicida, insecticida y/o de repelencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los microorganismos que pueden ser utilizados en el proceso de la presente invención, son
35 aquellos que tengan la capacidad de producir sustancias activas. Bacterias del género *Bacillus* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp, *Brevundimonas* sp, *Escherichia* sp, *Delftia* sp, *Acinetobacter* sp, *Photorhabdus* sp y *Xenorhabdus* sp son bacterias asociadas

² Fang, X., Zhang, M., Tang, Q., Wang, Y., & Zhang, X. (2014). Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* in vitro and in planta. *Scientific Reports*, 4, 4300. doi:10.1038/srep04300

a nematodos entomopatógenos y patógenas de insectos que producen metabolitos secundarios con actividad biocida.

El proceso para obtener extractos bacterianos a partir de dichas bacterias comprende las etapas de:

- a) aislar, purificar y cultivar el microorganismo;
- b) preparar un pre-inóculo del microorganismo;
- c) poner en contacto el pre-inóculo con una resina adsorbente hidrofóbica bajo condiciones ambientales adecuadas; y
- d) separar y eluir la resina con un solvente orgánico hasta obtener el extracto.

La etapa a) del proceso comprende el aislamiento, purificación y cultivo del microorganismo. Para el aislamiento, se colectan individuos de la hormiga *Atta cephalotes*, se maceran en un tubo de ensayo conteniendo esferas de vidrio y agua peptonada, se agitan a 2500-5000 rpm, se realizan diluciones seriadas entre 10^{-1} y 10^{-8} , se siembran en cajas de Petri con medio de cultivo y se incuban a una temperatura entre 20 y 35°C.

El medio de cultivo debe contener fuentes de carbono y nitrógeno o los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo. En una modalidad preferida, el medio de cultivo comprende al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales, buffers y nutrientes.

Para el aislamiento de los microorganismos (v.g. *Xenorhabdus* sp. y *Photorhabdus* sp), se toman individuos juveniles de nematodos entomopatógenos, se inyectan en una larva de *Galleria mellonella* de último instar, a la cual, una vez infectada (entre 2 y 3 días), se le extrae una gota de hemolinfa de la parte inferior de la cabeza. Se siembra en una caja de Petri con medio NBTA que comprende caldo nutritivo, agar, azul de bromotimol, agua y cloruro de trifetil tetrazolium siguiendo la metodología descrita en Stock, P., & Goodrich-Blair, H.³ (2012).

Una vez aisladas las bacterias, se purifican por la metodología de agotamiento o cualquier otra técnica conocida por un técnico en la materia, y se cultivan a las mismas condiciones utilizadas para el aislamiento. Posteriormente se conservan las cepas puras en un congelador entre -80 y -20°C. El cultivo de las bacterias conservadas se realiza en medio de cultivo XG a las condiciones antes mencionadas.

³ Stock, P., & Goodrich-Blair, H. (2012). Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (Second edi., pp. 373 – 423). Academic Press.

La etapa b), denominada preparación del pre-inóculo del microorganismo, consiste en cultivar las bacterias almacenadas en cajas de Petri con medio de cultivo XG con pH entre 5,5 y 8,0. De allí se toman entre 2 y 5 colonias aisladas y se llevan a caldo nutritivo donde se dejan crecer por un periodo entre 18 y 48 horas a una temperatura entre 20 y 35°C y se agitan entre 90 y 200 rpm. El caldo nutritivo debe contener peptona, extracto de carne, extracto de levadura, cloruro de sodio y/o los nutrientes necesarios para permitir el desarrollo del microorganismo. En una modalidad preferida, el caldo nutritivo tiene extracto de carne 1,0 g, extracto de levadura 2,0 g, peptona 5,0 g y cloruro de sodio 5,0 g.

- Una vez obtenido el pre-inóculo continúa la etapa c), donde se inocula un volumen del pre-inóculo en caldo nutritivo en presencia de entre el 2 y 5% de una resina adsorbente hidrofóbica, en condiciones apropiadas (temperatura entre 20 y 35°C y agitación entre 100 y 200 rpm) durante 5 a 10 días. Durante la inoculación las bacterias producen los metabolitos secundarios (alrededor del día 5), pero varía dependiendo del microorganismo utilizado. La resina hidrofóbica permite retener los metabolitos secundarios secretados por las bacterias y evita su degradación. Preferiblemente, la resina adsorbente hidrofóbica es una resina hidrofóbica poliaromática es una resina Amberlita XAD 16N[®].

- Finalmente se separa y se eluye la resina adsorbente hidrofóbica con un solvente adecuado hasta obtener el extracto bacteriano. Se separa la resina (v.g. por decantación) desechando el medio y luego la resina se transfiere a un recipiente que contiene un volumen de solvente adecuado (entre 5 y 20 mL) para eluir los metabolitos secundarios, lo que puede tomar un tiempo entre 12 y 36 horas. Se entiende por eluir a la aplicación de un solvente o fase móvil que permita arrastrar o separar los componentes que quedaron retenidos en la resina. Entre los solventes se pueden mencionar acetona, metanol, isopropanol y sus mezclas.

- Una vez eluidos los metabolitos secundarios, se filtra el sobrenadante y se concentran (v.g. en un rotoevaporador o en cualquier equipo que permita evaporar el solvente), hasta un volumen entre 0,5 y 2,0 mL. El extracto bacteriano obtenido se almacena a una temperatura entre 1 y 10°C. La concentración de metabolitos secundarios en los extractos bacterianos obtenidos es superior a 1000 ppm, más preferiblemente, superior a 10000 ppm. La actividad biocida de los extractos obtenidos se puede evaluar sobre diferentes patógenos, por ejemplo, sobre el hongo *L. gongylophorus*.

- Los siguientes Ejemplos ilustran la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos.

EJEMPLOS

- Ejemplo 1. Aislamiento, purificación y cultivo de *Bacillus mojavensis* UNCSAB02-24 aislado de una hormiga (*Atta cephalotes*) cortadora de hojas**

Se tomaron 6 hormigas cortadoras en un tubo de ensayo estéril con esferas de vidrio de 6 mm de diámetro y se agregó agua peptonada hasta cubrir en su totalidad los insectos. Se agitaron en un agitador vortex a 3000 rpm a velocidad constante por un minuto a temperatura ambiente. Luego se realizaron diluciones seriadas y se sembraron las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} en superficie en cajas de Petri con agar nutritivo (medio de cultivo) por un periodo de 24 horas a 30°C.

Las bacterias obtenidas se aislaron y se purificaron por la metodología de agotamiento en las mismas condiciones. Posteriormente, se conservaron las cepas puras en micro-tubos con 70% de caldo nutritivo y 30% de glicerol a 99% en un congelador a -20°C. Se obtuvo un cultivo puro de *Bacillus mojavensis*.

Ejemplo 2. Preparación del pre-inóculo de *Bacillus mojavensis* UNCSAB02-24, inoculación y obtención del extracto

El cultivo puro obtenido según el Ejemplo 1 y almacenado a -20°C, se cultivó en cajas de Petri con medio XG con un pH 7,0. Se hizo un pre-inóculo a partir de este cultivo en el que se tomaron 3 colonias aisladas y se colocaron en 5 mL de caldo nutritivo, se dejaron por 24 horas a 30°C y 150 rpm.

Para la preparación del extracto se inocularon 100 µL de este cultivo y se transfirieron a un Erlenmeyer con 100 mL de caldo nutritivo y en presencia de 2,5 mL de resina Amberlita XAD 16N en solución acuosa obtenidos a partir de la mezcla de 50g de resina y 50mL de agua estéril, se esterilizaron. Se incubó por 7 días a 30°C y 150 rpm. Posteriormente se descartó el medio y se recuperó la resina, la cual se transfirió a 15 mL de metanol al 99,99% y se dejó eluir por 24 horas. Se filtró el sobrenadante y se concentró en un rotoevaporador hasta obtener aproximadamente 1 mL de extracto bacteriano metanólico. El extracto obtenido se almacenó a 4°C.

Ejemplo 3. Evaluación del efecto antifúngico del extracto de *Bacillus mojavensis* UNCSAB02-24 contra *Leucoagaricus gongylophorus*

Se determinó la actividad fungicida del extracto bacteriano metanólico obtenido en el Ejemplo 2 frente al hongo simbionte de la hormiga *Atta cephalotes*. Para esto, se aisló el hongo de los jardines de las hormigas, se tomó una porción de micelio del hongo y se sembró en cajas de Petri con medio PDA acidificado con ácido láctico al 4% a un pH de 4,0. Después de 4 semanas de crecimiento, se tomó una muestra con un sacabocados con un diámetro de 8 mm y se trasladó a una caja de Petri con medio PDA y 400 µL del extracto bacteriano. Se evaluó el crecimiento del micelio por un periodo de 4 semanas.

Se realizó un bioensayo con 3 repeticiones y un control, los datos se analizaron estadísticamente con el programa Statsgraphics Centurion® con pruebas de bondad de ajuste, se determinó que de acuerdo con el estadístico log verosimilitud, la distribución de mejor ajuste es la distribución log-logística, con un 95% de confianza. En todos los casos, la eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA), concluyendo que los tratamientos difieren en su efecto medio (nivel de significancia $P < 0,05$). Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2.

10

Tabla 1. Resultados ANDEVA obtenidos para el bioensayo

Grupos	Cuenta	Suma	Porcentaje de inhibición	Varianza
UNCSAB02-01	2	64,39	32,19	5,39
UNCSAB02-02	1	4,88	4,88	0,0
UNCSAB02-04	3	142,70	47,57	410,72
UNCSAB02-05	2	61,90	30,95	310,79
UNCSAB02-06	2	37,77	18,88	396,89
UNCSAB02-14	3	24,50	8,17	133,20
UNCSAB02-16	3	63,64	21,21	433,01
UNCSAB02-18	3	69,84	23,28	333,77
UNCSAB02-19	2	73,31	36,66	149,66
UNCSAB02-21	2	48,98	24,49	475,91
UNCSAB02-21A	3	67,54	22,51	192,59
UNCSAB02-23	3	78,02	26,01	429,32
UNCSAB02-24	3	322,15	107,38	1,43
UNCSAB02-26	3	131,31	43,77	651,57
UNCSAB02-27	2	28,62	14,31	321,99

Tabla 2. Análisis de varianza del bioensayo fungicida

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	22679,15	14,00	1619,9	5,22	3,05E-04	2,17
Dentro de los grupos	6831,86	22,00	310,5			
Total	29511,01	36,00				

El extracto bacteriano metanólico (92000 ppm) obtenido a partir de *Bacillus mojavensis* UNCSAB02-24 exhibió un porcentaje de inhibición del 100% contra el hongo *Leucoagaricus gongylophorus*.

Ejemplo 4. Aislamiento, purificación y cultivo de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01 y *Xenorhabdus* sp. UNCSAB03-23-04 aislados del nematodo *Steinernema* sp

5

Se tomó una larva de último instar de *Galleria mellonella* y se inoculó con 200 juveniles infectivos del nematodo. Posteriormente, a los 3 días se esterilizó la larva en alcohol al 70% por 5 minutos y se pasó por agua destilada estéril. Luego con la ayuda de una jeringa se rompió el integumento debajo de la cabeza del insecto y se tomó una gota de la hemolinfa, se sembró en caja de Petri con medio NBTA por un periodo de 48 horas a 25°C.

10

Una vez aisladas las bacterias, se realizó el procedimiento expuesto en el Ejemplo 1 para la purificación y cultivo de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01 y *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-23-04. Se obtuvo un cultivo puro de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01 y un cultivo puro de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-23-04.

15

Ejemplo 5. Preparación del pre-inóculo de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01 y *Xenorhabdus* sp. UNCSAB03-23-04, inoculación y obtención del extracto

20

Se realizó el mismo procedimiento expuesto en el Ejemplo 2 para la preparación del pre-inóculo de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01 y *Xenorhabdus* sp. UNCSAB03-23-04 obtenidos mediante el Ejemplo 4.

25

Se obtuvo 1 mL de extracto bacteriano metanólico producido a partir de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01 y *Xenorhabdus* sp. UNCSAB03-23-04. El extracto obtenido se almacenó a 4°C.

Ejemplo 6. Aislamiento, purificación y conservación de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01

30

Se realizó el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4 para el aislamiento, purificación y conservación de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01 aislado del nematodo *Heterorhabditis* sp. Se infectó la larva de *Galleria mellonella* con 200 juveniles infectivo de nematodos, se esperaron entre 24 y 48 horas para realizar una punción cerca a la cabeza de la larva y obtener una gota de hemolinfa, la cual se siembra en el agar NBTA. Una vez aisladas las bacterias, se realizó el procedimiento expuesto en el Ejemplo 1 para la purificación y cultivo de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01. Se obtuvo un cultivo puro de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01.

35

Ejemplo 7. Preparación del pre-inóculo de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01, inoculación y obtención del extracto

Se realizó el procedimiento expuesto en el Ejemplo 2 para la preparación del pre-inóculo de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01 obtenido mediante el Ejemplo 6. Se obtuvo 1 mL de extracto bacteriano metanólico a partir de *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01. El extracto obtenido se almacenó a 4°C.

Ejemplo 8. Aislamiento, purificación y cultivo de *Bacillus thuringiensis/cereus*

UNCSAB03-03-06, *Bacillus amyloliquefaciens* ss *amyloliquefaciens* UNCSAB03-03-12, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-04-01, *Bacillus oleronius* UNCSAB03-04-03, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-04-05, *Burkholderia dolosa* UNCSAB03-07-04, *Pseudomonas chlororaphis* ss *aurantiaca* UNCSAB03-07-05, *Brevundimonas diminuta* UNCSAB03-09-04, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-13-01, *Pseudomonas tolaasii* UNCSAB03-16-01, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-16-02, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-16-03, *Pseudomona marginalis* UNCSAB03-18-04, *Serratia liquefaciens* UNCSAB03-19-01, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-20-01, *Escherichia hermannii* UNCSAB03-21-02, *Serratia liquefasciens/ grimesii* UNCSAB03-21-03, *Pseudomonas nitroreducens* UNCSAB03-21-06, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-22-01, *Delftia tsuruhatensis* UNCSAB03-22-02, *Acinetobacter beijerinckii* UNCSAB03-22-05, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-23-01, *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01, *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01

Se tomó una larva de último instar de *Galleria mellonella* y se inoculó con 200 juveniles infectivos del nematodo. Posteriormente, a los 3 días se pasó por agua destilada estéril. Se obtiene un concentrado del cual se tomaron 100µL de nematodos juveniles, en un tubo de microcentrífuga se maceraron y se realizaron diluciones seriadas y se sembraron las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} en superficie en cajas de Petri con agar nutritivo (medio de cultivo) por un periodo de 24 horas a 30°C.

Las bacterias obtenidas se aislaron y se purificaron por la metodología de agotamiento en las mismas condiciones. Posteriormente, se conservaron las cepas puras en micro-tubos con 70% de caldo nutritivo y 30% de glicerol a 99% en un congelador a -20°C.

Ejemplo 9. Preparación del pre-inóculo de *Bacillus thuringiensis/cereus* UNCSAB03-

03-06, *Bacillus amyloliquefaciens* ss *amyloliquefaciens* UNCSAB03-03-12, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-04-01, *Bacillus oleronius* UNCSAB03-04-03, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-04-05, *Burkholderia dolosa* UNCSAB03-07-04, *Pseudomonas chlororaphis* ss *aurantiaca* UNCSAB03-07-05,

Brevundimonas diminuta UNCSAB03-09-04, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-13-01, *Pseudomonas tolaasii* UNCSAB03-16-01, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-16-02, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-16-03, *Pseudomona marginalis* UNCSAB03-18-04, *Serratia liquefaciens* UNCSAB03-19-01, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-20-01, *Escherichia hermannii* UNCSAB03-21-02, *Serratia liquefaciens/ grimesii* UNCSAB03-21-03, *Pseudomonas nitroreducens* UNCSAB03-21-06, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-22-01, *Delftia tsuruhatensis* UNCSAB03-22-02, *Acinetobacter beijerinckii* UNCSAB03-22-05, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-23-01, *Photorhabdus sp.* UNCSAB03-24-01, *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01

El cultivo puro obtenido en el Ejemplo 8 y almacenado a -20°C, se cultivó en cajas de Petri con medio agar nutritivo con un pH 7,5. Se hizo un pre-inóculo a partir de este cultivo en el que se tomaron 3 colonias aisladas y se colocaron en 5 mL de caldo nutritivo, se dejaron por 24 horas a 27°C y 120 rpm.

Para la preparación del extracto se inocularon 100 µL de este cultivo y se transfirieron a un Erlenmeyer con 100 mL de caldo nutritivo y en presencia de 2,5 mL de resina Amberlita XAD 16N en solución acuosa obtenidos a partir de la mezcla de 50g de resina y 50mL de agua estéril, se esterilizaron. Se incubó por 7 días a 27°C y 120 rpm. Posteriormente se descartó el medio y se recuperó la resina por decantación, la cual se transfirió a 15 mL de metanol al 99,99% y se dejó eluir por 24 horas, se filtró el sobrenadante y se concentró en un rotoevaporador hasta obtener aproximadamente 2 mL de extracto bacteriano metanólico producido a partir de cada una de las especies. El extracto obtenido se almacenó a 4°C.

Ejemplo 10. Efecto antifúngico del extracto de *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01, *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-23-04 y *Photorhabdus sp.* UNCSAB03-24-01 contra *Leucoagaricus gongylophorus*, *Burkholderia dolosa* UNCSAB03-07-04; *Pseudomonas chlororaphis ss aurantiaca* UNCSAB03-07-05, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-16-02, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-16-03, *Pseudomona marginalis* UNCSAB03-18-04.

Se determinó la efectividad de los extractos bacterianos metanólicos obtenidos según el Ejemplo 5, Ejemplo 7 y Ejemplo 9, frente al hongo simbionte de la hormiga *Atta cephalotes* siguiendo el procedimiento expuesto en el Ejemplo 3:

Se realizó un bioensayo con 3 repeticiones y un testigo, donde las mediciones se realizaron cada 7 días por cinco semanas calculando el área de crecimiento con la ayuda de un programa de procesamiento científico de imágenes, particularmente programa ImageJ versión 1.49q (Rasband, n.d.). Los valores del área bajo la curva de crecimiento para las

tres bacterias en promedio, la desviación estándar y la comparación entre cada extracto restando con el testigo (Mediante una prueba de Dunett) se exponen en la Tabla 3 y Tabla 4, las diferencias significativas se resaltan con un *:

5

Tabla 3 Promedios y desviación estándar de cada extracto obtenido

Extracto bacteriano	Promedio	Des. estándar
UNCSAB03-03-11	47,137	0,767
UNCSAB03-03-12	70,453	4,621
UNCSAB03-07-04	35,026	3,903
UNCSAB03-07-05	35,670	3,701
UNCSAB03-10-02	59,485	1,204
UNCSAB03-12-02	60,391	2,970
UNCSAB03-13-03	56,776	2,873
UNCSAB03-14-03	59,640	2,140
UNCSAB03-15-02	52,470	2,290
UNCSAB03-15-07	56,617	8,380
UNCSAB03-16-02	34,827	5,802
UNCSAB03-16-03	33,804	1,298
UNCSAB03-16-04	40,637	3,986
UNCSAB03-16-05	43,619	8,198
UNCSAB03-18-04	32,095	5,821
UNCSAB03-19-03	52,968	3,023
UNCSAB03-23-04	16,680	0,023
UNCSAB03-24-01	23,041	3,225
UNCSAB03-25-01	15,265	0,663
Testigo	46,227	5,119

Tabla 4. Comparaciones de medias, bioensayo fungicida, en la casilla de comparación es cada extracto restando con el testigo (negativo)

Comparación	Promedios
UNCSAB03-03-12 - Testigo	24,225*
UNCSAB03-12-02 - Testigo	14,164*
UNCSAB03-14-03 - Testigo	13,413*
UNCSAB03-10-02 - Testigo	13,258*
UNCSAB03-13-03 - Testigo	10,549*
UNCSAB03-15-07 - Testigo	10,390*
UNCSAB03-19-03 - Testigo	6,741
UNCSAB03-15-02 - Testigo	6,242
UNCSAB03-03-11 - Testigo	0,910

UNCSAB03-16-05 - Testigo	-2,608
UNCSAB03-16-04 - Testigo	-5,590
UNCSAB03-07-05 - Testigo	-10,558*
UNCSAB03-07-04 - Testigo	-11,202*
UNCSAB03-16-02 - Testigo	-11,400*
UNCSAB03-16-03 - Testigo	-12,423*
UNCSAB03-18-04 - Testigo	-14,132*
UNCSAB03-24-01 - Testigo	-23,187*
UNCSAB03-23-04 - Testigo	-29,547*
UNCSAB03-25-01 - Testigo	-30,963*

En el test de Dunnett se puede afirmar con una confiabilidad del 95% que la diferencia mínima significativa para que un tratamiento sea diferente al testigo debe tener un valor mínimo de 10,353 cm², lo que confirma que los extractos ensayados causaron una inhibición del crecimiento del hongo estadísticamente significativa.

Los porcentajes de inhibición contra el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* exhibidos por los extractos bacterianos metanólicos obtenidos en este Ejemplo están entre el 25% y el 80%, se resalta el porcentaje de inhibición: 79% *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01, 78% *Xenorhabdus* sp UNCSAB03-23-04, 58% *Photorhabdus* sp. UNCSAB03-24-01 y 41% *Pseudomona marginalis* UNCSAB03-18-04. Las partes por millón (ppm) contenidas en los extractos bacterianos con un total de 50500 ppm en UNCSAB03-25-01, 32000 ppm en UNCSAB03-24-01.

Ejemplo 11. Efecto de repelencia del extracto de *Bacillus amyloliquefaciens* ss *amyloliquefaciens* UNCSAB03-03-12, *Pseudomonas chlororaphis* ss *aurantiaca* UNCSAB03-07-05, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-20-01, *Pseudomonas nitroreducens* UNCSAB03-21-06, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-22-01, *Delftia tsuruhatensis* UNCSAB03-22-02, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-23-01, *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-23-04, *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01.

Para el bioensayo por repelencia se usaron dos papeles filtro separados por 0,5 cm entre ellos, cada uno a un lado del fondo de una caja de Petri de Ø 90 mm. En uno de los papeles filtro se adicionó el extracto bacteriano y en el otro el agua destilada.

Las mediciones se realizaron cada 5 minutos por 60 minutos, contando las hormigas a cada lado en el periodo de tiempo exacto, se registró con la ayuda de una cámara fotográfica. Los extractos inicialmente se encontraban suspendidos en metanol, sin embargo, para los experimentos de Bioensayo insecticida por contacto y Bioensayo por repelencia se tomó la

cantidad del extracto suspendido en metanol y se procedió a evaporarlo con el fin de suspender el extracto bacteriano en agua destilada.

Los datos del bioensayo de repelencia se dividen por observaciones cada cinco minutos (FIG. 1) durante una hora, para lo cual cada una de las observaciones puede analizarse como una prueba de preferencia, usando la prueba del signo para la comparación de muestras pareadas y su interpretación. Este bioensayo dio como resultado ocho extractos con efecto repelente significativo hacia las obreras de *Atta cephalotes*.

Si se define P como la probabilidad de que una hormiga se ubique en el sector impregnado con el extracto, x será el número de hormigas encontradas en el extracto, en una lectura determinada, pudiendo tomar 11 posibles valores: 0, 1, 2, ..., 9, 10. Considérese el siguiente juego de hipótesis:

$$H_0 : p \geq 0.5$$
$$H_a : p < 0.5$$

La hipótesis nula plantea que el extracto no tiene efecto repelente (pudiendo, de hecho, ser atrayente). La hipótesis alternativa plantea que el extracto tiene efecto repelente. Solamente, mediante el rechazo de la hipótesis nula podría probarse el efecto repelente del extracto.

Usando un script en R (R Core Team, 2014), puede generarse la siguiente tabla, con los valores P para cada uno de los posibles resultados: este valor P es una distribución binomial que se basa en la prueba estadística del signo.

Tabla 5 Valor P para los diferentes resultados en el bioensayo de repelencia

Hormigas en el extracto	Valor P	Límite superior
0	0,0009766	0,2129
1	0,0107422	0,3477
2	0,0546875	0,4592
3	0,171875	0,5583
4	0,3769531	0,6484
5	0,623047	0,7307
6	0,828125	0,8058
7	0,9453125	0,8731
8	0,9892578	0,9314
9	0,9990234	0,9774
10	1	1

Luego, únicamente puede afirmarse que el extracto tiene un efecto repelente significativo cuando se observa una hormiga o ninguna (valores P menores o iguales que 0,05). En tales casos, puede afirmarse con una confianza del 95% que la probabilidad de encontrar hormigas en el extracto es inferior a 0,5 (efecto repelente). La tercera columna, calculada con base en la función *inf.p* en el software R, muestra el límite superior del estimador por

intervalo de dicha probabilidad, obtenidos mediante el método exacto de Clopper-Pearson, de manera que haya coincidencia con la prueba de hipótesis. Este límite superior se puede interpretar como la máxima probabilidad de encontrar una hormiga en futuras ocasiones en el extracto probado.

5

Así se tiene, por ejemplo, una confianza del 95% de que en los casos en que se observó una hormiga en la porción con extracto, la máxima probabilidad de preferencia sería de 0,3942, lo que implica una inhibición 0,6058. Cuando se observan dos hormigas en el extracto no puede afirmarse con una probabilidad de error inferior a 0,05 que el extracto tenga efecto repelente. En este caso, la verdadera probabilidad de preferencia podría ser tan alta como 0.5069, lo cual implica que no habría ningún tipo de repelencia.

10

En la Tabla 6 se tabulan los datos del bioensayo repelencia. Los datos corresponden a las hormigas observadas en el lado del extracto en cada tiempo. En verde se marcan los que se encuentran por debajo del 0,05 en el valor *P* por lo tanto son observaciones estadísticamente significativas. La columna de la derecha corresponde a un puntaje dado para interpretar de forma más fácil la tabla.

15

Tabla 6.

DATOS BIOENSAYO REPELENCIA													
Extracto - Timepo	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	Sumatoria
UNCSAB03-22-01	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
UNCSAB03-23-01	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
UNCSAB03-23-04	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
UNCSAB03-20-01	0	0	1	2	0	1	2	1	0	1	1	1	10
UNCSAB03-21-06	1	2	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	10
UNCSAB03-22-02	5	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	10
UNCSAB03-25-01	0	2	1	2	2	1	1	0	0	1	0	0	10
UNCSAB03-07-05	1	2	2	1	1	0	1	1	0	0	1	1	11
UNCSAB03-03-12	1	2	1	1	1	2	0	1	3	0	1	0	13
UNCSAB03-04-01	3	5	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	16
UNCSAB03-09-03	1	1	0	1	1	0	4	1	4	1	1	1	16
UNCSAB03-21-02	4	2	0	5	2	2	1	0	0	0	0	0	16
UNCSAB03-03-06	4	2	3	2	2	1	2	0	1	1	0	1	19
UNCSAB03-22-05	2	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	1	21
UNCSAB03-09-04	1	3	2	4	0	3	3	2	2	2	3	1	26
UNCSAB03-21-03	2	1	2	5	2	3	0	4	2	4	1	0	26
UNCSAB03-16-01	3	2	1	2	2	3	2	3	3	2	2	2	27
UNCSAB03-24-01	4	1	3	1	2	3	2	4	3	1	1	2	27
UNCSAB03-13-01	0	3	5	1	1	0	4	2	2	3	4	3	28
UNCSAB03-04-05	5	1	4	1	2	2	6	2	2	0	3	1	29
UNCSAB03-23-02	2	5	4	4	3	4	3	4	2	0	3	5	39
Testigo	4	4	6	9	5	4	0	7	2	5	4	4	54
UNCSAB03-19-01	4	4	5	5	5	5	5	4	6	5	4	4	56
UNCSAB03-12-04	0	8	7	8	6	3	4	3	7	7	4	4	61

20

Uno de los extractos con mayor actividad en el bioensayo repelencia fue UNCSAB03-23-01, al cual se determinó que contiene 32000 ppm.

Ejemplo 12. Efecto insecticida por ingestión del extracto de *Bacillus thuringiensis/cereus* UNCSAB03-03-06, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-04-01, *Serratia marcescens* ss *marcescens* UNCSAB03-04-05, *Serratia*

25

marcescens ss marcescens UNCSAB03-23-01, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-13-01, *Pseudomonas tolaasii* UNCSAB03-16-01, *Serratia liquefaciens* UNCSAB03-19-01, *Escherichia hermannii* UNCSAB03-21-02, *Serratia liquefaciens/grimesii* UNCSAB03-21-03, *Pseudomonas nitroreducens* UNCSAB03-21-06, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-22-01, *Acinetobacter beijerinckii* UNCSAB03-22-05, *Photorhabdus* sp UNCSAB03-24-01.

Para este bioensayo se usó una porción de dieta de 8 mm, la cual, contiene el extracto bacteriano de la siguiente forma: en una caja de Petri de Ø 50 mm se adicionan 10 mL de dieta (descrita en el bioensayo anterior) y se mezclan con 400 µL de extracto bacteriano, Estos extractos fueron suspendidos en metanol por lo que se dejó la caja de Petri abierta en la cámara de flujo laminar por 10 minutos para que se evaporara el metanol.

La dieta se suministró todos los días y consistió en una porción de 8 mm, lo mismo para el testigo. Se colocaron un total de 5 hormigas obreras por caja de Petri, las mediciones se realizaron cada 24 horas por 5 días contando el número de hormigas muertas por caja de Petri, este bioensayo se realizó por triplicado.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Excel y se compararon los resultados utilizando una técnica adecuada para estos casos, la técnica se denomina área bajo la curva de la mortalidad acumulada, para cada una de las unidades experimentales. Este análisis también se realiza en el bioensayo del Ejemplo 10 y por medio del programa estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2002) se recopiló la información del área bajo la curva, con la cual se realizó un análisis de varianza y se generó la diferencia mínima significativa que debe cumplir cada tratamiento para diferenciarse estadísticamente del testigo, esto por medio de una prueba de DUNNETT.

Para este bioensayo los extractos bacterianos, UNCSAB03-22-05 y UNCSAB03-04-01 lograron matar el 100 % de las hormigas en menos de 48 horas. A las 72 horas después del inicio del bioensayo, se observó que 11 extractos bacterianos (52,3 %) lograron matar un promedio mayor a 4,67 hormigas. A este grupo se pertenecen las bacterias *Photorhabdus* sp. (UNCSAB03-24-01), *Serratia marcescens* sub. *marcescens* UNCSAB03-04-05 y *Pseudomonas tolaasii* UNCSAB03-16-01.

La Tabla 6 muestra los resultados promedio del bioensayo ingestión. Se presenta el promedio de las tres repeticiones, los números representan los promedios de las hormigas muertas acumuladas.

Tabla 7

Bacteria	Día 1 (24 H)	Día 2 (48 H)	Día 3 (72 H)	Día 4 (96 H)	Día 5 (120 H)
UNCSAB03-22-05	3,3	5,0	5,0	5,0	5,0
UNCSAB03-04-01	1,0	5,0	5,0	5,0	5,0
UNCSAB03-03-06	0,3	4,7	5,0	5,0	5,0
UNCSAB03-21-03	0,7	3,3	5,0	5,0	5,0
UNCSAB03-16-01	0,0	1,7	5,0	5,0	5,0
UNCSAB03-22-01	1,7	4,7	4,7	5,0	5,0
UNCSAB03-23-01	1,0	4,7	4,7	4,7	4,7
UNCSAB03-12-04	0,3	3,7	4,7	4,7	5,0
UNCSAB03-04-05	0,7	3,3	4,7	5,0	5,0
UNCSAB03-21-06	1,3	3,0	4,7	4,7	4,7
UNCSAB03-24-01	0,0	2,7	4,7	4,7	4,7
UNCSAB03-19-01	1,3	3,7	4,0	4,0	4,0
UNCSAB03-13-01	0,3	3,7	3,7	4,0	4,0
UNCSAB03-21-02	1,7	2,7	3,7	3,7	4,0
UNCSAB03-22-02	1,0	2,0	2,3	2,3	2,3
UNCSAB03-03-12	0,3	1,7	2,3	3,0	3,7
UNCSAB03-09-04	0,3	1,3	2,0	2,0	2,7
UNCSAB03-23-02	0,3	1,7	1,7	2,7	3,3
UNCSAB03-07-05	0,3	1,0	1,7	4,0	4,3
UNCSAB03-25-01	0,0	1,0	1,0	3,0	4,3
UNCSAB03-23-04	0,3	0,3	0,7	4,3	4,7
Control	0,0	0,0	0,3	1,0	1,0

En el análisis de varianza Tabla 7, se puede observar que el valor *P* es menor a 0,05 por lo tanto se puede concluir que de los 21 tratamientos al menos 2 son diferentes. En la Tabla 8 se tabulan los promedios de las tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Es importante recalcar que los valores de las tablas se refieren al área bajo la curva de cada tratamiento. En la Tabla 9 se muestran los resultados del test de Dunnet.

Tabla 7

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Modelo	21	1367,32	65,11	5,86	<,0001
Error	44	489	11,11		
Total corregido	65	1856,32			

10

Tabla 8.

Bioensayo ingestión			
Extracto	N	Promedio	Des. Estandar
Control	3	1,8333	1,6073
UNCSAB03-03-06	3	17,3333	0,2887
UNCSAB03-03-12	3	9,0000	4,5826
UNCSAB03-04-01	3	18,0000	0,8660
UNCSAB03-04-05	3	15,8333	0,7638
UNCSAB03-07-05	3	9,0000	2,1794
UNCSAB03-09-04	3	6,8333	3,8837
UNCSAB03-12-04	3	15,6667	1,6073
UNCSAB03-13-01	3	13,5000	4,2720
UNCSAB03-16-01	3	14,1667	1,5275
UNCSAB03-19-01	3	14,3333	4,7522
UNCSAB03-21-02	3	12,8333	3,7859
UNCSAB03-21-03	3	16,1667	1,6073
UNCSAB03-21-06	3	15,3333	3,4034
UNCSAB03-22-01	3	17,6667	1,5275
UNCSAB03-22-02	3	8,3333	8,7797
UNCSAB03-22-05	3	19,1667	0,7638
UNCSAB03-23-01	3	16,8333	2,0207
UNCSAB03-23-02	3	7,8333	2,7538
UNCSAB03-23-04	3	7,8333	1,8930
UNCSAB03-24-01	3	14,3333	2,9297
UNCSAB03-25-01	3	7,1667	4,6458

Tabla 9

Test de Dunnett	
Alpha	0,05
Grados de libertad del error	44
Cuadrado medio del error	11,11364
Valor critico de Dunnett	3,05508
Diferencia minima significativa	8,3158

5 En la Tabla 10, se muestra la comparación de tratamientos con respecto al testigo del bioensayo insecticida por ingestión. La casilla de comparación corresponde a cada extracto restado con el testigo (negativo). Los extractos que están marcados con asterisco son aquellos que tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo. Esto se deduce a partir de comparar la diferencia mínima significativa, Tabla 9, con

10 respecto a la columna promedios de la Tabla 10.

Tabla 10

Comparación de cada extracto con el testigo	
Comparacion	Promedio
UNCSAB03-22-05 - Testigo	17,333***
UNCSAB03-04-01 - Testigo	16,167***
UNCSAB03-22-01 - Testigo	15,833***
UNCSAB03-03-06 - Testigo	15,500***
UNCSAB03-23-01 - Testigo	15,000***
UNCSAB03-21-03 - Testigo	14,333***
UNCSAB03-04-05 - Testigo	14,000***
UNCSAB03-12-04 - Testigo	13,833***
UNCSAB03-21-06 - Testigo	13,500***
UNCSAB03-19-01 - Testigo	12,500***
UNCSAB03-24-01 - Testigo	12,500***
UNCSAB03-16-01 - Testigo	12,333***
UNCSAB03-13-01 - Testigo	11,667***
UNCSAB03-21-02 - Testigo	11,000***
UNCSAB03-03-12 - Testigo	7,167
UNCSAB03-07-05 - Testigo	7,167
UNCSAB03-22-02 - Testigo	6,500
UNCSAB03-23-02 - Testigo	6,000
UNCSAB03-23-04 - Testigo	6,000
UNCSAB03-25-01 - Testigo	5,333
UNCSAB03-09-04 - Testigo	5,000

En la Tabla 11 se puede observar que el valor *P* es menor a 0,05, por lo tanto se puede concluir que de los 21 tratamientos, al menos 2 son diferentes. En la Tabla 9 se muestran los resultados del test de Dunnett.

Tabla 11

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Modelo	21	5,77140	0,2748	2,35	0,0085
Error	44	5,14991	0,1170		
Total corregido	65	10,92131			

Tabla 12

Test de Dunnett	
Alpha	0,05
Grados de libertad del error	44
Cuadrado medio del error	0,117043
Valor critico de Dunnett	3,05508
Diferencia minima significativa	0,8534

La Tabla 13 muestra la comparación de tratamientos con respecto al testigo bioensayo insecticida por ingestión, 24 horas. En la casilla de comparación es cada extracto restado con el testigo (negativo).

En la Tabla 14 se puede apreciar que solo el primer extracto UNCSAB03-22-05 está marcado con asterisco, lo cual significa que tiene una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo. Esto se traduce en que solo este extracto se diferencia

del testigo a las primeras 24 horas del bioensayo ya que causó la muerte de más de tres hormigas para este tiempo.

Comparación de cada extracto con el testigo	
Comparacion	Promedio
UNCSAB03-22-05 - Testigo	12,253***
UNCSAB03-22-01 - Testigo	0,733
UNCSAB03-21-02 - Testigo	0,679
UNCSAB03-21-06 - Testigo	0,636
UNCSAB03-19-01 - Testigo	0,561
UNCSAB03-23-01 - Testigo	0,518
UNCSAB03-22-02 - Testigo	0,464
UNCSAB03-04-01 - Testigo	0,388
UNCSAB03-04-05 - Testigo	0,345
UNCSAB03-21-03 - Testigo	0,345
UNCSAB03-03-12 - Testigo	0,173
UNCSAB03-12-04 - Testigo	0,173
UNCSAB03-13-01 - Testigo	0,173
UNCSAB03-03-06 - Testigo	0,173
UNCSAB03-09-04 - Testigo	0,173
UNCSAB03-07-05 - Testigo	0,173
UNCSAB03-23-02 - Testigo	0,173
UNCSAB03-23-04 - Testigo	0,173
UNCSAB03-16-01 - Testigo	0,000
UNCSAB03-24-01 - Testigo	0,000
UNCSAB03-25-01 - Testigo	0,000

En la

- 5 Tabla 14 se puede observar que el valor P es menor a 0,05 por lo tanto se puede concluir que de los 21 tratamientos al menos dos son diferentes. En la Tabla 9 se muestran los resultados del test de Dunnet.

Tabla 14

Comparación de cada extracto con el testigo	
Comparacion	Promedio
UNCSAB03-22-05 - Testigo	12,253***
UNCSAB03-22-01 - Testigo	0,733
UNCSAB03-21-02 - Testigo	0,679
UNCSAB03-21-06 - Testigo	0,636
UNCSAB03-19-01 - Testigo	0,561
UNCSAB03-23-01 - Testigo	0,518
UNCSAB03-22-02 - Testigo	0,464
UNCSAB03-04-01 - Testigo	0,388
UNCSAB03-04-05 - Testigo	0,345
UNCSAB03-21-03 - Testigo	0,345
UNCSAB03-03-12 - Testigo	0,173
UNCSAB03-12-04 - Testigo	0,173
UNCSAB03-13-01 - Testigo	0,173
UNCSAB03-03-06 - Testigo	0,173
UNCSAB03-09-04 - Testigo	0,173
UNCSAB03-07-05 - Testigo	0,173
UNCSAB03-23-02 - Testigo	0,173
UNCSAB03-23-04 - Testigo	0,173
UNCSAB03-16-01 - Testigo	0,000
UNCSAB03-24-01 - Testigo	0,000
UNCSAB03-25-01 - Testigo	0,000

Tabla 14

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Modelo	21	14,9771	0,7132	4,77	0,0001
Error	44	6,5746	0,1494		
Total corregido	65	21,5517			

Tabla 15.

Test de Dunnett	
Alpha	0,05
Grados de libertad del error	44
Cuadrado medio del error	0,149423
Valor critico de Dunnett	3,05508
Diferencia minima significativa	0,9642

- 5
- La Tabla 16 muestra la comparación de tratamientos con respecto al testigo bioensayo insecticida por ingestión, 48 horas. En la casilla de comparación es cada extracto restado con el testigo (negativo). De acuerdo con la Tabla, los primeros 13 extractos están marcados con asterisco, lo cual significa que tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo. A partir del UNCSAB03-24-01, que tiene un promedio de 1,03, el cual es superior a la diferencia mínima significativa de la prueba de Dunnett 0,9642 (Tabla 15), podemos afirmar que si se repite el bioensayo podemos obtener los mismos resultados con un 95% de confiabilidad.
- 10
- 15
- Los dos extractos con mayor actividad en el bioensayo por ingestión fueron UNCSAB03-22-05 y UNCSAB03-04-01, de los cuales se determinó las partes por millón (ppm) contenidas en el extracto total. UNCSAB03-22-05 con 34000 ppm y UNCSAB03-04-01 con 31000 ppm.

Tabla 17

Comparación de cada extracto con el testigo	
Comparacion	Promedio
UNCSAB03-22-05 - Testigo	1,64***
UNCSAB03-04-01 - Testigo	1,63***
UNCSAB03-22-01 - Testigo	1,56***
UNCSAB03-03-06 - Testigo	1,56***
UNCSAB03-23-01 - Testigo	1,56***
UNCSAB03-13-01 - Testigo	1,30***
UNCSAB03-19-01 - Testigo	1,30***
UNCSAB03-12-04 - Testigo	1,30***
UNCSAB03-04-05 - Testigo	1,24***
UNCSAB03-21-03 - Testigo	1,22***
UNCSAB03-21-06 - Testigo	1,11***
UNCSAB03-21-02 - Testigo	1,07***
UNCSAB03-24-01 - Testigo	1,03***
UNCSAB03-22-02 - Testigo	0,76
UNCSAB03-03-12 - Testigo	0,76
UNCSAB03-23-02 - Testigo	0,73
UNCSAB03-16-01 - Testigo	0,68
UNCSAB03-09-04 - Testigo	0,58
UNCSAB03-07-05 - Testigo	0,46
UNCSAB03-25-01 - Testigo	0,39
UNCSAB03-23-04 - Testigo	0,17

Ejemplo 13. Efecto insecticida por contacto del extracto de *Bacillus thuringiensis/cereus* UNCSAB03-03-06;

***Bacillus amyloliquefaciens ss amyloliquefaciens* UNCSAB03-03-12, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-04-01, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-04-05, *Pseudomonas chlororaphis ss aurantiaca* UNCSAB03-07-05, *Brevundimonas diminuta* UNCSAB03-09-04, *Pseudomonas aeruginosa* UNCSAB03-13-01, *Serratia liquefaciens* UNCSAB03-19-01, *Escherichia hermannii* UNCSAB03-21-02, *Serratia liquefaciens/ grimesii* UNCSAB03-21-03, *Pseudomonas nitroreducens* UNCSAB03-21-06, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-22-01, *Delftia tsuruhatensis* UNCSAB03-22-02, *Acinetobacter beijerinckii* UNCSAB03-22-05, *Serratia marcescens ss marcescens* UNCSAB03-23-01, *Xenorhabdus nematophila* UNCSAB03-25-01.**

Para este bioensayo se tomó como base la metodología propuesta por Boulogne y colaboradores (2012), para la cual las hormigas entran en contacto con el extracto por medio del papel filtro al fondo de la caja de Petri. Se empleó una caja de Petri de Ø 50 mm en la cual en el fondo de esta se encontraba un papel filtro, al cual se aplicó 500 µL del extracto o de agua destilada (testigo). Se usaron 5 hormigas obreras mayores.

Para asegurar que la muerte no se debió a la falta de alimento, se suministró una dieta artificial⁴ (Bueno, Morini, Pagnocca, Hebling, & Silva, 1997) dentro de la caja de Petri. Las mediciones se realizaron cada 24 horas por 5 días contando el número de hormigas muertas por caja de Petri. En este bioensayo se obtuvo como resultado que 5 extractos mataron el 100 % de las hormigas en 24 horas, otros 13 extractos lograron causar la muerte del 100% de las hormigas en menos de 48 horas. La Tabla 17 muestra el resumen de resultados del bioensayo insecticida por contacto. Se muestran los extractos que lograron matar las hormigas en menos de 48 horas. Los números representan las hormigas muertas acumuladas.

10

Tabla 18

BACTERIA	Hormigas muertas acumuladas	
	Día 1 (24 H)	Día 2 (48 H)
UNCSAB03-03-06	5	5
UNCSAB03-04-05	5	5
UNCSAB03-21-02	5	5
UNCSAB03-22-02	5	5
UNCSAB03-22-05	5	5
UNCSAB03-03-12	4	5
UNCSAB03-04-01	4	5
UNCSAB03-23-01	4	5
UNCSAB03-21-06	3	5
UNCSAB03-25-01	3	5
UNCSAB03-07-05	1	5
UNCSAB03-12-04	1	5
UNCSAB03-22-01	1	5
UNCSAB03-23-02	1	5
UNCSAB03-09-04	0	5
UNCSAB03-13-01	0	5
UNCSAB03-19-01	0	5
UNCSAB03-21-03	0	5

En la Tabla 18 están reportados los mejores extractos que logran matar las hormigas en menos de 24 horas a partir de bacterias aisladas de nematodos de la familia *Rhabditidae*.

15

Tabla 18

Extractos que matan las hormigas en al menos 24 horas		
Bacteria	Sitios de colecta	Familia del nematodo
UNCSAB03-03-06	El Retiro (Ant)	Rhabditidae
UNCSAB03-04-05	El Retiro (Ant)	Rhabditidae
UNCSAB03-21-02	Chinchiná (Caldas)	Rhabditidae
UNCSAB03-22-02	Manizales (Caldas)	Rhabditidae
UNCSAB03-22-05	Manizales (Caldas)	Rhabditidae

En el bioensayo de contacto se puede observar que alrededor del 20 % de los extractos tiene una acción insecticida considerable, estos resultados se pueden ver en la **¡Error! No se**

20

⁴ La dieta artificial consistió en peptona bacteriológica, agar bacteriológico, extracto de levadura y glucosa.

encuentra el origen de la referencia., en la cual se muestra el número de extractos que matan las hormigas en tres rangos de tiempo diferentes. Además de esta tabla se puede apreciar en la FIG. 2 de forma más didáctica. La Tabla 20 muestra el porcentaje de participación del número de extractos por tiempo de exposición, bioensayo contacto.

5 **Tabla 20**

Tiempo después del contacto	Extractos bacterianos	Porcentaje
24 horas	5	5,4%
48 horas	13	14,0%
> 48 horas	75	80,6%

Se determinó la concentración en partes por millón (ppm) de dos de los cinco mejores extractos en este bioensayo, los resultados fueron: UNCSAB-03-06 con 31500 ppm y
10 UNCSAB-03-04-05 39500 ppm.

Ejemplo 14. Características morfológicas de las colonias formadas por las cepas bacterianas.

15 En las Tablas 21 a 49 se indican las características morfológicas de las cepas de microorganismos de los Ejemplos 3 y 8, así como de las cepas de otros microorganismos cultivados bajo el mismo procedimiento indicado, para obtener extractos con actividad biocida.

20 **Tabla 21. Características Morfológicas *Bacillus mojavensis* (UNCSAB02-24)**

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Irregular	Brillante	Creмоса	Blanco

Tabla 22. Características Morfológicas *Xenorhabdus nematophila* (UNCSAB03-25-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
NBTA	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Creмоса	Azul

Tabla 23. Características Morfológicas *Xenorhabdus* sp. (UNCSAB03-23-04)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
NBTA	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Creмоса	Azul

25 **Tabla 24. Características Morfológicas *Photorhabdus* sp. (UNCSAB03-24-01)**

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
NBTA	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Creмоса	Café

Tabla 25. Características Morfológicas *Acinetobacter beijerinckii* (UNCSAB03-22-05)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Acuosa	Amarillo

Tabla 26. Características Morfológicas *Bacillus thuringiensis/cereus* (UNCSAB03-03-6)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Elevada	Irregular	Opaca	Granulosa	Naranja

5 **Tabla 27. Características Morfológicas *Bacillus amyloliquefaciens ss amyloliquefaciens* (UNCSAB03-03-12)**

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Elevada	Irregular	Opaca	Granulosa	Naranja

Tabla 28. Características Morfológicas *Bacillus oleronius* (UNCSAB03-04-03)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	irregular	Plana	irregular	opaca	granulosa	Blanco

10

Tabla 29. Características Morfológicas *Brevundimonas diminuta* (UNCSAB03-09-04)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Elevada	Irregular	Brillante	Cremosa	Blanco

Tabla 30. Características Morfológicas *Burkholderia dolosa* (UNCSAB03-07-04)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	irregular	Elevada	irregular	Brillante	cremosa	Blanco Amarillo

15 **Tabla 31. Características Morfológicas *Delftia tsuruhatensis* (UNCSAB03-22-02)**

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Plana	Irregular	Opaca	Cremosa	Blanco

Tabla 32. Características Morfológicas *Escherichia hermannii* (UNCSAB03-21-02)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Cremosa	Blanco Amarillo

Tabla 33. Características Morfológicas *Photorhabdus* sp. (UNCSAB03-24-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
NBTA	redonda	Elevada	regular	Brillante	cremosa	Café

Tabla 34. Características Morfológicas *Pseudomonas aeruginosa* (UNCSAB03-13-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Creмоса	Blanco

5

Tabla 35. Características Morfológicas *Pseudomonas aeruginosa* (UNCSAB03-16-02)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	móvil	Elevada	Regular	Brillante	Creмоса	Transparente

Tabla 36. Características Morfológicas *Pseudomonas aeruginosa* (UNCSAB03-16-03)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	móvil	plana	Regular	Brillante	Creмоса	Amarillo

10

Tabla 37. Características Morfológicas *Pseudomonas aeruginosa* (UNCSAB03-20-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Creмоса	Amarillo

Tabla 38. Características Morfológicas *Pseudomonas chlororaphis* ss *aurantiaca* (UNCSAB03-07-05)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Plana	Irregular	Brillante	Creмоса	Blanco Amarillo

15

Tabla 39. Características Morfológicas *Pseudomonas marginalis* (UNCSAB03-18-04)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	irregular	elevada	irregular	Brillante	cremosa	Transparente

Tabla 40. Características Morfológicas *Pseudomonas nitroreducens* (UNCSAB03-21-06)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	móvil	Plana	Irregular	Opaca	Creмоса	Blanco

Tabla 41. Características Morfológicas *Pseudomonas tolaasii* (UNCSAB03-16-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	móvil	elevada	regular	brillante	rugosa	Blanco

Tabla 42. Características Morfológicas *Serratia liquefaciens* (UNCSAB03-19-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Elevada	Regular	Brillante	Cremosa	Blanco

Tabla 43. Características Morfológicas *Serratia liquefaciens/grimesii* (UNCSAB03-21-3)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Cremosa	Blanco

Tabla 44. Características Morfológicas *Serratia marcescens ss marcescens* (UNCSAB03-04-01)

Medio	Forma	Elevación	Borde	Brillo	Textura	Color
Agar nutritivo	Irregular	Elevada	Irregular	Opaca	Granulosa	Naranja

Tabla 45. Características Morfológicas *Serratia marcescens ss marcescens* (UNCSAB03-04-05)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Irregular	Elevada	Irregular	Brillante	Cremosa	Naranja

Tabla 46. Características Morfológicas *Serratia marcescens ss marcescens* (UNCSAB03-22-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	irregular	Elevada	irregular	brillante	cremosa	Amarillo

Tabla 47. Características Morfológicas *Serratia marcescens ss marcescens* (UNCSAB03-23-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
Agar nutritivo	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Cremosa	Blanco

Tabla 48. Características Morfológicas *Xenorhabdus nematophila* (UNCSAB03-23-04)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
NBTA	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Cremosa	Azul

Tabla 49. Características Morfológicas *Xenorhabdus nematophila* (UNCSAB03-25-01)

<i>Medio</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Borde</i>	<i>Brillo</i>	<i>Textura</i>	<i>Color</i>
NBTA	Redonda	Elevada	Regular	Brillante	Cremosa	Azul

Ejemplo 15. Caracterización de las cepas

- 5 Se caracterizó la cepa de los microorganismos empleando el sistema de identificación y caracterización biológica Biolog GEN III microplate®. Con dicho sistema de identificación es posible analizar un microorganismo con 94 pruebas fenotípicas: 71 ensayos de utilización de fuentes de carbono y 23 ensayos de sensibilidad química. El panel provee patrones fenotípicos del microorganismo que pueden ser usadas para
- 10 identificarlo a nivel de especie. Las Tablas 34 a 42 muestran la Identificación y Caracterización biológica. Se incluyen tanto un control negativo como uno positivo (Tablas 34 a 42).

Tabla 50.

Prueba	Resultado		
	<i>Bacillus mojavensis</i> UNCSAB02-24	<i>Xenorhabdus nematophila</i> UNCSAB03-25-01	<i>Xenorhabdus</i> sp. UNCSAB03-23-04
Control negativo	-	-	-
Dextrina	+	-	-
D-maltosa	+	-	-
D-trehalosa	+	+/-	+
D-Celobiosa	+	-	-
Gentiobiosa	+	-	-
Sacarosa	+	-	-
D-Turanosa	+/-	-	+/-
Estaquirosa	+/-	-	-
Control positivo	+	+	+
pH 6	+	+	+/-
pH 5	+	-	-
D-Rafinosa	+	-	-
α-D-Lactosa	+	-	-
D-Melibiosa	+/-	+/-	+/-
β-Metil-D-Glucosido	+	+/-	-
D-Salicina	+	-	-
N-Acetil-D-Glucosamina	+	+	+
N-Acetil-β-D-Manosamina	+/-	+/-	+
N-Acetil-D-Galactosamina	-	+/-	+/-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	+
NaCl 1%	+	+	-
NaCl 4%	+	-	-
NaCl 8%	+	-	-
α-D-Glucosa	+	+/-	+
D-Manosa	+	+	+

D-Fructosa	+	+	+
D-Galactosa	+/-	+/-	+/-
Metil Glucosa	+/-	+/-	+/-
D-Fucosa	+/-	+/-	+/-
L-Fucosa	+/-	+/-	+/-
L- Ramnosa	+	+/-	+/-
Inosina	+/-	+/-	+/-
Lactato de sodio 1%	+	+/-	+
Ácido Fusidico	-	-	-
D-Serina	-	+	+
D-Sorbitol	+	-	-
D-Manitol	+	-	-
D-Arabitol	+/-	-	-
mio-Inositol	+	+/-	+
Glicerol	+	+	+
D-Glucosa-6-PO ₄	+	+	+
D-Fructosa-6-PO ₄	+	-	-
Acido D-Aspártico	+	+	+
D-Serina	-	+	+
Troleandomicina	-	+	+
Rifamicina SV	-	+	+
Minociclina	-	-	-
Gelatina	+	-	-
Glicil-L-Prolina	+	+/-	+/-
L-Alanina	+	+	+
L-Arginina	+	+/-	+/-
L- Acido Aspartico	+	+	+
L- Acid Glutamico	+	+	+
L-Histidina	+	+	+
L- Acido Piroglutamico	+/-	+/-	+/-
L-Serina	+	+	+
Lincomicina	-	+	+
Guanidina HCl	+	+/-	+/-
Niaproof 4	-	-	-
Pectina	+	-	-
Acid D-Galacturonico	+	-	-
Acido L-Galactonico Lactona	+	+/-	+/-
Acido D-Gluconico	+	+/-	+/-
Acido D-Glucuronico	+	+/-	+/-
Glucuronamido	+/-	+/-	+/-
Acido Mucico	+/-	+/-	+/-
Acido Quinico	+	+/-	+/-
Acid D-Sacarico	+/-	+/-	+/-
Vancomicina	-	+	+
Violeta de Tetrazolio	-	+	+
Azul de Tetrazolio	-	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	+/-	-	-
Metil Piruvato	+/-	+	-
Acido D-Láctico metil éster	+/-	-	+/-
Acido L-Lactico	+	+	+
Acido Cítrico	+	-	+/-
Acido α-ceto-Glutarico	+/-	+/-	+/-
Acido D-Malico	-	+/-	+/-
Acido L-Malico	+	+/-	+/-

Acido Bromo-Succinico	+	+/-	+/-
Acido Nalidixico	+/-	-	-
Cloruro de Litio	+	-	-
Telurito de Potasio	+	+	+
Tween 40	+/-	+	+
Acido γ -Amino-Butírico	+/-	-	-
Acido α -Hidroxi-Butírico	-	+/-	+/-
Ácido β -Hidroxi-D,L-Butírico	+/-	-	-
Acido α -Ceto-Butírico	-	-	-
Ácido Acetoacetico	+	+	+
Ácido Propionico	+/-	-	-
Ácido Acético	+	+	+
Ácido Fórmico	+	-	-
Aztreonam	-	-	+/-
Butirato de Sodio	+	-	-
Bromato de Sodio	-	-	-

Tabla 51

Prueba	Resultado		
	<i>Acinetobacter beijingensis</i> UNCSAB03-22-05	<i>Bacillus thuringiensis/cereus</i> UNCSAB03-03-06	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ss <i>amyloliquefaciens</i> UNCSAB03-03-12
Control negativo	-	-	+/-
Dextrina	-	+	+
D-maltosa	-	+/-	+
D-trehalosa	-	+/-	+
D-Celobiosa	-	-	+
Gentiobiosa	-	-	+
Sacarosa	-	-	+
D-Turanosa	-	-	+/-
Estaquiosa	-	-	+/-
Control positivo	+	+	+
pH 6	+	+	+
pH 5	-	-	+/-
D-Rafinosa	-	-	+
α -D-Lactosa	-	-	+
D-Melibiosa	+/-	-	+/-
β -Metil-D-Glucosido	-	-	+
D-Salicina	-	-	+
N-Acetil-D-Glucosamina	-	+	+
N-Acetil- β -D-Manosamina	-	-	+/-
N-Acetil-D-Galactosamina	-	-	-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	-	+	+
NaCl 8%	-	+/-	+
α -D-Glucosa	-	+/-	+

D-Manosa	+/-	-	+
D-Fructosa	-	+/-	+
D-Galactosa	+/-	-	+/-
Metil Glucosa	-	-	+/-
D-Fucosa	-	-	+/-
L-Fucosa	+/-	-	+/-
L- Ramnosa	+/-	-	+/-
Inosina	-	+	+/-
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusídico	-	-	-
D-Serina	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	+
D-Manitol	-	-	+
D-Arabitól	-	-	-
mio-Inositol	-	-	-
Glicerol	-	+/-	+
D-Glucosa-6-PO ₄	+/-	+	+/-
D-Fructosa-6-PO ₄	+/-	+	+/-
Acido D-Aspártico	-	-	+
D-Serina	+/-	-	-
Troleandomicina	-	-	-
Rifamicina SV	+	-	-
Minociclina	-	-	-
Gelatina	-	+	+
Glicil-L-Prolina	-	-	+
L-Alanina	+	+/-	+
L-Arginina	-	+/-	+
L- Acido Aspartico	+	+/-	+
L- Acid Glutamico	+	+/-	+
L-Histidina	+	+/-	+
L- Acido Piroglutamico	-	-	+/-
L-Serina	+	+	+/-
Lincomicina	+	-	-
Guanidina HCl	+/-	+	+
Niaproof 4	+/-	-	-
Pectina	-	-	+
Acid D- Galacturonico	+/-	+	+
Acido L- Galactonico Lactona	+/-	+/-	-
Acido D-Gluconico	-	+/-	+
Acido D- Glucuronico	+/-	+/-	+/-
Glucuronamido	+/-	+/-	+/-
Acido Mucico	-	-	+/-
Acido Quínico	-	-	+/-
Acid D-Sacarico	-	-	+/-
Vancomicina	+	-	-
Violeta de Tetrazolio	+	+/-	-
Azul de Tetrazolio	+	-	-
Acido p- Hidroxifenilacetico	-	-	-
Metil Piruvato	+	+/-	+

Acido D-Láctico metil éster	-	-	+/-
Acido L-Lactico	-	+/-	+
Acido Citrico	+	-	+
Acido α -ceto-Glutarico	+	-	+/-
Acido D-Malico	+	-	+
Acido L-Malico	+	+	+
Acido Bromo-Succinico	+	-	+/-
Acido Nalidixico	+/-	-	-
Cloruro de Litio	+/-	+	+
Telurito de Potasio	+	+	+
Tween 40	+	+/-	+
Acido γ -Amino-Butirico	+	-	+/-
Acido α -Hidroxi-Butirico	-	-	-
Acido β -Hidroxi-D,L-Butirico	+/-	-	-
Acido α -ceto-Butirico	+	-	-
Acid Acetoacetico	+/-	+	+
Acid Propionico	+	-	+/-
Acido Acetico	+	+/-	+
Acid Formico	+/-	-	+
Aztreonam	+	+	-
Butirato de Sodio	-	+	-
Bromato de Sodio	-	+/-	-

Tabla 52.

Prueba	Resultado		
	<i>Bacillus oleronius</i> UNCSAB03-04-03	<i>Burkholderia dolosa</i> UNCSAB03-07-04	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UNCSAB03-16-02
Control negativo	-	-	-
Dextrina	+	-	+/-
D-maltosa	+/-	-	-
D-trehalosa	+/-	-	-
D-Celobiosa	-	-	-
Gentiobiosa	-	+/-	-
Sacarosa	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-
Estaquiosa	-	-	-
Control positivo	+	+	+
pH 6	+	+	+
pH 5	+	+	+/-
D-Rafinosa	-	-	-
α -D-Lactosa	-	-	-
D-Melibiosa	-	+/-	+/-
β -Metil-D-Glucosido	-	-	-
D-Salicina	-	-	-
N-Acetil-D-Glucosamina	-	+/-	+/-

N-Acetil-β-D-Manosamina	-	-	-
N-Acetil-D-Galactosamina	-	-	-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	+	+/-	+/-
NaCl 8%	+/-	-	-
α-D-Glucosa	+/-	+	+
D-Manosa	-	+	-
D-Fructosa	-	+	+/-
D-Galactosa	-	+	+/-
Metil Glucosa	-	+/-	+/-
D-Fucosa	-	+	+/-
L-Fucosa	-	+/-	+/-
L- Ramnosa	-	+/-	+/-
Inosina	-	+/-	+/-
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusidico	+/-	+	+
D-Serina	+	+/-	+
D-Sorbitol	-	+	-
D-Manitol	-	+/-	-
D-Arabitol	-	+/-	-
mio-Inositol	-	+/-	-
Glicerol	-	+/-	+/-
D-Glucosa-6-PO ₄	-	+/-	+/-
D-Fructosa-6-PO ₄	-	+	-
Acido D-Aspártico	-	-	-
D-Serina	-	-	+/-
Troleandomicina	+/-	+	+
Rifamicina SV	+/-	+	+
Minociclina	+	+/-	+
Gelatina	+/-	+/-	+/-
Glicil-L-Prolina	-	+/-	+/-
L-Alanina	-	+	+/-
L-Arginina	-	+	+
L- Acido Aspartico	-	+	+/-
L- Acid Glutamico	-	+	+
L-Histidina	-	+	+
L- Acido Piroglutamico	-	+	+/-
L-Serina	-	+	+/-
Lincomicina	+/-	+	+
Guanidina HCl	+	+/-	+
Niaproof 4	+/-	+	+
Pectina	-	-	+/-
Acid D-Galacturonico	-	+/-	+/-
Acido L-Galactonico Lactona	-	+/-	-
Acido D-Gluconico	-	+	+
Acido D-Glucuronico	-	+/-	-
Glucuronamido	-	+	+
Acido Mucico	-	+/-	-
Acido Quinico	-	+	+
Acid D-Sacarico	-	-	-
Vancomicina	+/-	+	+

Violeta de Tetrazolio	+/-	+	+
Azul de Tetrazolio	+/-	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	-	+	+
Metil Piruvato	-	+	-
Acido D-Láctico metil éster	-	+/-	-
Acido L-Lactico	-	-	+
Acido Citrico	-	+	+
Acido α-ceto-Glutarico	-	+	+
Acido D-Malico	-	+	-
Acido L-Malico	-	+	+
Acido Bromo-Succinico	-	+	+/-
Acido Nalidixico	+/-	+	+
Cloruro de Litio	+	-	-
Telurito de Potasio	+	+	+
Tween 40	-	+	-
Acido γ-Amino-Butirico	-	+	+
Acido α-Hidroxi-Butirico	-	+/-	-
Acido β-Hidroxi-D,L-Butirico	-	+	+
Acido α-ceto-Butirico	-	+/-	-
Acid Acetoacetico	-	+/-	+/-
Acid Propionico	-	+	+
Acido Acetico	-	+	+/-
Acid Formico	-	+/-	-
Aztreonam	+	+	+/-
Butirato de Sodio	+	+/-	-
Bromato de Sodio	+/-	-	-

Tabla 53.

Prueba	Resultado		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UNCSAB03-16-03	<i>Pseudomonas marginalis</i> UNCSAB03-18-04	<i>Pseudomonas tolaasii</i> UNCSAB03-16-01
Control negativo	-	-	-
Dextrina	+/-	+/-	+/-
D-maltosa	-	-	-
D-trehalosa	-	+	+
D-Celobiosa	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-
Sacarosa	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-
Estaquiosa	-	-	-
Control positivo	+	+	+
pH 6	+	+	+
pH 5	+/-	+	+
D-Rafinosa	-	-	-
α-D-Lactosa	-	-	-
D-Melibiosa	-	-	-

β-Metil-D-Glucosido	-	-	-
D-Salicina	-	-	-
N-Acetil-D-Glucosamina	+/-	+/-	+/-
N-Acetil-β-D-Manosamina	-	-	-
N-Acetil-D-Galactosamina	-	-	-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	+/-	+/-	-
NaCl 8%	-	-	-
α-D-Glucosa	+	+	+/-
D-Manosa	+/-	+	+/-
D-Fructosa	+/-	+/-	+/-
D-Galactosa	+/-	+	+
Metil Glucosa	-	-	+/-
D-Fucosa	+/-	+/-	+/-
L-Fucosa	+/-	+/-	+/-
L- Ramnosa	+/-	-	+/-
Inosina	+/-	+/-	+/-
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusidico	+	+	+
D-Serina	+/-	-	-
D-Sorbitol	-	+	-
D-Manitol	+	+	+/-
D-Arabitol	-	+/-	+/-
mio-Inositol	-	+/-	+
Glicerol	+/-	+/-	+/-
D-Glucosa-6-PO ₄	+/-	-	-
D-Fructosa-6-PO ₄	-	+/-	+/-
Acido D-Aspártico	-	-	+
D-Serina	+/-	-	-
Troleandomicina	+	+	+
Rifamicina SV	+	+	+
Minociclina	+	-	-
Gelatina	-	+/-	-
Glicil-L-Prolina	+/-	-	-
L-Alanina	+/-	+	+/-
L-Arginina	+	+	+
L- Acido Aspartico	+	+/-	+/-
L- Acid Glutamico	+	+/-	+
L-Histidina	+	+	+
L- Acido Piroglutamico	+/-	+/-	+
L-Serina	+/-	+	+
Lincomicina	+	+	+
Guanidina HCl	+/-	+/-	+/-
Niaproof 4	+	+	+
Pectina	-	-	-
Acid D-Galacturonico	+/-	+	+
Acido L-Galactonico Lactona	+/-	-	+/-
Acido D-Gluconico	+	+	+
Acido D-Glucuronico	+/-	+	+
Glucuronamido	-	+/-	+

Acido Mucico	-	+	+
Acido Quinico	+	+	+
Acid D-Sacarico	-	+	+
Vancomicina	+	+	+
Violeta de Tetrazolio	+	+	+
Azul de Tetrazolio	+	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	+	+	-
Metil Piruvato	+/-	+/-	+/-
Acido D-Láctico metil éster	-	-	-
Acido L-Lactico	+	+	+/-
Acido Citrico	+	+	+
Acido α-ceto-Glutarico	+	+	+
Acido D-Malico	-	-	-
Acido L-Malico	+	+	+
Acido Bromo-Succinico	+/-	-	+/-
Acido Nalidixico	+	+/-	-
Cloruro de Litio	-	+/-	+/-
Telurito de Potasio	+	+	+
Tween 40	+	+/-	+/-
Acido γ-Amino-Butirico	+	+	+/-
Acido α-Hidroxi-Butirico	-	-	-
Acido β-Hidroxi-D,L-Butirico	+/-	+/-	+/-
Acido α-ceto-Butirico	-	-	-
Acid Acetoacetico	+/-	-	-
Acid Propionico	+	+	+/-
Acido Acetico	+	+	+
Acid Formico	-	-	-
Aztreonam	+	+/-	+/-
Butirato de Sodio	-	-	-
Bromato de Sodio	-	+/-	-

Tabla 54.

Prueba	Resultado		
	<i>Brevundimonas diminuta</i> UNCSAB03-09-04	<i>Delftia tsuruhatensis</i> UNCSAB03-22-02	<i>Escherichia hermannii</i> UNCSAB03-21-02
Control negativo	-	-	-
Dextrina	+/-	-	+
D-maltosa	-	-	+
D-trehalosa	-	-	+/-
D-Celobiosa	-	-	+/-
Gentiobiosa	-	-	+/-
Sacarosa	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-
Estaquiosa	-	-	-
Control positivo	+	+	+
pH 6	+	+	+
pH 5	-	-	+

D-Rafinosa	-	-	-
α-D-Lactosa	-	-	-
D-Melibiosa	-	-	-
β-Metil-D-Glucosido	-	-	+/-
D-Salicina	-	-	+/-
N-Acetil-D-Glucosamina	-	-	+
N-Acetil-β-D-Manosamina	-	-	+
N-Acetil-D-Galactosamina	-	-	-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	+
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	-	-	+/-
NaCl 8%	-	-	-
α-D-Glucosa	-	-	+/-
D-Manosa	-	-	+
D-Fructosa	-	+/-	+
D-Galactosa	-	+/-	+
Metil Glucosa	-	-	-
D-Fucosa	-	+/-	+/-
L-Fucosa	-	+/-	+/-
L- Ramnosa	-	+/-	+
Inosina	-	-	+
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusidico	-	-	+/-
D-Serina	+	-	-
D-Sorbitol	-	-	-
D-Manitol	-	+/-	+/-
D-Arabitol	-	-	-
mio-Inositol	-	-	-
Glicerol	-	-	+
D-Glucosa-6-PO ₄	+/-	-	+
D-Fructosa-6-PO ₄	+/-	-	+
Acido D-Aspártico	-	+	+/-
D-Serina	-	-	-
Troleandomicina	+/-	+	+
Rifamicina SV	+	+	+
Minociclina	-	-	-
Gelatina	+	-	-
Glicil-L-Prolina	+	-	+
L-Alanina	-	+/-	+
L-Arginina	-	-	-
L- Acido Aspartico	+	+	+
L- Acid Glutamico	+	+	+
L-Histidina	+	+	+/-
L- Acido Piroglutamico	-	+/-	+/-
L-Serina	-	-	+
Lincomicina	+	+	+
Guanidina HCl	+/-	+/-	+
Niaproof 4	-	+/-	+
Pectina	-	-	-
Acid D-Galacturonico	-	+/-	+
Acido L-Galactonico Lactona	+/-	-	-

Acido D-Gluconico	-	+	+
Acido D-Glucuronico	+/-	+/-	+
Glucuronamido	+/-	+/-	+/-
Acido Mucico	-	+	+
Acido Quinico	-	-	-
Acid D-Sacarico	-	+/-	+
Vancomicina	-	+	+
Violeta de Tetrazolio	+	+	+
Azul de Tetrazolio	+	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	-	+	-
Metil Piruvato	-	+/-	+
Acido D-Láctico metil éster	-	-	+/-
Acido L-Lactico	-	+/-	+
Acido Citrico	-	+/-	+/-
Acido α-ceto-Glutarico	-	+	-
Acido D-Malico	-	+	-
Acido L-Malico	-	+	+/-
Acido Bromo-Succinico	-	+	-
Acido Nalidixico	+	-	-
Cloruro de Litio	+/-	+/-	+/-
Telurito de Potasio	-	-	+/-
Tween 40	-	+/-	-
Acido γ-Amino-Butirico	-	-	-
Acido α-Hidroxi-Butirico	-	-	+/-
Acido β-Hidroxi-D,L-Butirico	+/-	+/-	-
Acido α-ceto-Butirico	-	+	-
Acid Acetoacetico	+/-	+/-	+/-
Acid Propionico	-	+	-
Acido Acetico	+/-	+	+
Acid Formico	-	+/-	-
Aztreonam	+	+/-	+/-
Butirato de Sodio	-	+/-	+/-
Bromato de Sodio	-	-	-

Tabla 55.

Prueba	Resultado		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UNCSAB03-13-01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UNCSAB03-20-01	<i>Pseudomonas chlororaphis aurantiaca</i> ss UNCSAB03-07-05
Control negativo	-	-	-
Dextrina	+/-	+/-	+/-
D-maltosa	-	-	-
D-trehalosa	-	+/-	+
D-Celobiosa	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-
Sacarosa	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-
Estaquirosa	-	-	-
Control positivo	+	+	+

pH 6	+	+	+
pH 5	+	+	+
D-Rafinosa	-	-	-
α-D-Lactosa	-	-	-
D-Melibiosa	-	-	-
β-Metil-D-Glucosido	-	-	-
D-Salicina	-	-	-
N-Acetil-D-Glucosamina	+/-	-	+/-
N-Acetil-β-D-Manosamina	-	-	-
N-Acetil-D-Galactosamina	-	-	-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	+/-	+/-	+/-
NaCl 8%	-	-	-
α-D-Glucosa	+	+	+
D-Manosa	+/-	-	+/-
D-Fructosa	+/-	+/-	+
D-Galactosa	+/-	+/-	+/-
Metil Glucosa	-	-	-
D-Fucosa	+/-	+/-	+/-
L-Fucosa	+/-	+/-	+/-
L- Ramnosa	+/-	+/-	+/-
Inosina	+/-	+/-	+
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusidico	+	+	+
D-Serina	+/-	+/-	+/-
D-Sorbitol	-	-	-
D-Manitol	+	+/-	+
D-Arabitol	+/-	-	+/-
mio-Inositol	+/-	-	+
Glicerol	+	+/-	+
D-Glucosa-6-PO ₄	+/-	-	-
D-Fructosa-6-PO ₄	-	-	-
Acido D-Aspártico	-	-	-
D-Serina	-	+/-	+
Troleandomicina	+	+	+
Rifamicina SV	+	+	+
Minociclina	+	+	+
Gelatina	-	-	-
Glicil-L-Prolina	+	+	-
L-Alanina	+/-	+/-	+
L-Arginina	+	+	+
L- Acido Aspartico	+	+	+
L- Acid Glutamico	+	+	+
L-Histidina	+	+	+
L- Acido Piroglutamico	+	+	+
L-Serina	+/-	+/-	+
Lincomicina	+	+	+
Guanidina HCl	+/-	+/-	+/-
Niaproof 4	+	+	+
Pectina	-	-	-
Acid D-Galacturonico	+/-	-	+/-
Acido L-Galactonico	+/-	+/-	+/-

Lactona			
Acido D-Gluconico	+	+	+
Acido D-Glucuronico	+/-	+/-	+/-
Glucuronamido	+	-	+/-
Acido Mucico	-	-	+
Acido Quinico	+	+	+
Acid D-Sacarico	-	-	+
Vancomicina	+	+	+
Violeta de Tetrazolio	+	+	+
Azul de Tetrazolio	+	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	+	+	+
Metil Piruvato	+/-	+/-	+/-
Acido D-Láctico metil éster	-	-	-
Acido L-Lactico	+	+/-	+
Acido Citrico	+	+	+
Acido α -ceto-Glutarico	+	+/-	+
Acido D-Malico	-	-	-
Acido L-Malico	+	+	+
Acido Bromo-Succinico	+/-	-	-
Acido Nalidixico	+	+	+
Cloruro de Litio	-	-	+
Telurito de Potasio	+	+	+
Tween 40	+/-	+/-	+/-
Acido γ -Amino-Butirico	+	+	+
Acido α -Hidroxi-Butirico	-	-	-
Acido β -Hidroxi-D,L-Butirico	+/-	+/-	+/-
Acido α -ceto-Butirico	-	-	-
Acid Acetoacetico	+/-	-	+/-
Acid Propionico	+	+	+
Acido Acetico	+	+/-	+
Acid Formico	-	-	-
Aztreonam	+/-	+	+/-
Butirato de Sodio	-	-	-
Bromato de Sodio	+/-	+/-	+/-

Tabla 56.

Prueba	Resultado		
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> UNCSAB03-21-06	<i>Serratia liquefaciens</i> UNCSAB03-19-01	<i>Serratia liquefaciens/ grimesii</i> UNCSAB03-21-03
Control negativo	-	-	-
Dextrina	-	+/-	+/-
D-maltosa	-	+/-	+/-
D-trehalosa	-	+	+/-
D-Celobiosa	-	+/-	+/-
Gentiobiosa	-	+/-	+/-
Sacarosa	-	+	+/-
D-Turanosa	-	+	+
Estaquirosa	-	+	+
Control positivo	+	+	+

pH 6	+	+	+
pH 5	+	+	+/-
D-Rafinosa	-	+	+
α-D-Lactosa	-	+/-	+/-
D-Melibiosa	-	+/-	+/-
β-Metil-D-Glucosido	-	+	+/-
D-Salicina	-	+	+
N-Acetil-D-Glucosamina	-	+	+
N-Acetil-β-D-Manosamina	-	+	+
N-Acetil-D-Galactosamina	-	+	+/-
Acido N-Acetil Neuraminico	-	+/-	+/-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	+/-	+/-	+/-
NaCl 8%	-	-	-
α-D-Glucosa	+	+	+/-
D-Manosa	-	+	+/-
D-Fructosa	+/-	+	+/-
D-Galactosa	+/-	+	+
Metil Glucosa	-	+	+
D-Fucosa	+/-	+	+
L-Fucosa	+/-	+	+
L- Ramnosa	+/-	+	+/-
Inosina	-	+/-	+/-
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusidico	+	+	+/-
D-Serina	+/-	+	+
D-Sorbitol	-	+/-	+/-
D-Manitol	-	+	+/-
D-Arabitol	-	+/-	-
mio-Inositol	-	+	+
Glicerol	+/-	+	+/-
D-Glucosa-6-PO ₄	-	+	+
D-Fructosa-6-PO ₄	-	+	+
Acido D-Aspártico	-	+	+/-
D-Serina	-	+	+
Troleandomicina	+	+	+
Rifamicina SV	+	+	+
Minociclina	+	+/-	+/-
Gelatina	-	+	+
Glicil-L-Prolina	-	+	+
L-Alanina	+/-	+	+
L-Arginina	+	+/-	+/-
L- Acido Aspartico	+	+	+
L- Acid Glutamico	+	+	+
L-Histidina	-	+	+
L- Acido Piroglutamico	-	+/-	+/-
L-Serina	+/-	+	+
Lincomicina	+	+	+
Guanidina HCl	+/-	+/-	+
Niaproof 4	+	+	+
Pectina	-	+	+/-
Acid D-Galacturonico	+/-	+	+
Acido L-Galactonico	+/-	+	+

Lactona			
Acido D-Gluconico	+	+	+
Acido D-Glucuronico	+/-	+	+
Glucuronamido	+/-	+	+
Acido Mucico	-	+/-	+/-
Acido Quinico	+	+/-	-
Acid D-Sacarico	-	+/-	+/-
Vancomicina	+	+	+
Violeta de Tetrazolio	+	+	+
Azul de Tetrazolio	+	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	-	+/-	+/-
Metil Piruvato	+	+/-	+/-
Acido D-Láctico metil éster	-	-	+/-
Acido L-Lactico	+	+	+
Acido Citrico	+	+	+
Acido α-ceto-Glutarico	+	+	+
Acido D-Malico	-	+	+
Acido L-Malico	+	+	+
Acido Bromo-Succinico	+/-	+/-	+/-
Acido Nalidixico	+	-	-
Cloruro de Litio	-	+/-	+/-
Telurito de Potasio	+	-	-
Tween 40	+/-	+/-	+
Acido γ-Amino-Butirico	+	-	-
Acido α-Hidroxi-Butirico	-	+/-	+/-
Acido β-Hidroxi-D,L-Butirico	+	-	-
Acido α-ceto-Butirico	-	-	-
Acid Acetoacetico	-	+/-	-
Acid Propionico	+	+/-	-
Acido Acetico	+	+	+/-
Acid Formico	+/-	+/-	+/-
Aztreonam	+/-	+/-	+/-
Butirato de Sodio	+/-	+/-	+/-
Bromato de Sodio	-	-	-

Tabla 57.

Prueba	Resultado		
	<i>Serratia marcescens ss marcescens</i> UNCSAB03-04-01	<i>Serratia marcescens ss marcescens</i> UNCSAB03-04-05	<i>Serratia marcescens ss marcescens</i> UNCSAB03-23-01
Control negativo	-	-	-
Dextrina	+/-	+/-	+/-
D-maltosa	+	+	+
D-trehalosa	+	+	+
D-Celobiosa	+/-	+/-	+/-
Gentiobiosa	+/-	+/-	+/-
Sacarosa	-	+	+
D-Turanosa	-	-	-
Estaquiosa	-	-	-

Control positivo	+	+	+
pH 6	+	+	+
pH 5	+/-	+/-	+
D-Rafinosa	-	+/-	-
α-D-Lactosa	+/-	+/-	-
D-Melibiosa	+/-	+/-	+/-
β-Metil-D-Glucosido	+	+	+
D-Salicina	+	+	+
N-Acetil-D-Glucosamina	+	+	+
N-Acetil-β-D-Manosamina	+/-	+/-	+
N-Acetil-D-Galactosamina	+	+	+
Acido N-Acetil Neuraminico	+/-	-	-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	+	+/-	+/-
NaCl 8%	+/-	-	-
α-D-Glucosa	+/-	+	+
D-Manosa	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+
D-Galactosa	+	+	+
Metil Glucosa	+/-	+	+/-
D-Fucosa	+	+	+
L-Fucosa	+	+/-	+
L- Ramnosa	+/-	+/-	+/-
Inosina	+	+	+
Lactato de Sodio 1%	+	+	+
Ácido Fusidico	+	+	+/-
D-Serina	+	+/-	+
D-Sorbitol	+	+	+
D-Manitol	+	+	+
D-Arabitol	+/-	+	+/-
mio-Inositol	+	+	+
Glicerol	+	+	+
D-Glucosa-6-PO ₄	+	+	+
D-Fructosa-6-PO ₄	+	+	+
Acido D-Aspártico	+/-	+/-	+/-
D-Serina	+	+	+
Troleandomicina	+	+	+
Rifamicina SV	+	+	+
Minociclina	+	+/-	+
Gelatina	+	+	+
Glicil-L-Prolina	+	+	+
L-Alanina	+	+	+
L-Arginina	+/-	+/-	+/-
L- Acido Aspartico	+	+	+
L- Acid Glutamico	+	+	+
L-Histidina	+	+	+
L- Acido Piroglutamico	+/-	+/-	-
L-Serina	+	+	+
Lincomicina	+	+	+
Guanidina HCl	+	+	+
Niaproof 4	+	+	+
Pectina	+	+	+/-
Acid D-Galacturonico	+	+/-	+

Acido L-Galactonico Lactona	+/-	+/-	-
Acido D-Gluconico	+	+	+
Acido D-Glucuronico	+	+/-	+
Glucuronamido	+/-	+	+
Acido Mucico	-	+/-	-
Acido Quinico	-	-	-
Acid D-Sacarico	+/-	+/-	-
Vancomicina	+	+	+
Violeta de Tetrazolio	+	+	+
Azul de Tetrazolio	+	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	+	+	+
Metil Piruvato	+/-	+	+/-
Acido D-Láctico metil éster	-	+/-	-
Acido L-Lactico	+	+	+
Acido Citrico	+	+	+
Acido α-ceto-Glutarico	+	+	+/-
Acido D-Malico	+/-	+	+/-
Acido L-Malico	+	+	+
Acido Bromo-Succinico	+/-	+/-	+/-
Acido Nalidixico	-	-	-
Cloruro de Litio	+	+/-	+
Telurito de Potasio	-	-	-
Tween 40	+/-	+/-	+/-
Acido γ-Amino-Butirico	+/-	+/-	+/-
Acido α-Hidroxi-Butirico	+/-	+	-
Acido β-Hidroxi-D,L-Butirico	+	+	+/-
Acido α-ceto-Butirico	-	-	-
Acid Acetoacetico	+/-	+/-	+
Acid Propionico	-	+	+
Acido Acetico	+	+/-	+/-
Acid Formico	+/-	+/-	+/-
Aztreonam	+/-	+/-	+/-
Butirato de Sodio	+/-	+/-	+/-
Bromato de Sodio	-	-	-

5

Tabla 58.

Prueba	Resultado		
	<i>Xenorhabdus nematophila</i> UNCSAB03-23-04	<i>Xenorhabdus nematophila</i> UNCSAB03-25-01	<i>Serratia marcescens</i> ss <i>marcescens</i> UNCSAB03-22-01
Control negativo	-	-	-
Dextrina	-	-	+/-
D-maltosa	-	-	+/-
D-trehalosa	+	+/-	+
D-Celobiosa	-	-	-

Gentiobiosa	-	-	+/-
Sacarosa	-	-	+
D-Turanosa	+/-	-	-
Estaquiosa	-	-	-
Control positivo	+	+	+
pH 6	+/-	+	+
pH 5	-	-	+
D-Rafinosa	-	-	-
α -D-Lactosa	-	-	+/-
D-Melibiosa	+/-	+/-	+/-
β -Metil-D-Glucosido	-	+/-	+/-
D-Salicina	-	-	+
N-Acetil-D-Glucosamina	+	+	+
N-Acetil- β -D-Manosamina	-	-	+
N-Acetil-D-Galactosamina	+/-	+/-	+
Acido N-Acetil Neuraminico	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 4%	-	-	+
NaCl 8%	-	-	+/-
α -D-Glucosa	+	+/-	+
D-Manosa	+	+	+/-
D-Fructosa	+	+	+/-
D-Galactosa	+/-	+/-	+
Metil Glucosa	+/-	+/-	+/-
D-Fucosa	+/-	+/-	+
L-Fucosa	+/-	+/-	+
L- Ramnosa	+/-	-	+/-
Inosina	+/-	+/-	+
Lactato de Sodio 1%	+	+/-	+
Ácido Fusidico	-	-	+/-
D-Serina	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	+/-
D-Manitol	-	-	+/-
D-Arabitol	-	-	+/-
mio-Inositol	+	+/-	+
Glicerol	+	+	+/-
D-Glucosa-6-PO ₄	+	+	+
D-Fructosa-6-PO ₄	+	+	+
Acido D-Aspártico	+	+	+/-
D-Serina	-	-	+
Troleandomicina	+	+	+
Rifamicina SV	+	+	+
Minociclina	-	-	+
Gelatina	-	-	+
Glicil-L-Prolina	+/-	+/-	+
L-Alanina	+	+	+
L-Arginina	+/-	+/-	+/-
L- Acido Aspartico	+	+	+
L- Acid Glutamico	+	+	+
L-Histidina	-	+	+
L- Acido Piroglutamico	+/-	+/-	-
L-Serina	+	+	+
Lincomicina	+	+	+

Guanidina HCl	+/-	+/-	+
Niaproof 4	-	-	+
Pectina	-	-	+
Acid D-Galacturonico	-	-	+
Acido L-Galactonico Lactona	+/-	+/-	-
Acido D-Gluconico	+/-	+/-	+
Acido D-Glucuronico	+/-	+/-	+
Glucuronamido	+/-	+/-	+
Acido Mucico	+/-	+/-	-
Acido Quinico	+/-	+/-	-
Acid D-Sacarico	+/-	-	-
Vancomicina	+	+	+
Violeta de Tetrazolio	+	+	+
Azul de Tetrazolio	+	+	+
Acido p-Hidroxifenilacetico	-	-	+
Metil Piruvato	+	+	+/-
Acido D-Láctico metil éster	-	-	-
Acido L-Lactico	+	+	+
Acido Citrico	+/-	-	+
Acido α -ceto-Glutarico	+/-	+/-	+/-
Acido D-Malico	+/-	+/-	+/-
Acido L-Malico	-	+/-	+
Acido Bromo-Succinico	+/-	+/-	-
Acido Nalidixico	-	-	-
Cloruro de Litio	-	-	+
Telurito de Potasio	+	+	-
Tween 40	+	+	+/-
Acido γ -Amino-Butirico	-	-	+
Acido α -Hidroxi-Butirico	+/-	+/-	+/-
Acido β -Hidroxi-D,L-Butirico	-	-	+/-
Acido α -ceto-Butirico	+	+	-
Acid Acetoacetico	+	+	+
Acid Propionico	-	+	-
Acido Acetico	+	+	+/-
Acid Formico	-	-	+/-
Aztreonam	+/-	-	+/-
Butirato de Sodio	-	-	+/-
Bromato de Sodio	-	-	-

REIVINDICACIONES

1) Un proceso para obtener un extracto biocida que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) aislar, purificar y cultivar un microorganismo;
b) preparar un pre-inóculo del microorganismo;
c) inocular el pre-inóculo con una resina adsorbente hidrofóbica bajo condiciones ambientales adecuadas; y
d) separar y eluir la resina con un solvente orgánico hasta obtener el extracto
10 bacteriano.

2) El proceso según la Reivindicación 1, donde el microorganismo es del género *Bacillus* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp, *Brevundimonas* sp, *Escherichia* sp, *Delftia* sp, *Acinetobacter* sp, *Photorhabdus* sp o *Xenorhabdus* sp.

15 3) El proceso según la Reivindicación 1, donde el microorganismo es de la especie *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis/cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens ss amyloliquefaciens*, *Bacillus oleronius*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia liquefaciens/grimesii*, *Serratia marcescens ss marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*
20 *ss aurantiaca*, *Pseudomona marginalis*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas tolaasii*, *Burkholderia dolosa*, *Brevundimonas diminuta*, *Escherichia hermannii*, *Delftia tsuruhatensis*, *Acinetobacter beijerinckii* o *Xenorhabdus nematophila*.

4) El proceso según la Reivindicación 1, donde las condiciones ambientales adecuadas
25 de la etapa (c) incluyen temperatura, tiempo, pH y agitación en los siguientes rangos:

Condición	Rango
Temperatura (°C)	20 a 35
Tiempo (horas)	120 a 240
pH	5,5 a 8,0
Agitación (rpm)	100 a 200

5) El proceso según la Reivindicación 1, donde la resina de la etapa (d) es una resina adsorbente de tipo polimérico.

30 6) El proceso según la Reivindicación 1, donde la elución de la etapa (d) se realiza con acetona, metanol, isopropanol y/o sus mezclas.

7) Un extracto biocida obtenido según el proceso de las Reivindicaciones 1 a 6.

35

8) El extracto biocida según la Reivindicación 7, caracterizado porque tiene actividad fungicida, insecticida y/o repelente.

RESUMEN

La invención se refiere un proceso para obtener un extracto biocida a partir de microorganismos del género *Bacillus* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp, 5 *Brevundimonas* sp, *Escherichia* sp, *Delftia* sp, *Acinetobacter* sp, *Photorhabdus* sp o *Xenorhabdus* sp, que comprende aislar y purificar el microorganismo, preparar un pre-inóculo, inocular en presencia de una resina adsorbente, y por último, separar y eluir la resina con un solvente orgánico hasta obtener un extracto bacteriano con actividad insecticida, fungicida y/o repelente.

10

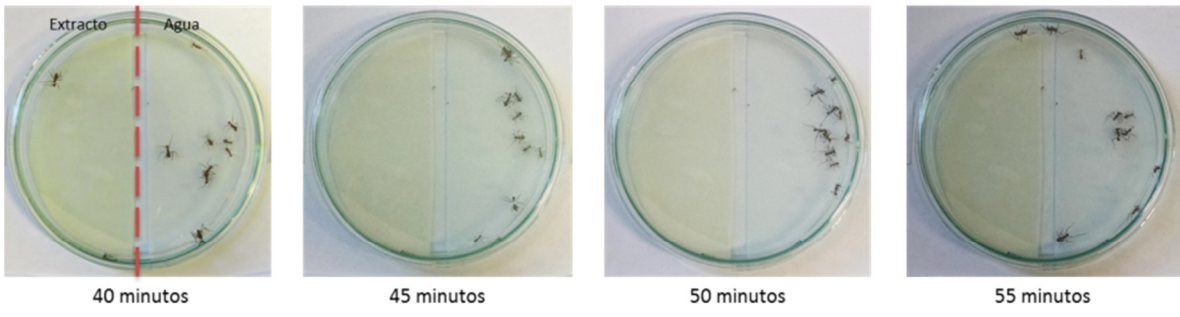


FIG. 1

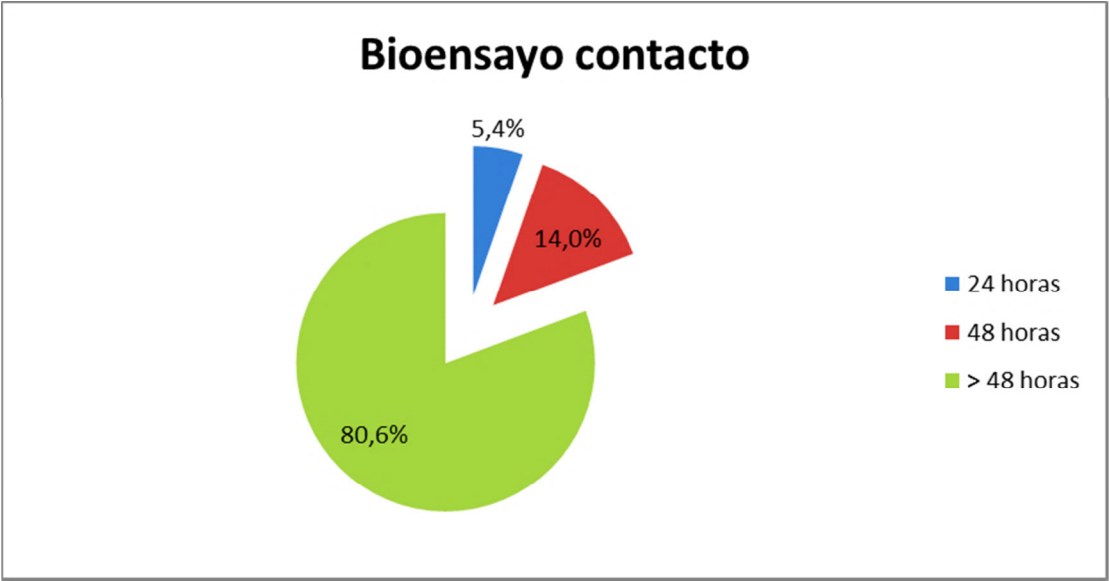


FIG. 2