

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DEHUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Detección de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* en muestras de agua y suelo de las provincias de Huamanga y Huanta**

**Tesis para optar el título profesional de Bióloga,  
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

**Bach. Mariela Cristina Prado Solier**

Asesor:

**Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua**

**Ayacucho - Perú**

**1995**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA

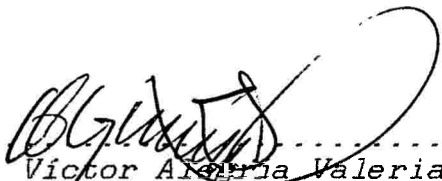
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS


ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE BIOLOGIA

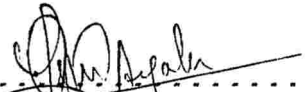
El Jurado Calificador da constancia de que el presente trabajo de Tesis presentado por la Bachiller **MARIELA CRISTINA PRADO SOLIER**, titulado:

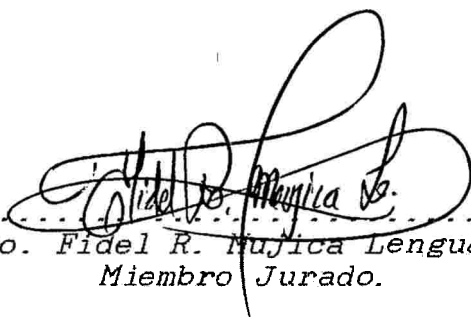
**"DETECCION DE *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* EN MUESTRAS DE AGUA Y SUELO DE LAS PROVINCIAS DE HUAMANGA Y HUANTA"**

Fue sustentado y aprobado con la nota de **TRECE (13)** con fecha 21 de diciembre de 1995.

  
.....  
Dr. Victor Alegre Valeriano.  
Presidente Jurado.  
Decano.

  
.....  
Blgo. Adrián Ramírez Quispe .  
Miembro Jurado.

  
.....  
Blgo. Mario Ayala Huaytalla.  
Miembro Jurado.

  
.....  
Blgo. Fidel R. Mujica Lengua.  
Miembro Jurado.

### DEDICATORIA

A mis tíos Carlos y Guilma, por su incondicional cariño y entrega.

A mi esposo e hijo, que son la razón de mis sueños y esperanzas.

A mis Padres, con cariño.

### AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Profesor Abad Flores Paucarima de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por darme la oportunidad de trabajar en su Laboratorio bajo su asesoramiento y ayuda, de igual manera al profesor Fidel Mujica Lengua de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por su acertada orientación.

A los profesores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Profesor Fernando Retuerto, José Pino, Amabilia Vilcapoma; quienes me brindaron todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología y Microbiología de alimentos de la UNMSM, y a todas las personas que de alguna manera han contribuido en la elaboración del presente trabajo.

## SUMARIO

<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>5</b>
<b>Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>11</b>
1.1 Antecedentes .....	11
1.2 Características Generales .....	15
1.3 Ecología - Habitats .....	25
1.4 Producción Comercial y Aplicación....	26
1.5 Bioinsecticidas Contra Vectores Humanos	29
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>32</b>
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusiones.</b>	
<b>Recomendaciones.</b>	
<b>Referencias Bibliográficas.</b>	
<b>Anexos.</b>	

## RESUMEN

Numerosas investigaciones realizadas en el extranjero por varios estudiosos como Monnerat, Schenkel, Padua, Ohba, Aizawa, Aronson y otros, demuestran que el uso de entomopatógenos es posible. Siendo esto un tema muy amplio, en el Perú se han iniciado las primeras investigaciones con bacterias que se realizan en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en la Universidad Nacional de Piura y la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la importancia de este trabajo se basa en el manejo de plagas, mejoramiento de la agricultura, fomentar el uso de bio-insecticidas y fomentar la protección del medio ambiente.

Por tanto los objetivos del presente trabajo de Tesis fueron la evaluación de la presencia de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus entomopatógenos en las provincias de Huamanga y Huanta y

asi contribuir a la aplicación de una metodología de aislamiento e identificación de las mismas en condiciones de laboratorio.

Se procesaron 63 muestras de agua y suelo, de las cuales se aislaron 537 colonias sospechosas, solo 6 cepas resultaron positivas en las pruebas respectivas, 3 de Bacillus thuringiensis y 3 de Bacillus sphaericus, este resultado nos indica que nuestra región posee una variada población de bacilos, pero las cepas buscadas se encuentran solo en un 9.6%.

Se concluye que se evaluó la presencia de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus en las provincias de Huamanga y Huanta, se contribuyó a la aplicación de una metodología de aislamiento en laboratorio, por lo que se recomienda realizar la preparación de medios de manera correcta, las pruebas bioquímicas, una vez más de lo que recomienda el manual, una buena tinción Gram y realizar pruebas de toxicidad de las cepas nativas frente a larvas de insectos de nuestra región.

## INTRODUCCION

El gran éxito de los insecticidas sintéticos orgánicos del tipo diclorodifeniltricloroetano (DDT) y (BHC) después de terminar la Segunda Guerra Mundial, dio inicio a una nueva era del control de plagas.

El número de plaguicidas registrados aumentó de 30 en 1936 a más de 900 en 1971 y la producción anual en los Estados Unidos, de menos de 100 millones a más de 1.4 miles de millones de libras en 1978.

La resistencia a los insecticidas se presentó por primera vez en dos años después de usar ampliamente el DDT contra las moscas. Un ejemplo más alarmante de esta espiral es el que se presentó en los algodones de Perú, Egipto, Centro América y Texas cuando *Heliothis zea* y *Heliothis virescens* desarrollaron resistencia a todos los insecticidas existentes.



Bajo estas condiciones, el costo de control de plagas ha hecho que la producción sea irreditable, además la enorme cantidad de pesticidas ha tenido efectos desastrosos en la calidad del ambiente y la presentación de riesgos muy serios para los trabajadores agrícolas.<sup>(21)</sup>

Como parte importante del manejo integrado de plagas, se inició el control microbiano, que se define como el uso de microorganismos o sus productos para el control de insectos plagas.

En la naturaleza, los virus, bacterias, hongos, protozoarios y sus productos microbianos, infectan los insectos y causan cuadros epizooticos en poblaciones naturales de insectos, esto ayuda en la regulación natural de poblaciones naturales de insectos.

Más de 1500 especies de microorganismos entomopatogenos han sido descritos con potencial en control microbiano de poblaciones de insectos plaga agrícola, forestales, ornamentales y salud.

En los Estados Unidos, las preparaciones que contienen Bacillus thuringiensis son los insecticidas microbianos más utilizados. Las formulaciones de este han sido más útiles para controlar las especies masticadoras del follaje del tipo Lepidóptera que ataca a los cultivos del Tabaco y las legumbres, en los que está restringido el uso de insecticidas químicos debido a los residuos

tóxicos.

Países tropicales son los principales lugares de desarrollo de diferentes especies de mosquitos que transmiten enfermedades metaxénicas humanas como la Malaria, Filariasis, Fiebre Dengue hemorrágica y Fiebre Amarilla. Cepas de Bacillus sphaericus fueron encontradas en Indonesia, Malasia y Tailandia, Singapur y otros.<sup>(17)</sup>

La biotecnología agrícola aplicada al control de plagas agrícolas, aún no tiene amplio desarrollo en nuestro país, entre los únicos trabajos realizados que se conocen están los de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Universidad Peruana de Cayetano Heredia y algunas otras instituciones, que han alcanzado aislar algunas cepas nativas de Bacillus entomopatógenos y realizar las pruebas preliminares de toxicidad, estos trabajos paulatinamente alcanzarán un nivel semi-comercial para la producción de compuestos agrobiológicos útiles para el hombre, plantas y animales.

En la revisión bibliográfica reseñada se explica en forma resumida el comportamiento de estos dos bacilos, desde sus características morfológicas, nutricionales, bioquímicas, toxinas, modo de acción, producción comercial, toxicidad contra vectores humanos, etc.

En el presente trabajo se reporta el aislamiento y caracterización de Bacillus thuringiensis y Bacillus

sphaericus que después de una observación microscópica nos dieron buenos resultados, con el aislamiento de 6 cepas de Bacillus, 3 de Bacillus thuringiensis y 3 de Bacillus sphaericus.

Esta investigación tiene como uno de sus objetivos el contribuir al desarrollo bio-tecnológico de Ayacucho y por supuesto del país, con la detección de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus entomopatógenos de muestras de suelo y agua; de la sub región WARI.

Para concluir decimos que siendo esta una experiencia nueva, se agrega al culminar el trabajo algunas recomendaciones para obtener mejores resultados, discutiendo los beneficios y contrariedades que nos da esta investigación. Los trabajos realizados indican que existe dificultad, pero esto no es motivo suficiente como para no intentar llegar al nivel de poseer un fermentador que trabaje con cepas nativas de la región y ensayarlas contra plagas también de la misma región, constituyendo este trabajo un semillero de una investigación de biotecnología de bioinsecticidas que podría realizarse en un futuro muy cercano.

El siguiente trabajo busca iniciar los estudios biotecnológicos, para que en el futuro, se pueda utilizar productos bioinsecticidas propios de la región, para las

plagas de la región.

**OBJETIVOS:**

- 1º Detectar la presencia de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus entomopatógenos en nuestra región.
- 2º Contribuir con la aplicación de una metodología de aislamiento e identificación de cepas nativas de estos bacilos en condiciones de laboratorio, especialmente adaptadas a nuestra realidad.
- 3º Fomentar el uso de bioinsecticidas con el fin de disminuir el uso indiscriminado de insecticidas químicos que ocasionan serios daños al medio ambiente.
- 4º Impulsar el conocimiento profundo del potencial de los microorganismos entomopatógenos para incrementar las posibilidades de utilización de estas bacterias en condiciones de laboratorio y posteriormente en condiciones naturales de esta región.

## REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1.1 ANTECEDENTES:

El control microbiano fue definido por Falcón en el año 1971 como "El que incluía todos los aspectos de la utilización de los microorganismos o sus productos secundarios en el control de las plagas representadas por los insectos.". Dicha definición incluye el uso de microorganismos como agentes de control que se presenta en forma natural, agentes de control introducidos y la aplicación de microorganismos, sus productos, como insecticidas microbianos, o de ambos. Se conocen más de 1500 microorganismos patógenos (National Academy of Sciences, 1979), lo que probablemente es sólo una pequeña fracción del número total de patógenos que ataca a los insectos. Sin embargo, se sabe poco a cerca de la mayoría de esos patógenos, mientras que otros como la bacteria formadora de esporas, Bacillus thuringiensis Berliner y

algunos otros virus de insectos han sido ampliamente estudiados.<sup>(21)</sup>

### *Bacillus thuringiensis*

La toxicidad a insectos de este grupo de bacilos, fueron descritos por primera vez en 1902 por Ishiwata, aislado del Gusano de Seda *Bombix mori* en Japón, posteriormente los cuerpos de inclusión fueron descritos por Berliner en 1915 y nuevamente por Mattes en 1927.<sup>(4)</sup>

Durante muchos años se ha utilizado *Bacillus thuringiensis* para destruir ciertas plagas de las siembras y los bosques. Hasta 1977 todas las cepas conocidas de este bacilo sólo eran específicas para las orugas. Por lo tanto hubo una gran sorpresa cuando H. de Barjac, Jefa del Centro Internacional de Referencia para *Bacillus thuringiensis*, albergado por el Instituto Pasteur identificó ese año una nueva cepa bacteriana sumamente patógena para las larvas de mosquitos. Esta misma cepa había sido descubierta en Israel algunos meses antes por L.J. Goldberg y J. Margalit. Esta cepa fue denominada H-14, pues ya se conocían otros 13 serotipos diferentes.<sup>(32)</sup>

*Bacillus thuringiensis* serovar *Israelensis* aislado por Goldberg y Margalit es patógeno a larvas de especies de Dípteros, semejante a los mosquitos y moscas.<sup>(8)</sup>

Padua y alumnos, en 1982 durante los estudios de la distribución natural de Bacillus thuringiensis en Filipinas, aislaron una cepa de Bacillus thuringiensis subespecie morrisoni (serotipo Ba:8b) que demostró ser alta y selectivamente tóxica para larvas de mosquitos.<sup>(13)</sup>

Se han realizado muchos trabajos en todos estos años. El cristal de esta bacteria, fue descubierto por Hannay en 1957 y su toxicidad por Angus en 1956. En Japón Bacillus thuringiensis fue ubicado en el suelo por Ohba y Aizawa en 1986 y por Kikuta en 1989.

Se realizó la clonación del gen de la delta endotoxina en 1981 a cargo de Schnepf y Whiteley, posteriormente conforme la ciencia y los estudios avanzan se ha logrado conocer la estructura del cristal, este trabajo fue realizado por Li en 1991.

Este bacilo, gram positivo, formador de esporas, productor de inclusiones parasporales está distribuido en los suelos de varias regiones del mundo, trabajos realizados por De Lucca, Padua, Martin y Travers, Li, Hastow y otros lo demuestran y dan la posibilidad al mundo de una nueva era en la tecnología microbiana.

#### Bacillus sphaericus:

Las primeras cepas de Bacillus sphaericus tóxicas a

mosquitos fueron reportados en 1956 por Kellen et.al.

Desde entonces, muchos otros la aislaron, siguiendo la necesidad de encontrar un nuevo agente biológico potente para controlar la población de larvas de mosquitos.<sup>(38)</sup>

En 1975 Davidson, Singer y Briggs aislaron la cepa SSII-1 de la India, que fue la primera cepa evaluada para una fermentación primitiva. Una búsqueda específica de cepas que manifestaron mayor actividad, dio por resultado el descubrimiento de variedades que al parecer podrían ser tan eficaces como los larvicidas químicos. En la actualidad la mas importante de ellas en proceso avanzado de desarrollo es una cepa denominada 1593, que ha sido producida de manera experimental por la industria y evaluada en el campo. Algunas otras cepas de este bacilo descubiertas con posterioridad al año de 1981, parecen igualmente prometedoras como la nueva cepa de Bacillus sphaericus que fue aislada de una mosca negra de un sitio de crianza en Nigeria por I. Wensler (1984), esta cepa fue designada 2362, es del tipo de fago idéntico y serotipo H que la cepa 1593 pero es reportada por ser algo mas insecticida que la cepa 1593 a larvas de especies de mosquitos susceptibles.<sup>(7)</sup>

Wickremesinghe y Mendis en 1980 aislaron la cepa en



Sri Lanka llamada MR-4 que después recibió la designación de 2297, esta cepa es una de las principales candidatas de interés para el campo, por la presencia de un muy largo cuerpo parasporal (cristal) similar pero no idéntico al cristal de Bacillus thuringiensis.<sup>(9)</sup>

## 1.2 CARACTERISTICAS GENERALES:

### 1.2.1 Características de Bacillus thuringiensis.

#### MORFOLOGIA:

Bacillus thuringiensis es una bacteria entomopatógena gram positiva usada para el control de larvas de especies de lepidópteros y dípteros.<sup>(20)</sup>

Bacillus thuringiensis es una bacteria cristalífera, formadora de esporas, extremadamente relacionada con Bacillus cereus. El ciclo de vida de Bacillus thuringiensis como la de otros bacilos es caracterizado por dos distintos pasos la división celular vegetativa y el desarrollo de la spora. La célula vegetativa es de forma de barra de 2 a 5 um de longitud y 1.0 um de ancho. La división celular se caracteriza por la formación de una septum división que fue iniciado a lo largo de la mitad de la membrana plasmática y usualmente se sitúan membranas como vesículas, que son interpretadas como

mesosomas que aparecen casualmente a lo largo de la periferie de la célula vegetativa y están asociados con la membrana plasmática.<sup>(4)</sup>

#### REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES:

Un aspecto de la biología de Bacillus thuringiensis que recibió una atención limitada es la nutrición.

El primer medio sintético definido químicamente para el desarrollo del crecimiento, esporulación y formación del cristal paraesporal fue diseñado por Nickerson y Bulla (1978), este fue llamado medio BM. De las muchas subespecies de Bacillus thuringiensis, ninguno puede crecer en medio de Glucosa y sales fuera de la adición de factores seguros de crecimiento. Concentraciones de L-Cisteína asegura el crecimiento pero inhibe la esporulación y síntesis del cristal. El Glutamato, Aspartato, Citrato, EDTA, Cistina y Tiosulfato forman una clase de componentes que permiten el crecimiento de Bacillus thuringiensis y ellos pueden hacerlo en la presencia de Cloranfenicol.

El crecimiento óptimo se da en un rango de 30 C. El tamaño del cristal depende de la concentración de Glucosa. Se observó que el aumento de oxígeno

durante la esporulación permite la formación de cristales pequeños pero acelera la formación de la espora.

#### CRISTAL DE Bacillus thuringiensis:

En cuanto al origen y función del cristal parasporal surgen algunos cuestionamientos. ¿Porqué la segura formación y porqué el organismo la necesita?. Varias presunciones pueden ser hechas: 1º Es un vestigio de la evolución; 2º esta representa un intermediario del producto final del metabolismo; 3º este sirve como reserva de alimento; 4º este es el resultado de una síntesis específica designado a proporcionar a la bacteria una ventaja selectiva y 5º representa un sobreproducción de componentes que cubre a la espora. Otras hipótesis asociadas a la función del cristal paraesporal incluyen: el servir como mecanismo de detoxificación; método de escape a la muerte debido a un desequilibrado crecimiento y autoinhibición de la germinación. Estas ideas también son expresadas por la función de antibióticos peptídicos en varias especies de *Bacillus*.

Existen variaciones tanto en el número, forma y composición de estas inclusiones paraesporales.

Algunas cepas de Bacillus thuringiensis subespecie Murstaki. Pi ( $\delta$ -endotoxina) contienen cristales bipiramidales ocasionalmente de forma irregular, usualmente una inclusión por célula, pero hay otras que contienen 2 o mas cristales.

El cristal mide aproximadamente de 1 a 1.5  $\mu$ m de longitud siendo el sitio de deposición fuera de la exospora, y el tiempo de formación en el estadio II - III de esporulación.<sup>(2)</sup>

La forma del cristal varia según la especie, pueden ser cuboidales, bipiramidal, ovoide y amorfos, midiendo de 0.1 a 0.5  $\mu$ m de longitud, siendo el sitio de formación entre el estado II y III de la esporulación.<sup>(4)</sup>

Varias técnicas fueron usadas para estudiar el empaque de proteínas moleculares en el enrejado cristal. Estas condujeron que el cristal está constituido de una cara centrada cúbica, con un orden de moléculas arregladas en dos filas a cada paso de la cara del cristal.<sup>(4)</sup>

#### TOXINAS Y TOXICIDAD:

Bacillus thuringiensis tiene como característica la producción de una inclusión proteínacea

insecticida constante durante el proceso de formación. Encuentra varios sinónimos en la literatura, como cuerpo parasporal, proteínas del cristal y  $\delta$ -endotoxina; pero también se ha encontrado variedades de Bacillus thuringiensis que excretan un segundo metabolito durante el crecimiento de la célula vegetativa como un nucleótido, designado  $\beta$ -exotoxina.<sup>(18)</sup>

Bacillus thuringiensis se caracteriza por producir una gran variedad de toxinas con diversas propiedades; otras toxinas aparte de las ya mencionadas, menos significativas son: La fosfolipasa C ( $\alpha$ -exotoxina), una enzima no identificada que puede no ser tóxica ( $\gamma$ -exotoxina).

$\delta$ -endotoxina: Es la toxina mas ampliamente estudiada de Bacillus thuringiensis. Está contenida en el cristal parasporal proteinico, el cual es termolábil y soluble en soluciones alcalinas. Se sabe que esta toxina está presente en el cristal como una protoxina, el cual es hidrolizada a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales del hospedero. Al realizar estudios bioquímicos del cristal se obtiene péptidos de diferentes pesos moleculares, un péptido de 135.000 Da. denominado P1, el cual es tóxico contra Lepidópteros y un segundo

péptido de 65000 Da. denominado P2, el cual resultó ser tóxico contra Dípteros además de serlo contra Lepidópteros como P1.

#### MODO DE ACCION:

Bacillus thuringiensis esta caracterizado por tener una toxina que actúa a nivel intestinal, en organismos susceptibles que la ingieren. Esta bacteria produce toxinas durante la esporulación, que son depositadas como inclusiones parasporales y en algunos casos se encuentran también en la superficie de la espora.<sup>(2)</sup>

Cuando la inclusión o espora es ingerida por larvas susceptibles por ejemplo: Lepidóptera y Díptera, el primer síntoma observado es el cese de la alimentación, usualmente después de una hora. Esto es debido a la  $\delta$ -endotoxina y al cristal que son rápidamente digeridos y activados dentro del estómago del insecto por enzimas proteolíticas, a causa de la disolución del cristal en el intestino que tiene pH alcalino, después de 10 minutos de haberse suprimido la alimentación, se produce daño histológico del epitelio del intestino del hospedero para así después provocar la muerte del insecto por parálisis o septicemia. Esto ocurre entre 1 a 7 días

después de la ingestión.<sup>(13)</sup>

### 1.2.2 Características de Bacillus sphaericus

#### MORFOLOGIA:

Bacillus sphaericus es una bacteria gram positiva aeróbica con formación de esporas circulares que se encuentran en el suelo y agua.<sup>(17)</sup>

Siendo la dimensión de la célula menor de 1.0 um, la forma del bacilo a diferencia de Bacillus thuringiensis es semejante a la de un palillo de fósforo, un extremo ovalado y el otro circular, debido a la localización de la espora.<sup>(37)</sup>

En el curso de la esporulación algunas cepas de Bacillus sphaericus sintetizan una inclusión parasporal o cristal la cual contiene proteínas tóxicas para larvas de una variedad de especies de mosquitos.<sup>(3)</sup>

#### REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES:

Esta bacteria se caracteriza por la reacción negativa a las tradicionales pruebas fenotípicas usadas para la clasificación de Bacillus. Estas son fisiológicamente aeróbicas obligadas, todas son capaces de usar Gluconato, muchos tipos utilizan una

variedad de componentes de Carbono, los mayores incluyen Ácidos grasos, intermediarios del ácido tricarbóxico y aminoácidos, la mayoría de los tipos son capaces de utilizar Adenina, pueden crecer a 50°C y los factores de crecimiento requeridos son Biotina y Tiamina.<sup>(3)</sup>

Un medio selectivo (BATS), que contiene Arginina como única fuente de Carbono y Nitrógeno y el cual contiene también Estreptomina, permite el crecimiento de 18% de cepas Bacillus sphaericus patógenas de mosquitos. Esta inhibe el crecimiento del 68% de cepas no patógenas de Bacillus sphaericus.<sup>(44)</sup>

#### CRISTAL DE Bacillus sphaericus:

El cristal de Bacillus sphaericus es paralelepípedo, en la demostración interior y cristalina, es una estructura enrejada con estrías de alrededor de 6.3 nm. El cristal es bordeado por una envoltura similar en apariencia al que circunda al cristal de Bacillus thuringiensis.

La relación entre el crecimiento, esporulación, formación de cristal y la toxicidad para las larvas de mosquitos fue estudiada en las cepas 1593, 2297 y 2362. La formación del cristal fue detectada



inmediatamente después de la formación del septum por la célula esporulada, correspondiendo al inicio del estadio III en el ciclo de la esporulación. Esta observación sugiere que el cristal de Bacillus sphaericus es formado mas temprano que el cristal de Bacillus thuringiensis variedad Kurstaki. La toxicidad a las larvas es paralela a la aparición y desarrollo del cristal. Las proteínas 51 y 42 KD están ausentes en la fase exponencial del crecimiento y aparecen aproximadamente iguales durante la esporulación.<sup>(3)</sup>

#### TOXINAS Y TOXICIDAD:

Los principales compuestos del cristal son 2 proteínas de 51 y 42 KD, ninguna proteína sola es tóxica para la larva, requiere ambas para la toxicidad.

Algunas algas Cianofitas contienen genes que codifican las proteínas tóxicas de Bacillus sphaericus, las algas han integrado en su genoma y producen el cristal, el mosquito se alimenta también de estas algas y se obtiene un buen resultado, la diferencia se encuentra en que Bacillus sphaericus no crece en los cadáveres, pero el efecto tóxico es el mismo, este tipo de técnica puede ser que

provoque un tipo de resistencia, pero es una buena estrategia.

No existen Bacillus sphaericus que sean tóxicos para Aedes, moderadamente tóxicos para Anopheles, pero si tóxicos para especies de Culex.

La toxicidad para larva está asociado con una fracción contenido en el cristal.<sup>(3)</sup>

El análisis de genes de toxinas de 51 y 42 KDa de varias cepas de Bacillus sphaericus revelaron la existencia de una familia de secuencias relacionadas, pero no es claro si estos genes están localizados en el cromosoma o en los plásmidos.<sup>(17)</sup>

#### MODO DE ACCION:

Durante la ingestión del cristal por la larva del mosquito estas proteína de 51 y 42 KDa son solubilizadas en el intestino medio. Los estudios de microscopia electrónica han indicado que las células epiteliales del intestino medio son el blanco primario de la toxina. La solubilización de las proteínas se dan por una combinación del pH alcalino y proteolisis. Las moléculas de alto peso molecular son protóxicas, la proteolisis en el intestino medio permite su conversión a toxinas de

bajo peso molecular. Las proteínas individuales son tóxicas cuando son usadas en huéspedes susceptibles.<sup>(3)</sup>

Quiere decir que estas proteínas, que se encuentran en el cristal se liberan de él, por el alto pH del intestino del hospedero, rompen las membranas de las células epiteliales del mesenteron, hacen orificios que salen del mesenteron hacia la hemolinfa, el contenido de pH sube y los paraliza, mata al insecto en cuestión de horas, a veces en minutos.

### 1.3 ECOLOGIA - HABITATS DE Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus:

El principal habitats de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus es el suelo donde forman parte de la flora bacteriana zimógena.<sup>(37)</sup>

También se encuentran en aguas estancadas, especialmente Bacillus sphaericus, esta tiene una gran ventaja en relación a Bacillus thuringiensis pues este puede reproducirse profusamente en los cadáveres de los insectos muertos y en otros se mantiene por mucho tiempo hasta por 2 años y siguen siendo tóxicos, Bacillus sphaericus resiste ambientes muy contaminados como aguas estancadas, charcos, lodo, etc., mientras que Bacillus

thuringiensis generalmente muere, en estos nichos ecológicos siendo su habitat mas común el suelo ligeramente húmedo y hojas de plantas, de las cuales se ha aislado ya algunas cepas de este bacilo.

Sin duda la espora es la estructura que soporta temperaturas. bajo cero y hasta 121°C, también las variaciones. del clima desde el verano hasta el invierno.<sup>(37)</sup>

#### 1.4 PRODUCCION COMERCIAL Y APLICACION DE Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus:

Los trabajos realizados indican que existe dificultad si se pretende establecer un modelo que relacione la formulación de un medio de cultivo, tiempo de esporulación, tamaño del cristal y nivel de costo del bioinsecticida, debido a las diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno probadas que conducen a resultados variados. Por lo anterior, podría decirse que la mejor forma de indicar el establecimiento de un proceso para la obtención de este tipo de compuestos, es a través de la selección de cepas nativas a partir de suelo, larvas enfermas o muertas, aisladas de la región en donde se desee aplicar el bioinsecticida. Un aspecto significativo es el desarrollo experimental que implica el estudio del microorganismo seleccionado, desde la etapa de su

aislamiento y requerimientos nutricionales, es decir la formulación del medio de cultivo que no involucra un balance entre los ingredientes del caldo de fermentación y la composición química del microorganismo, lo cual, habrá de conducir a que, bajo las condiciones mas apropiadas de propagación y formación de la  $\delta$ -endotoxina, el microorganismo ofrezca valores altos en los coeficientes de rendimiento (gramos de células/gramo de sustrato, kilo calorías/gramo de biomasa, gramos de biomasa/gramo de oxígeno, etc.). Una vez definido el medio mas apropiado sobre el cual la cepa presente una mejor toxicidad en los bioensayos a nivel de laboratorio contra el insecto blanco, es necesario un diseño experimental, a nivel de fermentador, el cual depende de las facilidades que existan, podría variar en capacidad, etc.

El campo de la biotecnología para la producción de bioinsecticidas, es amplio y nuevo en nuestro país, y mas aún en nuestra Ciudad, a pesar que este tipo de compuestos se produce ya a escala industrial en otros países. Se considera que es bastante lo que se puede mejorar si se establece este concepto pensando en el desarrollo tecnológico de nuestra Ciudad y por ende del País, debido a cuatro factores principales:

19 Diversidad de tipos de cultivos que producimos.

- 20 Insectos plaga de importancia local y nacional.
- 30 Diferentes tipos de materias primas para la formulación de medios.
- 40 Habitat de aplicación de diversos climas y condiciones y ofreciendo por último el control microbiológico de insectos plaga usando bioinsecticidas.

Existen muchos productos comerciales a base de Bacillus thuringiensis, la mayoría a base de la variedad Kurstaki, como: Dipel, Biobit, Bactospeine, Condor, Cutlass, Larvo Bt. En 1977, fue determinado que Bacillus thuringiensis es generalmente activo contra larvas de Lepidópteros, recientes descubrimientos en Israel del aislamiento de una cepa de Bacillus thuringiensis con altos niveles de toxicidad para larvas de mosquitos y moscas, pero no activos para plagas de gusanos, sirvieron de base para la producción comercial de Bacillus thuringiensis que controla diversa variedad de moscas, en 1987. El descubrimiento, en 1983 y 1985 de aislamiento de variedad San Diego, expandió el potencial comercial de Bacillus thuringiensis, finalmente en 1990, aprobaron regularmente la manipulación genética, muerte, bioingeniería de productos a base de la  $\delta$ -endotoxina de Bacillus thuringiensis, con actividad contra pestes de

caterpillar y escarabajos.<sup>(13)</sup>

La producción de Bacillus sphaericus con una retención de la actividad insecticida, estuvo archivado, pues este es mas delicado que en el caso de Bacillus thuringiensis. La composición del medio, las condiciones del cultivo durante la esporulación son factores que tienen gran influencia en el potencial insecticida de un proceso de fermentación.

El descubrimiento de Bacillus sphaericus para el uso en campo está investigado y coordinada por la Organización Mundial de la Salud (WHO). Producción de polvo experimental en varios laboratorios están constantemente evaluadas en el mundo, observando que cepas de Bacillus sphaericus son la base como segunda opción como larvicida para el control de vectores de enfermedades metaxénicas.<sup>(14)</sup>

#### 1.6 BIOINSECTICIDAS CONTRA VECTORES HUMANOS:

Existe evidencia que en la primera prueba de campo de Bacillus thuringiensis, se encontró potencial larvicida contra vectores de infecciones humanas; siendo la cepa de Bacillus thuringiensis variedad Israelensis. la que demostró más eficacia, es por esta razón que Instituciones científicas como la Organización Mundial de la Salud e Industrias privadas promueven el desarrollo

de estudios de campo con Bacillus thuringiensis variedad Israelensis, con especial énfasis en las condiciones de fermentación local y en preparaciones comerciales producidas por Biochein Ltd. Laboratorios Abbott y Sandoz Ltd. El programa más impresionante de producción a gran escala usando Bacillus thuringiensis variedad Israelensis fue en Africa en 1984, varios cientos de miles de litros del producto fueron usados para el control de Smudium damnosion (mosca negra) el vector de Oncocercosis, en un área grande en donde este insecto desarrolla resistencia a los insecticidas químicos. La eficacia del insecticida bacteriano fue excelente. (18)

Nuestro país presenta infecciones tropicales: Malaria, Fiebre amarilla, etc., transmitidas por Anópheles, Aedes y otros, que son susceptibles de control con Bacillus thuringiensis, pero, para obtener buenos resultados, el insecticida bacteriano debe ser aislado, probado, producido y usados en programas de control, como se hace en otros países. (18)

El serotipo H-14 de Bacillus thuringiensis es capaz de matar larvas de Aedes aegypti en menos de 15 minutos, vector de la fiebre amarilla y el dengue hemorrágico febril. Igualmente es efectivo por lo menos contra larvas de 6 especies de mosquitos, incluso Anópheles stephensis,



importante vector de la Malaria, teniendo la ventaja de no afectar otros aspectos ambientales ni ser dañino para el ser humano.<sup>(32)</sup>

Se han comprobado que ciertas cepas de Bacillus sphaericus son ligeramente patógenas a causantes de enfermedades, en larvas de mosquitos. La más importante de ellas es la cepa 1593 que ha sido producida experimentalmente por la industria y evaluada en el campo.<sup>(3)</sup>

Bacillus thuringiensis difiere de Bacillus sphaericus en la naturaleza de sus toxinas y el rango de hospedero. En general, Bacillus sphaericus es más activo contra Culex y Anopheles spp. y poco activo contra Aedes spp., en cambio Bacillus thuringiensis variedad israelensis es más activo contra Aedes y Culex spp. y menos activo contra Anopheles spp., este es más activo contra moscas negras que Bacillus sphaericus.

## MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Materiales:

#### A. Material Biológico:

Cepas standard obtenidas del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Western Ontario, Health Sciences Centre. London Ontario NGASCL. CANADA.

Bacillus thuringiensis var. Israelensis H-14.

Bacillus thuringiensis var. Kurstaki HD-1.

Bacillus sphaericus B4291.

#### B. Material de Vidrio:

06 Matraces 100 ml.

05 Matraces 250 ml.

02 Matraces 500 ml.  
01 Probeta 500 ml. 10/1  
60 Placas. Petri 15 x 100 mm.  
30 Tubos de Prueba c/tapa rosca 10 x 75 mm.  
30 Tubos de Prueba 16 x 150 mm.  
30 Tubos de Prueba 13 x 100 mm.  
50 Tubos de Prueba 10 x 75 mm.  
05 Pipetas Serológicas 10 ml.  
05 Pipetas Serológicas 05 ml.  
10 Pipetas Serológicas 01 ml.  
10 Espátulas de Drigalsky  
04 Frascos Goteros 30 ml.  
10 Doc. Láminas Portaobjetos  
10 Doc. Laminillas Cubreobjetos

**C. Reactivos:**

Fosfato disódico hidrogenado  
Fosfato de potasio dihidrogenado  
Cloruro de Sodio  
Sulfato de Magnesio  
Hidróxido de Sodio  
Hidróxido de Potasio  
Peróxido de Hidrógeno  
Acido Clorhídrico  
Alcohol Etílico  
Alpha Naftol  
Creatina

Phenil Alanina  
Estreptomicina Sulfato  
Aceite de Cedro  
Xilol  
Cristal Violeta  
Rojo de Fenol

**D. Medios de Cultivo:**

Extracto de Levadura  
Extracto de Carne  
Peptona de Carne  
Peptona de Caseína  
Tryptona  
L-Arginina  
Biotina  
Tiamina  
Glucosa  
Agar-Agar

**E. Otros:**

Papel Filtro  
Filtro de Membrana  
Papel Kraft  
Gradillas x 24 espacio  
Algodón Hidrófilo  
Gasa  
Asa de Siembra  
Espátulas

## 4.2 Métodos:

### A. Toma de Muestra:

Se tomaron muestras aproximadamente 100 gr. de suelo procedentes de diferentes áreas geográficas de Huamanga y Huanta (Tabla 1), en bolsas de polietileno y las muestras de agua en frascos estériles de 250 ml. "SCHOTT DURAN" y se anotaron los datos de muestreo en respectivas fichas. Se trasladaron al laboratorio para su procesamiento, las muestras de agua se guardaron a bajas temperaturas.

### B. Aislamiento e Identificación Microscópica:

- Se pesó 1 gr. de suelo y se colocó en 9 ml. de solución salina, se decantó o centrifugó a 1500 rpm. por cinco minutos.
- Se trasbasó el sobrenadante y se sometió a Baño María a 80°C por 10 minutos, luego se colocaron en agua fría, este constituye la dilución 10-1. Para muestras de agua aparte se filtraron con un filtro de membrana de 0.43 µ de porosidad "MILLIPORES", luego se colocó lo

filtrado en un tubo con solución salina y se incubaron a 80°C por 10 minutos, se colocó 1 ml. del filtrado en un tubo con 9 ml. de solución salina para constituir la dilución 10<sup>-1</sup>. Luego se efectuaron diluciones en solución salina hasta 10<sup>-4</sup> en ambos casos.

- Se sembraron las diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> por incorporación en placas petri con Agar Nutricio y en Agar Selectivo BATS para Bacillus sphaericus colocando 0.1 ml. de dilución en cada placa y esparcir con una espátula de Drigalsky.

Simultáneamente se sembrará 1 ml. de la dilución 10<sup>-0</sup> en Caldo Acetato para el enriquecimiento de Bacillus.

- Realizar la observación microscópica a inmersión y luego teñir las láminas con Cristal Violeta, localizando esporas y cristales típicos. Se efectuaron comparaciones con el patrón y se formaron ceparios en Agar Nutricio de las muestras consideradas positivas.

**C. Recuento de Mesófilos Aerobios Viables:**

- Colocar 10 gr de suelo o 10 ml. de agua en 90 ml. de solución salina peptonada, lo cual constituye la dilución 10-1.

Se efectuaron diluciones colocando 1 ml. de la dilución anterior en 9 ml. de solución salina peptonada hasta la dilución 10-6.

- Se siembra en placas 1 ml. de las diluciones 10-5 y 10-6 en Agar Nutricio y Agar de recuento de colonias (APC). Se incuban a 37°C por 24 o 48 horas y se efectúa el recuento de mesófilos aerobios viables.

**D. Identificación Bioquímica:** Para la diferenciación de los microorganismos seleccionados se efectuaron las siguientes pruebas:

- Catalasa:

Esta prueba indica el desprendimiento de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> en presencia de Peróxido de Hidrógeno.

Procedimiento: Hacer el cultivo en caldo

Nutricio e incubar a 37 C por 48 horas.

Luego agregar 0.5 ml. de peróxido de Hidrógeno y observar la formación de gas.

- Reacción de Voges Proskauer: Algunos bacilos producen Acetil Metil Carbinol y que en presencia de un reactivo que contiene NaOH al 40% y alfa-naftol con creatina. La prueba positiva se revela mediante una coloración roja después de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente.

Procedimiento: Se realizan cultivos por duplicado en caldo MR-VP y se incuban a 37°C por 48 horas.

Se agrega el reactivo Voges Proskauer y se observa la formación de color rojo o rosado al cabo de 30 o 60 minutos. Si el resultado es negativo realizar la prueba después de 7 días.

- Fermentación de Glucosa: La utilización de Glucosa se evidencia por el viraje del indicador rojo de fenol.

Procedimiento: Se realizan cultivos en Agar Glucosado Rojo de Fenol y se incuban



a 37°C por 48 horas, luego de este tiempo observar el cambio de color rosado a púrpura. En algunos casos es necesario esperar hasta 15 días.

- Hidrólisis de Caseína: Debido a que la leche es un excelente medio de cultivo, se utiliza para diferenciar microorganismos, basándose en la fermentación de lactosa, caseolisis y por las propiedades de coagular la caseína, que se evidencian con el aclaramiento del medio.

Procedimiento: Se inoculan las muestras en Agar leche por estriado, incubar a 37°C, examinar después de 7 a 14 días el aclaramiento del medio, en algunos casos hay necesidad de esperar hasta 21 días.

- Prueba de Lecitina: El caldo yema de huevo es un medio que permite diferenciar a los microorganismos, especialmente bacilos gram positivos, el componente lipoproteico del huevo mezclado con agua destilada, es degradado por una enzima llamada Lecitinasa.

Procedimiento: Se inocula el caldo yema de huevo con 2-3 asadas del microorganismo testigo, incubar a 37°C, se observa después de 1, 3, 5, 7 y 14 días la aparición de un precipitado blanco en la superficie del medio y el aclaramiento de éste, lo cual indica la hidrólisis de la lecitina de yema de huevo.

- Prueba de Fenil Alanina: Algunos microorganismos son capaces de desaminar la fenil alanina convirtiéndolo en ácido fenil pirúvico, que se evidencia por el cambio de color al agregar al cultivo Cloruro Férrico al 10%.

Procedimiento: Se inocula cultivos de los microorganismos en prueba por duplicado en Agar Fenil Alanina por 7 días a 37°C, luego se coloca 4 o 5 gotas de solución de Cloruro Férrico al 10%, a los cultivos y se observa la aparición de un color verde esmeralda que indica positividad de la prueba.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se trabajó un total de 63 muestras, de las cuales 39 fueron de suelo y 24 de agua, se aislaron 537 colonias sospechosas de *Bacillus* confirmados por observación microscópica, de las cuales solamente 6 se referían a las especies buscadas, obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA N°1: LUGARES DE MUESTREO

N° DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
01	Tierra de Jardín	Alameda-Hga.
02	Tierra cultivo alfalfa	Huatatas-Hga.
03	Tierra cultivo Quinoa	Huatatas-Hga.
04	Tierra cultivo Maiz	Huyuhuilca-Hta.
05	Tierra cultivo Trigo	Huyuhuilca-Hta.
06	Tierra Cultivo Maiz	Socoscocha-Hta.
07	Agua riachuelo	Huntulichacc-Hta.
08	Agua manantial	Huntulichacc-Hta.
09	Agua de río	Huyuhuilca-Hta.
10	Agua de río	Huatatas-Hga.
11	Agua de estanque	Huatatas-Hga.
12	Agua de río	Socoscocha-Hta.
13	Agua de riachuelo	Huamanga
14	Tierra de jardín	Huamanga
15	Tierra	Huamanga
16	Tierra de jardín	Huamanga
17	Tierra cultivo Trigo	Huamanga
18	Tierra de jardín	Quinoa
19	Tierra cultivo Arveja	Quinoa
20	Tierra	Wari
21	Tierra cultivo Maiz	Huamanga
22	Tierra	Huamanga
23	Tierra cultivo Maiz	Huamanga
24	Tierra jardín de Plaza	Huamanga
25	Tierra cultivo fruta	Quinoa
26	Tierra cultivo Trigo	Huamanga
27	Tierra cultivo Fruta	Huamanga
28	Tierra cultivo Maiz	Huamanga
29	Tierra de jardín	Alameda-Hga.
30	Tierra cultivo Hortalizas	Alameda-Hga.
31	Tierra de Tunales	Huatatas-Hga.
32	Tierra campo abierto	Huatatas-Hga.
		Huatatas-Hga.

N° DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
33	Tierra de Jardín	Magdalena-Hga.
34	Tierra jardín	Magdalena-Hga.
35	Tierra cultivo Maíz	Huaytapampa-Hga.
36	Tierra ribera de río	Huaytapampa-Hga.
37	Tierra bosque Eucalipto	San Melchor-Hga.
38	Tierra campo abierto	Totorilla-Hga.
39	Tierra acequia seca	Santa Elena-Hga.
40	Agua estancada	Huaytapampa-Hga.
41	Agua ribera de río	Huaytapampa-Hga.
42	Agua de río	Huaytapampa-Hga.
43	Agua de río	Alameda-Hga.
44	Agua estancada	Alameda-Hga.
45	Agua acequia irrigación	San Melchor-Hga.
46	Agua de río	Huatatas-Hga.
47	Agua río estancado	Totorilla-Hga.
48	Agua de río	Totorilla-Hga.
49	Agua estancada	Muyurina-Hga.
50	Agua de río	Muyurina-Hga.
51	Agua de riachuelo	Muyurina-Hga.
52	Agua estancada	Chacco-Hga.
53	Agua de río	Chacco-Hga.
54	Agua ribera de río	Chacco-Hga.
55	Agua de riachuelo	Chacco-Hga.
56	Agua de río	Chacco-Hga.
57	Tierra cultivo Zanahoria	Chacco-Hga.
58	Tierra cultivo Col	Chacco-Hga.
59	Tierra cultivo Alfalfa	Chacco-Hga.
60	Tierra cultivo Apio	Muyurina-Hga.
61	Tierra cultivo Cebolla	Muyurina-Hga.
62	Tierra cultivo Maíz	Muyurina-Hga.
63	Tierra cultivo Papa	Muyurina-Hga.

Muchos estudiosos (Travers, 1987), han aislado *Bacillus thuringiensis* con un resultado de 10<sup>9</sup> bacterias por gramo de suelo, existiendo muchos métodos de

aislamiento, siempre se debe tener en cuenta la ecología microbiana, especialmente de un radio considerado al rededor de donde se toma la muestra; en el presente Cuadro se indica los lugares de muestreo escogidos al azar con la finalidad de saber cuales son las condiciones en las que podrían encontrarse dichas bacterias, sabiendo que nuestra región es en general, de un clima templado y seco de los valles inter andinos, cálido y húmedo en la ceja de selva y frío seco en las punas, estación I : de lluvias, de Diciembre a Marzo; estación II: intermedia, Abril, Mayo, Octubre y Noviembre; estación III: de Secano de Junio a Setiembre, que de alguna forma no favorecen el desarrollo de estas bacterias (Travers, 1987).

De otro lado otros autores coinciden en que el método de aislamiento de estas bacterias es más satisfactorio si se realizan de insectos muertos o en áreas con alto nivel de infestación de insectos, pero sin embargo existen otros como Winogradsky que asegura que el principal habitat de la mayoría de especies de bacilos es el suelo donde se encuentra la mayor parte de la flora bacterial, coincidiendo con este y muchos otros estudiosos, se ha visto por conveniente realizar la mayor cantidad de tomas de muestras de suelos, pues existe la mayor probabilidad de aislar estas bacterias además de la facilidad de muestrear suelos y no así insectos muertos.

TABLA N°2: RESULTADO DE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE CEPAS

## NATIVAS SELECCIONADAS

CEPAS	PRUEBAS BIOQUIMICAS						OBSERVACIONES
	CATALASA	NR-VP	GLUCOSA	CASEINA	LECITINA	FENIL ALANINA	
<i>B. sphaericus</i> (84c)	+	-	-	-	-	+	CULTIVO HORTALIZAS- HTAS
<i>B. sphaericus</i> (79)	+	-	-	-	-	+	CULTIVO HORTALIZAS- HTAS
<i>B. sphaericus</i> (80)	+	-	-	+	-	+	RIBERA DE RIO HUAYTAPAMPA
<i>B. thuringiensis</i> (54)	+	-	+	+	-	-	TIERRA DE ACEQUIA STA. ELENA
<i>B. thuringiensis</i> (55)	+	-	+	+	-	-	TIERRA DE ACEQUIA STA. ELENA
<i>B. thuringiensis</i> (c- 1)	+	-	+	+	-	-	TIERRA JARDIN ALAMEDA
<i>B. sphaericus</i> (st.)	+	-	-	-	-	+	CEPA STANDARD.
<i>B. thuringiensis</i> (st.)	+	-	+	+	-	-	CEPA. STANDARD

Los trabajos de Smith (1987), son la base de los exámenes de caracterización diferencial, siendo necesario la ejecución de estas. Los primeros estudios de taxonomía de la formación de la endospora fueron identificados de acuerdo a la diferenciación bioquímica, en la actualidad, se realizan estudios electroforéticos y genéticos de la bacteria.

Es necesario tener la certeza de que se trata de las bacterias buscadas, siendo la identificación bioquímica

la más práctica que se encuentra a nuestro alcance, se optó por este método, los resultados coinciden con los que muestra el Manual de Bergey, excepto en la prueba de caseína que una cepa de Bacillus sphaericus aislada de la ribera del río de Huaytapampa dió positivo mientras que las otras dos dieron negativas, según Sneath (1985), puede darse el caso, pues el resultado es indeterminado, confirmándose su positividad mediante el crecimiento en agar selectivo para Bacillus sphaericus.

TABLA Nº 3: Número de muestras positivas de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus

MICROORGANISMO	<u>Bacillus thuringiensis</u>	<u>Bacillus sphaericus</u>
Nº muestras positivas en suelo	03	02
Nº muestras positivas en agua	00	01
Nº muestras negativas en suelo	36	37
Nº muestras negativas en agua	24	23
Total de muestras de suelo	39	39
Total de muestras de agua	24	24
Total muestras experimentales	63	63

El número de muestras positivas encontradas resultaron ser muy reducidas en comparación con el número de muestras procesadas, siendo estas 63 en total, solo se aislaron 6 cepas de bacilos, de las cuales 3 fueron de



Bacillus thuringiensis en suelo lo cual es comprensible porque es más viable en este medio y no así en agua, 2 cepas de Bacillus sphaericus en suelo y una en agua, como explica Hernández (1990), que esta bacteria es capaz de soportar ambientes contaminados y se mantiene viable en agua a diferencia de Bacillus thuringiensis.

No existe preocupación alguna por el reducido número de muestras positivas, pues autores como Travers (1987) y otros reportan que en más de 80 años del descubrimiento de la bacteria solo 25 variedades de Bacillus thuringiensis han sido encontrados, y Bacillus sphaericus aún se encuentra en investigación.

TABLA Nº 4: Porcentaje de muestras positivas y negativas de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus

MICROORGANISMO	<u>Bacillus thuringiensis</u>	<u>Bacillus sphaericus</u>
% muestras positivas en suelo	4.78	3.18
% muestras positivas en agua	0.00	1.60
% muestras negativas en suelo	57.14	58.71
% muestras negativas en agua	38.08	36.51
% Total de muestras	100.00	100.00

De acuerdo al cuadro anterior se deducen los porcentajes correspondientes siendo para Bacillus thuringiensis un 4.78% en suelo y 0.00% en agua y para Bacillus sphaericus 3.18% en suelo y 1.60% en agua, como se podrá observar el porcentaje de muestras negativas tanto en suelo como en agua es mucho mayor.

Según Smith (1987), Gordon y otros constataron que de la distribución de especies de bacilos en suelo en Estados Unidos, Bacillus thuringiensis representa entre 0.5 y 0.005% de todas las especies de bacilos aislados desde suelo, quizá este sea uno de los ejemplos que nos explica con mayor claridad el bajo porcentaje de población de esta bacteria; y existiendo poca referencia bibliográfica de Bacillus sphaericus no se encontraron datos exactos, pero si explican que tienen porcentajes de existencia menor que Bacillus thuringiensis.

TABLA Nº 5: Porcentaje de Población de Bacilos en suelo y agua

MUESTRA	% DE BACILOS		OTROS BACILOS
	<u>Bacillus thuringiensis</u>	<u>Bacillus sphaericus</u>	
AGUA 1.60 %	0.00	1.60	11.11
SUELO 7.96 %	4.78	3.18	22.21
TOTAL 9.56 %	4.78	4.78	33.32

Existen bacilos no formadores de esporas que pueden ser o no patógenos de insectos, así como bacilos formadores de esporas patógenas de insectos, en conjunto todos vienen a formar el porcentaje de bacilos en las muestras tratadas, de las cuales 11.11% son bacilos no patógenos de insectos encontrados en agua y 22.21% son bacilos no patógenos de insectos encontrados en suelo, pues casi toda la bibliografía, el Manual de Bergey, coinciden en afirmar que en la naturaleza existen gran cantidad de bacilos y que desde tiempos atrás han tratado de clasificarlos de acuerdo a sus características morfológicas, bioquímicas, etc.

**TABLA Nº 6: Promedio de Recuento de Mesófilos viables**

	MUESTRA	
	AGUA	TIERRA
Promedio UFC	$> 10^6$	$32 \times 10^7$
Promedio UFC	$14 \times 10^9$	$27 \times 10^8$

Esta es una prueba de rutina que se realiza cuando se trabaja con microorganismos, para saber la población existente de bacterias u otras, ya que este es un trabajo como todos, no se obvió este paso consiguiendo resultados que indican que la mayor parte de mesófilos viables se

encuentran en muestras de agua, debiéndose a la toma de muestra que se recolectaron generalmente aguas contaminadas, como lo recomienda Hernández (1990) para el aislamiento de Bacillus sphaericus.

En diferentes partes del mundo, se ha tratado de aislar cepas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus y generalmente se aísla una nueva cepa con propiedades casi iguales a las ya estudiadas, así como Goldberg y Margalit en Israel aislaron una cepa de Bacillus thuringiensis denominada H-14, Padua en Filipinas, aísla una cepa que denominó PG-14, correspondiente al serotipo 8a8b subsp. Morrisoni de Bacillus thuringiensis, Krieg en Alemania una cepa de Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis, Harnstadt en 1986, aísla una cepa de Bacillus thuringiensis denominada variedad San Diego, etc. Igualmente cepas de Bacillus sphaericus han sido aisladas de la India, de Indonesia la cepa 1593, de Nigeria la cepa 2362, de Sri Lanka la cepa 2297, las cepas IAB59 DE Ghana, etc. evidencian que si es posible aislar cepas tóxicas contra insectos y larvas, en varios países del mundo. En este trabajo se trata de demostrar que con la aplicación de una técnica adecuada se pueden aislar cepas nativas de muestras de suelos de nuestra región, como los ya mencionados lo hicieron contribuyendo al desarrollo tecnológico. (Davidson y

Col., 1984; Mahillon y Delcour, 1984; Guerrineau y Col., 1991).

La factibilidad económica de control microbiano dependen los siguientes factores: estatus de la plaga, rango de hospedero para la plaga, relación de costo/beneficio con respecto a la plaga, efectividad técnica de control microbiano, variabilidad y velocidad de efecto del control microbiano, valor de la materia que se va a proteger, requisitos del patente, seguridad pública y legislación ambiental( Metcalf y Luckman 1990).

Tomando en cuenta estos factores, se puede decir que sin embargo, los entomopatógenos son parte integral de la naturaleza, y por lo tanto no causan ninguna ruptura del equilibrio ambiental. Estos organismos no causan peligro a organismos que no son el blanco y es nula la contaminación que producen en el medio ambiente. El costo de producción de insecticidas microbianos no es alto en comparación con los productos químicos. Debido a estas características el uso de microorganismos entomopatógenos cae dentro de un sistema de manejo integral de insectos plaga que fácilmente puede ser iniciado en la Ciudad de Ayacucho, con el aislamiento de nuestras propias cepas nativas y las pruebas de toxicidad contra plagas, propias de la región que tanto afectan a la economía de la agricultura, la contaminación ambiental y otros.

Es factible encontrar cepas nativas de bacilos en nuestros suelos y aguas, en este trabajo se reporta un 42.86% de población total de bacilos, demostrando así que con un trabajo más minucioso y a gran escala se pueden obtener buenos resultados iniciándose una nueva era biotecnológica en el manejo integral de plagas con bioinsecticidas en nuestra región, siendo este uno de los primeros aportes.

Todos los autores coinciden en que las formas de aislamiento son relativamente fáciles, con la práctica se ha podido comprobar pero es necesario recalcar que la observación microscópica resulta un poco tediosa, pues son cientos de colonias a observarse por cada 10 a 15 muestras tratadas, contando con los pocos trabajos realizados en Perú sobre este tema y además de trabajar con poca referencia del bacilo.

## CONCLUSIONES

- 19 Se procesaron 63 muestras de suelo y agua procedentes de las provincias de Huamanga y Huanta, de los cuales se aislaron 537 colonias sospechosas, habiéndose identificado solo 6 cepas de bacilos, 3 de ellos correspondientes a Bacillus thuringiensis y 3 a Bacillus sphaericus.
- 29 Se contribuyó a la aplicación de una metodología de aislamiento e identificación de cepas de Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus entomopatógenos, en condiciones de laboratorio.

## RECOMENDACIONES

- 19 Se recomienda realizar la preparación de medios según el recetario, con el peso indicado, pues si se agrega algún componente en la cantidad no indicada varían los resultados del aislamiento como la inhibición de la esporulación, retardo de la esporulación, etc.
- 29 Realizar las pruebas bioquímicas una vez más de lo que recomienda el manual de identificación, pues esta está expuesta a errores de tipo manual, técnico, etc.
- 39 Realizar de manera correcta la eliminación de otros microorganismos presentes en las muestras a tratarse para evitar una sobrepoblación de colonias en la placa y por ende la contaminación, que hace difícil la identificación de bacilos ya que estas



generalmente se encuentran en colonias aisladas.

- 49 Se recomienda hacer una buena tinción Gram para no confundir el bacilo de Bacillus thuringiensis, pues este es casi similar a los otros bacilos, para mejores resultados esperar que esporule y se de la formación del cristal.
- 50 Se recomienda efectuar bioensayos de toxicidad de las cepas nativas aisladas frente a larvas de insectos-plaga propios de la región.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

01. ALEXANDER, B. y PRIEST, F. G. (1989) Numerical clasification and identification of Bacillus sphaericus including some strains pathogenic for mosquito larvae. Journal of General Microbiology. Gran Bretaña. Vol 136, pp 367-376.
02. ARONSON, I.; BECKMAN, W. y DUNN, P. (1986) Bacillus thuringiensis and related insect pathogens. Microbiological Reviews. Indiana. Vol 50 N01, pp 1-24.
03. BAUMANN, P.; CLARK, M. Y Otros (1991) Bacillus sphaericus as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. Microbiological Reviews. Nueva Zelanda. Vol 55 N03, 425-436.
04. BULLA, L.; ARONSON, A. Y FITZ-JAMES, P. (1980). Ultrastructure physiology and biochemistry of Bacillus thuringiensis. Critical Review Microbiological. USA. Vol, pp 147-204.
05. CHILCOTT, C. N. y WIGLEY, P. J. (1993) Isolation and toxicity of Bacillus thuringiensis from soil and insect habitats in New Zealand. Journal of Invertebrate Pathology. Nueva Zelanda. Vol 61, pp 244-247.
06. CHILCOTT, C. N. y WIGLEY, P. J. (1994) Opportunities for finding new Bacillus thuringiensis strains. Agriculture, Ecosystems and Environmental. Nueva Zelanda. Vol 49, pp 51-57.
07. DAVIDSON, E.; URBINA, M. y Otros (1984) Fate of Bacillus sphaericus 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. Applied and Environmental Microbiology. USA. Vol 47 N01, pp 125-129.

08. DAVIDSON, E. y YAMAMOTO, T. (1984) Isolation and assay of the toxic component from the crystals of Bacillus thuringiensis var. Israelensis. Current Microbiology. USA. Vol 11, pp 171-174.
09. DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, I.D. (1990) Bacterial Control of Mosquitoes de Black flies. Biochemistry, Genetics & Applications of Bacillus thuringiensis var. Israelensis. y Bacillus sphaericus. Londres. pp 1-349
10. DE PIERI, L. A. y LUDLOW, I. K. (1991) Relationship between Bacillus sphaericus spore heat resistance and sporulation temperature. Letters in Applied Microbiology. Inglaterra. Vol 14, pp 121-124.
11. DULMAGE, H. T. (1985) Production an use of Bacillus thuringiensis perspective from 1989. H. D. Associates. USA. Vol 1, pp 114-122.
12. DULMAGE, H. T. y DE BARJAC, H. (1973) HD-187, A new isolate of Bacillus thuringiensis that produces high yields of delta-entotoxin. Francia.
13. GELERNTER, W. D. (1990) Bacillus thuringiensis, bioengineering and the future of bioinsecticides. Brighton crop Protection Conference Pest and Diseases. USA. Vol 1, pp 617-624.
14. GUERINEAU, M.; ALEXANDER, B. y PRIEST, F. (1991) Isolation and identification of Bacillus sphaericus strains pathogenic for mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology. Reino Unido. Vol 57, pp 325-333.
15. HERNANDEZ, J. L. (1990) Evaluation de la toxicite de Bacillus thuringiensis our Spodoptera frugiperda. Francia. Vol 1, pp 161-173.
16. KONDO, S.; OHBA, M. y ISHII, T. (1992) Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis serovar Israelensis agains nuisance chironomid midges. (Diptera:

chironomidae) of Japan. Letters in Applied Microbiology. Inglaterra. Vol 15, pp 207-209.

17. LIU, J.; HINDLEY, J. y Otros (1993) New high-toxicity mosquitocidal strains of Bacillus sphaericus lacking a 100 - Kilodalton toxin gene. Applied and Environmental Microbiology. Reino Unido. Vol 59 No10, pp 3470-3473.
18. LUTHY, P. (1980) Insect pathogenic fungi as pest control agents. Institut of Zoology. USA. Vol 2, pp 203-215.
19. LYSENKO, O.; DAVIDSON, E. y Otros (1985) Five new mosquito larvicidal strains of Bacillus sphaericus from non-mosquito origins. Journal American Mosquito Control Association. USA. Vol 1, pp 369-371.
20. MAHILLON, J. y DELCOUR, J. (1984) A convenient procedure for the preparation of highly purified parasporal crystals of Bacillus thuringiensis. Journal of Microbiological Methods. Bélgica. Vol 3, pp 69-76.
21. METCALF, R. y LUCKMANN, W. (1990) Introducción al manejo de plagas de insectos. 2ª Edición. Editorial Limusa. México. pp 570-576.
22. METCALF, R. y LUCKMANN, W. (1990) Introducción al manejo de plagas de insectos. 2ª Edición. Editorial Limusa. México. pp 223-226.
23. MONNERAT, S. y Otros (1992) Characterization and toxicity to mosquito larvae of four Bacillus sphaericus strains isolated from Brazilian soils. Journal of Invertebrate Pathology. Brazil. Vol 60, pp 10-14.
24. MONTERO, G.; DIAZ, M.; MARRERO, A. y CASTILLO, F. (1991) Resultados de las aplicaciones en pilotaje del biolarvicida Bacillus sphaericus 2362 en criaderos de mosquitos del Municipio Santa Cruz del

Norte (Provincia de la Habana). Revisión Cubana Médica Tropical. Cuba. Vol 43(1), pp 39-44.

25. MONTERO, G.; ESPINO, R. y DIAZ, M. (1985) Suceptibilidad comparativa de las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Cúlex quinquefasciatus* al *Bacillus thuringiensis*, variedad *Israelensis* (H-14). Revisión Cubana de Higiene y Epidemiología. Cuba. Vol 23, pp 253-259.
26. MONTERO, G.; ESPINO, R.; GARCIA, L. y DIAZ, M. (1986) Efectividad del *Bacillus thuringiensis* variedad *Israelensis* SH-14 en criaderos de *Anopheles albimanus* Wiedeman en las condiciones naturales de Cuba. Revisión Cubana de Higiene y Epidemiología. Cuba. Vol 24(2), pp 165-171.
27. MONTERO, G.; ESPINO, R.; GARCIA, L. y DIAZ, M. (1986) Efectividad de *Bacillus thuringiensis* variedad *Israelensis* H-14 en diferentes criaderos de mosquitos en las Provincias Ciudad de la Habana y Santiago de Cuba. Cuba. Vol 38(2), pp 229-236.
28. NICKERSON, K. W. (1980) Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal. Biotechnology and Bioengineering. USA. Vol 22, pp 1305-1333.
29. NICKERSON, K. W. y SWANSON, I. D. (1981) Removal of contaminating proteases from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals by density gradient centrifugation in NaBr. European Journal Applied Microbiol Biotechnol. USA. Vol 13, pp 213-215.
30. OHBA, M. y ARATAKE, Y. (1994) Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silkworm-breeding environments. Journal of Applied Bacteriology. Japón. Vol 76, pp 203-209.

31. OHBA, M.; YU, M. y AIZAWA, K. (1987) Non-toxic isolates of Bacillus thuringiensis producing parasporal inclusions with unusual protein components. Letters in Applied in Microbiology. Japón. Vol 5, pp 29-32.
32. OSP (1981) los insecticidas biológicos: nuevas armas contra las enfermedades transmitidas por vectores. Vol 41 N92, pp 170-175.
33. PADUA, L.; OHBA, M. y AIZAWA, K. (1983) Isolation of Bacillus thuringiensis strain (Serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. Japón. Vol 1, pp 14-19.
34. PINNOCK, D. E. (1994) The use of Bacillus thuringiensis for control of pests of livestock. Agriculture, Ecosystems and Environment. Australia. Vol 49, pp 59-63.
35. SMITH, R. A. (1987) Use of crystal serology to differentiate among varieties of Bacillus thuringiensis. USA. Vol 1, pp 1-8.
36. SMITH, R. A. y COUCHE, G. A. (1991) The phylloplane as a source of Bacillus thuringiensis variants. Applied and Environmental Microbiology. USA. Vol 1, pp 311-315.
37. SNEATH, P. y Otros (1985) Bergey's manual of systematic bacteriology. USA. Vol 2, pp 1104-1139.
38. THIERY, I. y DE BARJAC, H. (1989) Selection of the most potent Bacillus sphaericus strains based on activity ratios determined on three mosquito species. Applied Microbiology and Biotechnology. Francia. Vol 31, pp 577-581.
39. THOMAS, W. y ELLAR, D. J. (1983) Mechanism of action of Bacillus thuringiensis var Israelensis insecticidal delta-endotoxin. Febs Letters. Inglaterra. Vol 154 N92, pp 362-367.

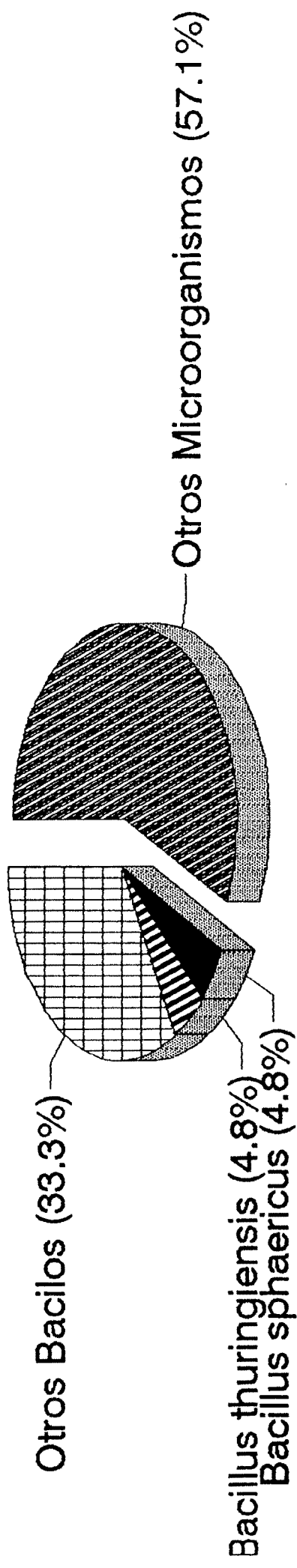
40. TRAVERS, R. S. (1987) Selective process for efficient isolation of soil Bacillus spp. Applied and Environmental Microbiology. USA. Vol 53 N26, pp 1263-1266.
41. VANDERAR, M. y DULMAGE, H. T. (1982) Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14. UNDP/WORLD BANK/WHO. Suiza. Vol 1, pp 1-124.
42. WATKINSON, I. (1994) Global view of present and future markets for Bacillus thuringiensis products. Agriculture, Ecosystems and Environment. USA. Vol 49, pp 3-7.
43. WRAIGHT, S.; MOLLOY, D. y Otros (1980) Effects of temperature and instar on the efficacy of Bacillus thuringiensis var Israelensis and Bacillus sphaericus strain 1593 against Aedes stimulans larvae. Journal of Invertebrate Pathology. USA. Vol 38, pp 78-87.
44. YOUSSTEIN, A.; FRETZ, S. y SCOTT, J. (1985) Selective medium for mosquito-pathogenic strains of Bacillus sphaericus. Applied and Environmental Microbiology. USA. Vol 46 N26, pp 1532-1533.

## **ANEXOS**



# ANEXO N° 01

## DISTRIBUCION PORCENTUAL DE BACILOS



ANEXO N°02

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DIFERENCIALES

DE Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus:

Pruebas Bioquímicas	<u>Bacillus</u> <u>thuringiensis</u>	<u>Bacillus</u> <u>sphaericus</u>
Catalasa	+	+
Formación de ácido en Glucosa	+	-
Voges Proskauer	d	-
Hidrólisis de Caseína	+	d
Hidrólisis de gelatina	+	d
Hidrólisis de almidón	+	-
Utilización de citrato	+	d
Deaminación de Fenil Alanina	-	+
Lecitinasa	d	-
Crecimiento ph 6.8 en C.N.	+	+
Crecimiento a 30°C.	+	+
Crecimiento a 40°C.	+	d

FUENTE: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. (1985)

ANEXO Nº 03

MEDIO SELECTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE Bacillus  
sphaericus

A. YOUSSTEIN, S.B. FRETZ, S.A. JELLEY (1985)

MEDIO BATS

COMPONENTES	CANTIDAD (g/l)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.57 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.40 gr.
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50.00 mg.
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4.00 mg.
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.80 mg.
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.50 mg.
L-arginina	5.00 gr.
Tiamina	20.00 mg.
Biotina	2.00 ug.
Estreptomicina Sulfato	100.00 mg.
Agar	20.00 gr.

La L-arginina, Tiamina, Biotina y Estreptomicina esterilizar por filtración en frío, las sales y el agar autoclavar a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos. Mezclar a una temperatura de 45 °C.

ANEXO Nº 04

FOTOGRAFIAS

FOTO Nº 01 : Bacillus thuringiensis var. Israelensis y Bacillus thuringiensis var. kurstaki. ASA 400, diafragma 8, velocidad 0.48", luz natural.



FOTO Nº 02 : Cepa aislada de Bacillus thuringiensis. ASA 100, diafragma 2, velocidad 1", luz natural.



FOTO Nº 03 : Bacillus sphaericus cepa. standard y Bacillus sphaericus cepa aislada.  
ASA 400, diafragma 8, velocidad 0.48", luz natural.

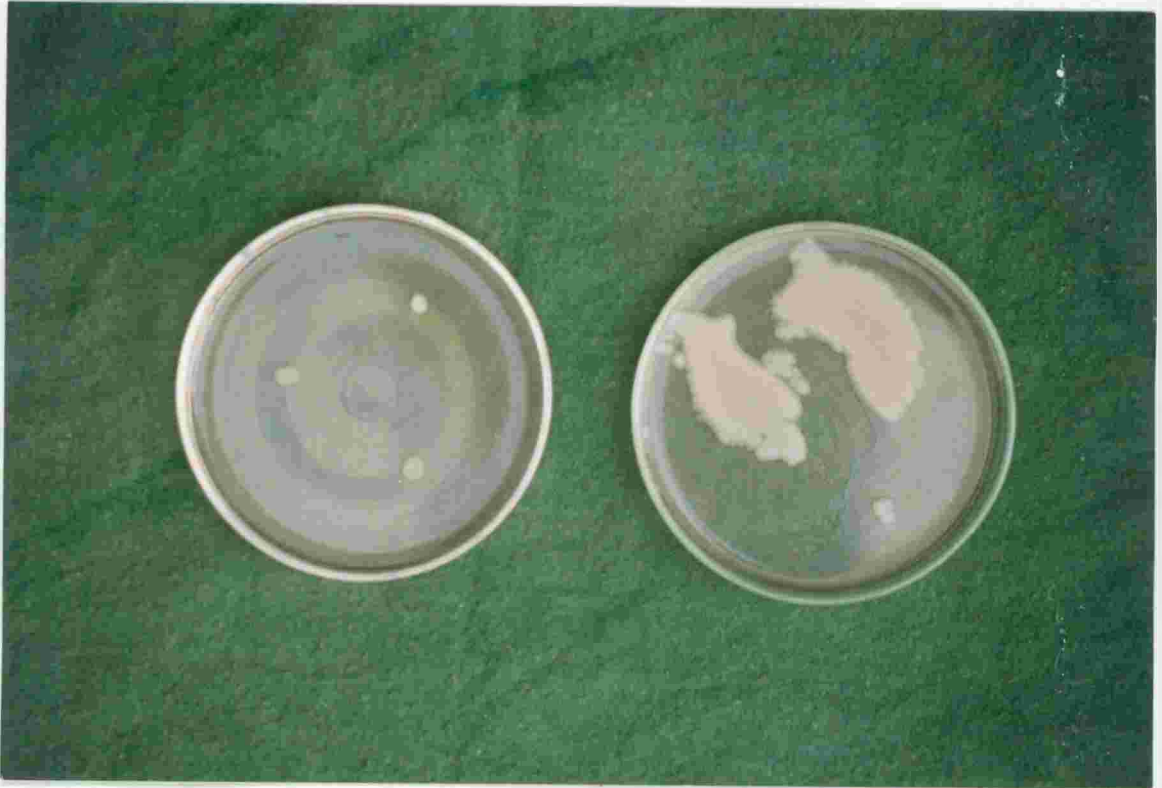


FOTO Nº 04 : Prueba bioquímica de Fenil Alanina. Tubos 1° y 2° reacción negativa, tubos 3° y 4° reacción positiva (Bacillus sphaericus).  
ASA 100, diagrama 2, velocidad 1", luz artificial.

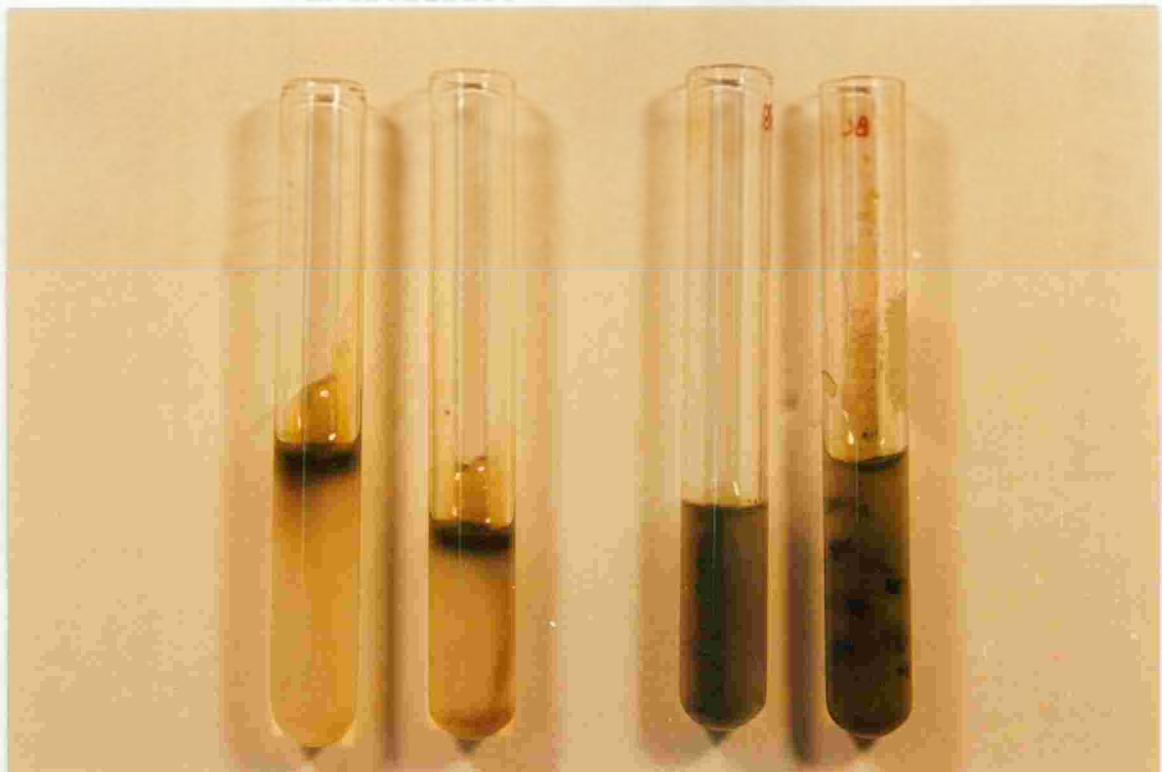


FOTO Nº 05: Células vivas de *Bacillus thuringiensis* (cultivo joven).  
ASA 100, objetivo de fase, sin disco de fase, filtro oscuro, diafragma 1/2, velocidad 2", contraste de fases.



FOTO Nº 06: Esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*.  
ASA 100, filtro azul, diafragma 2, velocidad 4", a inmersión.

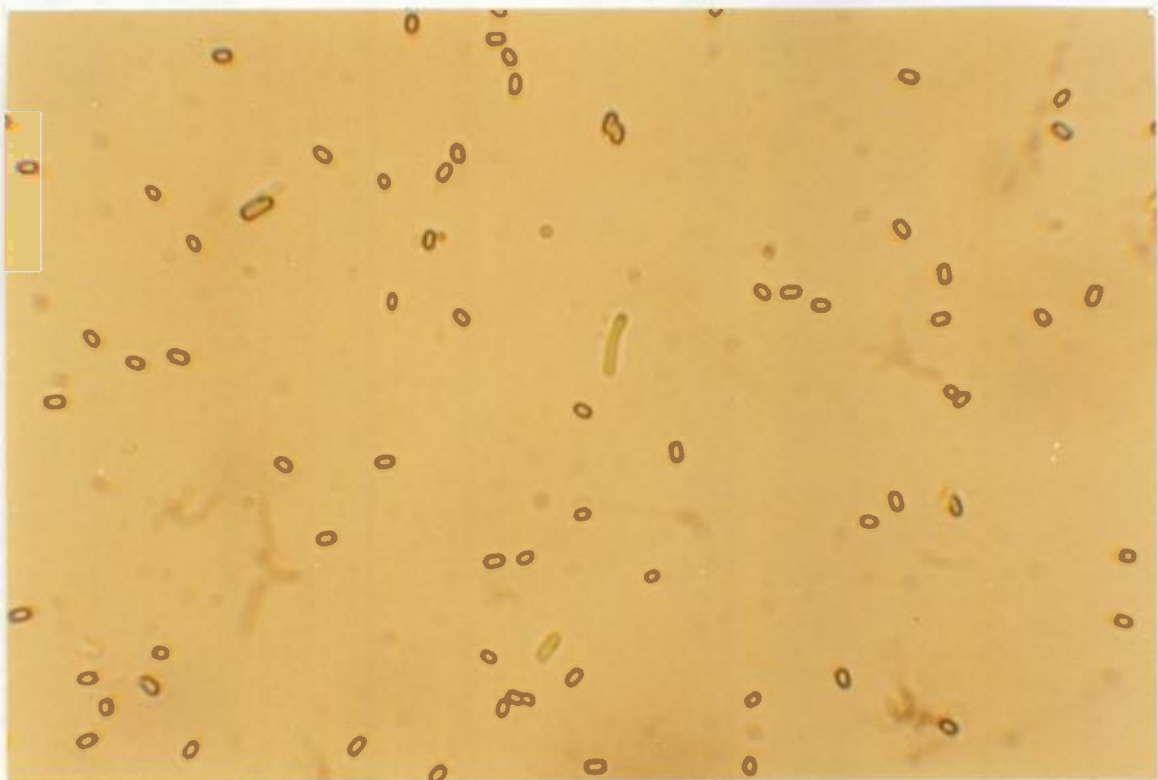


FOTO Nº 07 : Células coloreadas de Bacillus sphaericus.  
ASA 100, diafragma 1, velocidad 2", a  
inmersión.

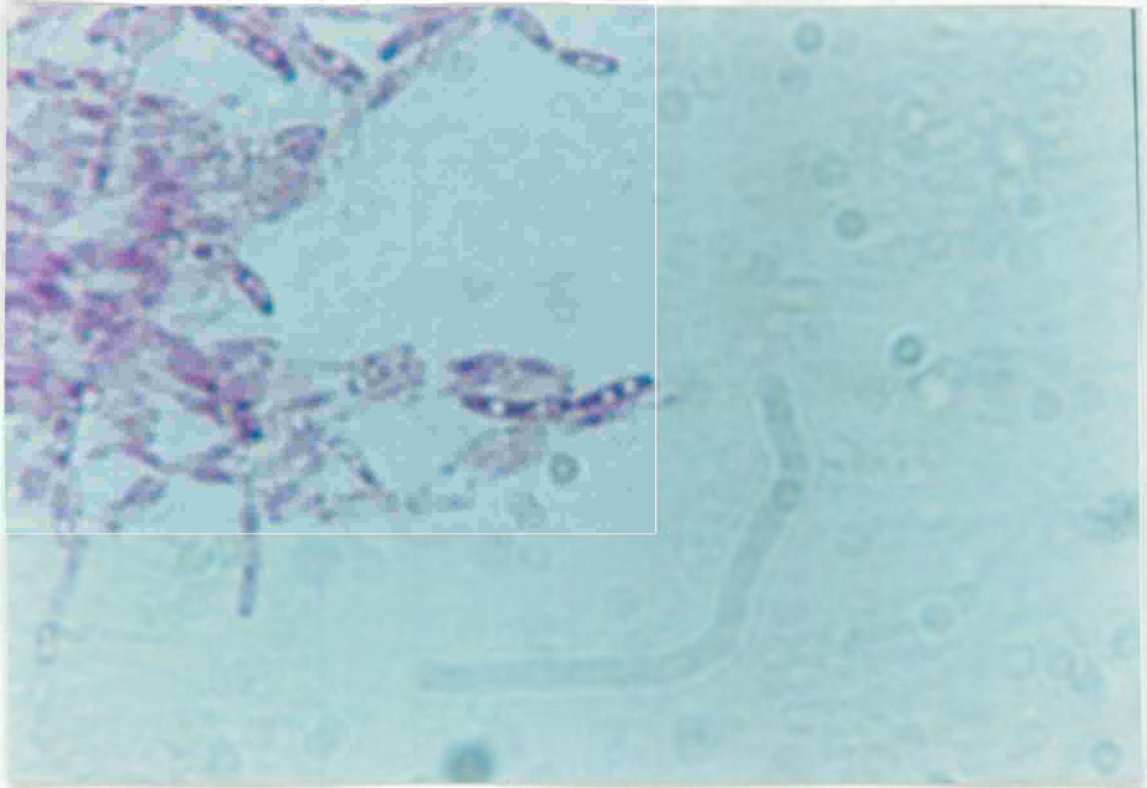
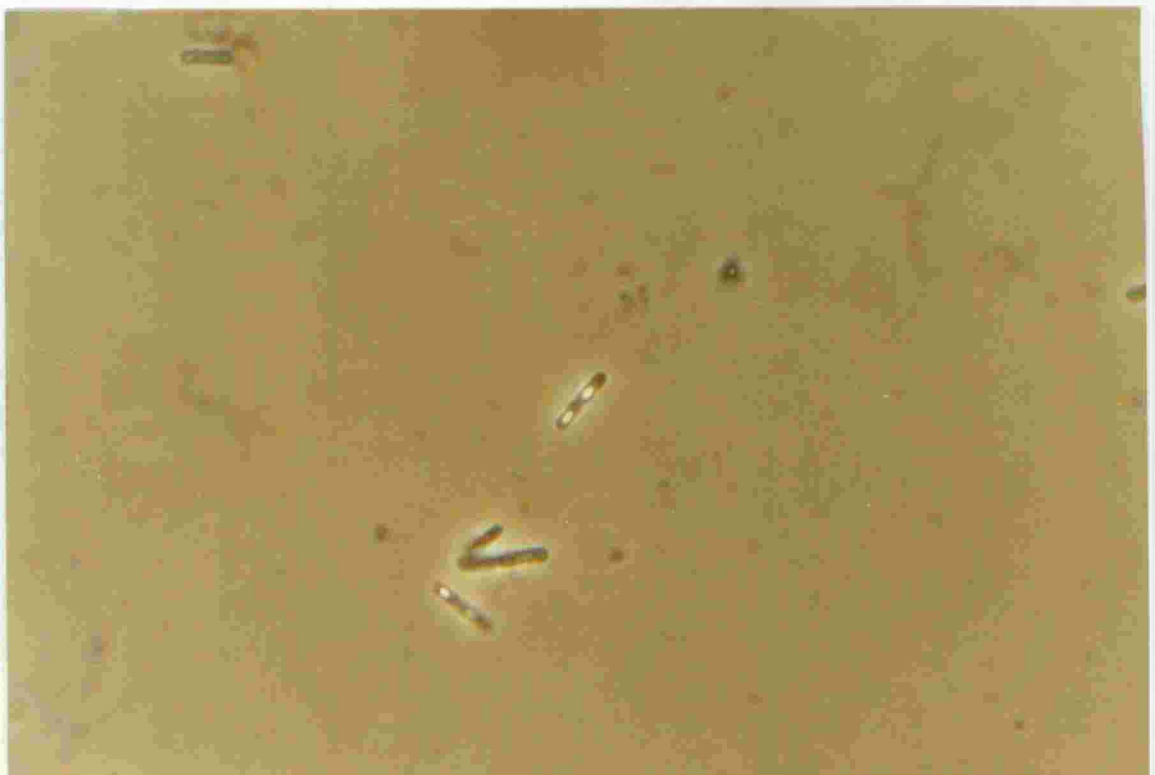


FOTO Nº 08 : Células vivas de Bacillus sphaericus  
(cultivo joven).  
ASA 100, sin filtro, diafragma 1/2,  
velocidad 4" contraste de fases.



ANEXO Nº 05

TIPOS DE SUELO Y ALTITUDES DE LAS ZONAS DE MUESTREO

LUGAR DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	ALTITUD (m.s.n.m.)	TIPO DE SUELO
A. Provincia de Huamanga	2,746	Suelos kastanosoles con textura media, más o menos profundos, cálcicos, de reacción alcalina y color rojizo o pardo rojizo, con horizontes arcillosos, bajos en contenido de nitrógeno, muchos de ellos decapitados, con frecuencia de litosoles (suelos xerófilos y mesófilos) privados de cubierta superficial por acción del uso intensivo y de la erosión a través de los siglos
- Moyurina	2,550	
- Chacco	2,500	
- Wari	2,870	
- Quinoa	3,396	Suelos Paramosólicos, con textura arcillosa abundante.
B. Provincia de Huanta	2,660	Suelos superficiales, transicionales, Con frecuencia de materia orgánica Naturaleza ácida, calcárea, superficial

FUENTE : ONERN (1985) "Recursos Naturales del Perú"