

**BIODIVERSIDAD DE *Bacillus thuringiensis* patotipos II y IV y *Bacillus sphaericus*
AISLADOS DE SUELOS AGRÍCOLAS PERUANOS**

Abad Flores P.¹
Juan C. Woolcott H.²
Rosa M. Egusquiza C.¹
Alejandro Patiño G.¹
Doris Huerta C.¹
Fred García A.²

RESUMEN

Se aislaron 18 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y 3 cepas de *Bacillus sphaericus* con potencial mosquitocida, de 175 muestras de aguas estancadas y suelos agrícolas de diferentes partes del país. Las observaciones microscópicas de colonias características, mostraron la presencia de cristales parasporales típicos de *B. thuringiensis*. Los bioensayos realizados mostraron a las cepas BT-UNMSM-112 y BT-UNMSM-118 como las de mayor capacidad entomocida frente a los primeros estadios de *Anopheles pseudopunctipennis* y *B. sphaericus* - Bs-UNMSM 107 mostró la mayor efectividad frente a *Culex spp.* Se determinó los niveles de susceptibilidad, en el laboratorio, de esta especie a *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus sphaericus*, encontrándose una CL₅₀ de 0.215 y 0.360 ìg /mL y CL₉₀ 0.236 y 0.428 ìg/ mL para *B. thuringiensis* BT-UNMSM 112 y BT-UNMSM 118 respectivamente y una CL₅₀ de 0.87 ìg/mL y una CL₉₀ de 0.95 ìg/mL para *B. sphaericus* Bs-UNMSM 107 frente a *An. pseudopunctipennis*. Para *Culex spp* se encontró una CL₅₀ de 0.562 y 0.920 ìg /mL y CL₉₀ 2.52 y 3.20 ìg/ mL para *B. thuringiensis* BT-UNMSM 112 y BT-UNMSM 118 respectivamente y una CL₅₀ de 0.34 ìg/mL y una CL₉₀ de 0.44 ìg/mL con *B. sphaericus* Bs-UNMSM-107.

Palabras claves: *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*—Aislamiento y toxicidad para mosquitos

SUMMARY

It was isolated 18 strains of *Bacillus thuringiensis* and 3 strains of *B. sphaericus* with entomocidal properties from 175 samples of soil & wastewater Peruvian's farms. The microscopics observations of these strains showed the crystal parasporal typical from *B. thuringiensis*. The bioassays performed showed us the strains BT-UNMSM-112 y BT-UNMSM-118 as the most promisorious as biolarvicides against first instars of *A. pseudopunctipennis* and *B. sphaericus*-B-107 showed a high efficiency against *Culex spp.* It was determined susceptibility levels of Both mosquitoes against *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus*. It was found a LC₅₀ de 0.215 and 0.360 ì g/mL and LC₉₀ 0.236 and 0.428 ì g/mL para *B. thuringiensis* BT-UNMSM 112 y BT-UNMSM 118 respectively and a LC₅₀ of 0.87 ì g/mL and a LC₉₀ of 0.95 ì g/mL to *B. sphaericus* Bs-UNMSM 107 against *An. pseudopunctipennis*. It was found a LC₅₀ of 0.562 and 0.920 ìg /mL and a LC₉₀ 2.2 and 3.20 ì g/mL against *Culex spp* to *B. thuringiensis* BT-UNMSM 112 and BT-UNMSM 118 respectively and a LC₅₀ of 0.34 ì g/mL and a LC₉₀ of 0.44 ì g/mL with *B. sphaericus* Bs-UNMSM-107.

Key words: *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* isolation & Mosquitocidal Toxicity

¹ Lab. Microbiología Ambiental y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² Dpto. Química Orgánica, Facultad de Química e Ingeniería Química – Universidad Nacional Mayor de San Marcos

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos anofelinos y culicidos son vectores de muchas enfermedades metaxénicas: Malaria, Dengue, Fiebre amarilla, entre otros, los cuales han sido controlados con insecticidas químicos con un éxito inicial en su control, sin embargo, los insectos han desarrollado resistencia a los insecticidas sintéticos generando muchos problemas ambientales, destruyendo insectos dañinos y benéficos, contaminando el medio ambiente y produciendo riesgos de salud para los consumidores. Igualmente el alto costo de los insecticidas sintéticos, limita su adecuada aplicación en países pobres y subdesarrollados. Para contrarrestar el efecto de los plaguicidas químicos es necesario contar con otras alternativas, una de las cuales es el control biológico.

Bacillus thuringiensis es considerado como el principal agente promisorio de control biológico de Dípteros, Lepidópteros y Coleópteros; presenta algunas ventajas en relación a los agentes de control químico, es un patógeno de invertebrados versátil en su acción, capaz de infectar protozoos, nematodos, ácaros e insectos que son plagas fitopatógenas o peligrosas a la salud humana y/o animal (De Barjac H, 1978).

La reemergencia de enfermedades metaxénicas en el Perú, demanda de pesticidas más seguros, siendo los biopesticidas a base de *B. thuringiensis*; *B. sphaericus* los más usados en el control efectivo de vectores de enfermedades metaxénicas.

El objetivo del presente estudio es aislar y identificar cepas de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* nativos de interés en Salud Pública de criaderos de mosquitos y suelos agrícolas y evaluar su potencial entomotóxico frente a *Anofelinos* y *culicidos*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*

Se colectaron 175 muestras de muestras de suelo y aguas estancadas extraídas desde diferentes ecosistemas del Perú en bolsas de polietileno de primer uso y frascos "SCHOT DURAN" de 500 mL. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a Martin & Travers, 1989, e incubadas a 30°C por 18-24 hrs. Para el aislamiento de colonias sospechosas, se sembraron por disseminación alícuotas de 0.1 mL en placas con Agar Nutricio y placas con agar L.B (Luria Bertani) (10 g tripton, 5 g extracto levadura, 10 g NaCl, por litro) y en Agar selectivo para *B. sphaericus* (Massie, J. et. al., 1985). Se incubaron a 30°C, por 24-48 hrs. Se seleccionaron colonias sospechosas aplanadas, blanco mate, de bordes irregulares, característicos de *Bacillus spp.* Las cuales fueron sub-cultivados en Agar nutricio y Agar PEMBA

para una posterior identificación (Chilcott & Wigley 1993).

Identificación de *Bacillus thuringiensis* y *B. sphaericus*

La identificación preliminar de las cepas aisladas se efectuó por observación en microscopia de contraste de fases a 1000X que permitió confirmar la presencia de cristales parasporales (δ -endotoxina) típicos de *B. thuringiensis*. La confirmación de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*, se realizó acuerdo a las características microscópicas culturales y pruebas bioquímicas diferenciales, de acuerdo al Manual Bergey de Bacteriología Determinativa (Holt JG, 1984)

Tinción del cuerpo parasporal.

Se preparó un frotis delgado sobre un lamina portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se cubrió con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% en 50% de etanol y 7% de ácido acético durante 10 min. Se lavó el exceso de colorante con agua. Los cuerpos parasporales se observaron al microscopio óptico Axiostar Seitz) con 1000X. (Chilcott & Wigley 1993 y Smirnov W.A. 1962).

Producción del complejo espora-cristal.-

La producción del complejo espora-cristal, se efectuó e acuerdo a la metodología propuesta por Dulmage, 1970 y Fast P. G, 1972.

Se utilizaron 18 cepas nativas de *B. thuringiensis*, 3 de *B. sphaericus*, 2 cepas referenciales de *B. thuringiensis* var. *Israelensis* NRRL HD-968 y una de *B. sphaericus* B-23268. Las cepas se cultivaron en caldo de leche peptonizada: leche peptonizada 10 g, dextrosa 10 g, extracto de levadura 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 mg, $MnSO_4$ 20 mg, 1 litro de agua, pH 7.2-7.5) a 28°C y con una agitación de 300 rpm, por 72 hrs. hasta alcanzar la liberación de cristales y esporas.

La suspensión se lavo 3 veces por centrifugación con NaCl 1.5 M a fin de disminuir la actividad proteolítica de los extractos celulares y evitar la posible degradación de las proteínas cristalíferas. Posteriormente, el complejo espora-cristal se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, el precipitado fue congelado y liofilizado.

Perfil proteico de cristales parasporales

El análisis de proteínas de los cristales parasporales fue realizado por electroforesis en gel de Poli(acrilamida-Dodecil sulfato de sodio de acuerdo al método de Schagger & Von Jagow, 1987. Se utilizó una concentración de acrilamida de 4 y 10% para la preparación de los geles de concentración y separación. Las muestras, se prepararon a partir de muestras liofilizadas del comple-

jo espora-cristal de las cepas Standard y cepas seleccionadas. Se preparó una suspensión de 0.5 mg/mL. De esta suspensión se tomó una muestra que se mezcló (1:1) con buffer de carga 2X (Tris-HCl 25 mM, pH 6.8, β -Mercaptoetanol 1.28 M, Azul de Bromofenol 2.89 M, SDS 0.138 M, Glicerol 2.17 M).

Posteriormente las muestras fueron calentadas por 10 minutos para desnaturalizar las proteínas, se centrifugó a 12,000 RPM/min. para precipitar las esporas. De estas muestras se utilizó de 1-2 μ g para ser cargadas en el gel, como marcador de P.M y control + se utilizó una muestra de la cepa *B. th. HD-1*, la cual contiene proteínas con propiedades insecticidas de P.M: 65 y 130 KDa (Bravo 1994).

La electrofóresis se realizó utilizando un potencial de 50 V durante 30 min. Y posteriormente a 100 V por 1 hora y 30 minutos, usando una solución Buffer de corrida a base de Tris-glicina 0.38 M SDS 0.1%, pH 8.8. Finalizada la electrofóresis, los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie R al 0.1% en sol. de Etanol al 45%, Acido acético 9%, con un tiempo de tinción de 30 minutos.

Posteriormente los geles se destiñeron con Etanol al 5% y Acido acético al 7.5 %. Los geles se secaron para su preservación colocándose entre pliegues de papel celofan a una temperatura de 37°C por 24 hrs.

Crianza de Insectos blanco.

Para la obtención de larvas de *Annopheles pseudopunctipennis*, se realizaron capturas nocturnas de mosquitos con cebo humano, siguiendo la metodología recomendada por la OMS para captura de anofelinos. Se realizaron un total de 25 capturas en la localidad de San Juan Bautista-Loreto. (Rubio-Palis Y, 1992). Después de su captura fueron llevados al laboratorio, las especies fueron identificadas según las claves de identificación (Cova-García y Sutil, 1975) Posteriormente fueron separados en forma individual en vasos de cartón parafinados con un algodón con azúcar al 10% para su alimentación. En el fondo del vaso se colocó un papel filtro humedecido como superficie para la postura. Los huevos obtenidos se colocaron en bandejas plásticas de 50 y 100 mL de capacidad. Las larvas se mantuvieron bajo condiciones de insectario a 30°C. Para evaluar la efectividad de las cepas de *B. thuringiensis* patotipo IV y *Bacillus sphaericus* se utilizaron larvas de *An. pseudopunctipennis* I, II, III y IV estadios.

Bioensayos.

Los bioensayos preliminares se llevaron a cabo 18 cepas seleccionadas de *B. th. BT-UNMSM-101*, *BT-UNMSM-102*, *BT-UNMSM-103*, *BT-UNMSM-105*, *BT-UNMSM-106*, *BT-UNMSM-109*, *BT-UNMSM-110*, *BT-UNMSM-111*, *BT-UNMSM-112* *BT-UNMSM-113*, *BT-UNMSM-114*, *BT-UNMSM-115*,

BT-UNMSM-116, *BT-UNMSM-117* *BT-UNMSM-118*, *BT-UNMSM-119* *BT-UNMSM-120*, *BT-UNMSM-121*, *Bacillus sphaericus* *Bs-UNMSM-104*, *Bs-UNMSM-107*, *Bs-UNMSM-108*, cepas referenciales de *B. thuringiensis* var. *Israelensis* NRRL HD 968 y *Bacillus sphaericus* B- 23268.

Para determinar las Concentraciones Letales (CL₅₀ y CL₉₀), se realizaron diluciones del producto según las normas para bioensayos estipuladas por el Instituto Pasteur, con la finalidad de obtener 6 concentraciones de la formulación. Estas diluciones se realizaron utilizando una pipeta graduada en μ L, partiendo inicialmente con 100 mL del producto puro conteniendo 1000 p.p.m, de allí mediante diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones evaluadas: 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm. Se realizaron 3 réplicas por cada concentración y un control. En recipientes de vidrio estéril de 120 mL de capacidad, se agregó 80 mL de agua de clorinada a pH = 7,2 y un total de 25 larvas de III y IV estadio de *An. pseudopunctipennis* y *Culex spp.*, distribuidas en 20 mL de agua en iguales condiciones, con un volumen final de solución de 100 mL por cada réplica.

Los controles se prepararon en iguales condiciones solo que no contenía los biolarvicidas. La mortalidad fue observada a las 48 y 72 horas de exposición, corregida por la fórmula de Abbot si esta excedía del 5% en el control. Los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico, utilizando el paquete estadístico del programa Probit. (Finney D.J, 1981).

RESULTADOS

Las tablas N° 1 y 2, muestran la frecuencia y distribución de 18 cepas de *B. thuringiensis* var. *Israelensis* y 3 Cepas de *B. sphaericus* aisladas de diversas regiones geográficas del Perú, puede observarse que se aislaron 4 cepas de la región Arequipa (1.56%); 3 cepas de las regiones Lambayeque y Lima cada uno (1.17 %); 2 cepas de las regiones Ancash, Loreto, Junín y Madre de Dios cada uno (0.78%); 1 de las regiones Cuzco, Ucayali, Cajamarca, cada uno (0.39%).

Los recuentos de *B. thuringiensis* viables fueron registradas después de la selección con acetato. Estas fueron abundantes (2.4x10⁶ UFC/g - 1.8 X 10⁷ UFC/g) en suelos húmicos. Se seleccionaron un total de 18 cepas de *Bacillus thuringiensis* y 3 de *B. sphaericus* de acuerdo a la morfología de colonias (Tabla N°3) y morfología microscópica (Tabla N°5).

De las 18 cepas, 4 correspondían a *B. thuringiensis* patotipo II caracterizados por la producción de cristales parasporales semi esféricos, cuboides y 14 a *B. thuringiensis* patotipo IV con cristales bipiramidales, amorfos

TABLA 1. FRECUENCIA y DISTRIBUCION DE CEPAS NATIVAS de *Bacillus thuringiensis* y *B. sphaericus* CON POTENCIAL MOSQUITOCIDA

Estación de muestreo	N° Muestras	N° <i>Bacillus</i> Sp aislados	N° <i>B. th.</i> aislados	UFC/g	N° <i>B.sph.</i> aislados	UFC/g	% de Bt y <i>B. sph.</i> / total de <i>Bacillus</i>
ANCASH							
Huaraz	10	10	1	3.6 X10 ⁶	-	-	0.39
Yungay	10	10	-	-	-	-	-
Carhuaz	10	10	1	5.2 X10 ⁶	-	-	0.39
LAMBAYEQUE:							
Chiclayo	10	12	1	3.1 X10 ⁷	1	3.6X10 ⁷	0.78
Lambayeque	10	10	1	1.2 X10 ⁷	-	-	0.39
LORETO:							
Maynas	10	24	1	8.6X10 ⁷	1	1.8X10 ⁷	0.78
UCAYALI	10	20			1	2.3X10 ⁷	0.39
CUSCO:							
Urubamba	11	20	1	2.5 X10 ⁶	-	-	0.39
CAJAMARCA:	9	16	1	3.5 X10 ⁶	-	-	0.39
LIMA:							
Huaral	10	20	1	3.8 X10 ⁷	-	-	0.39
Canta	10	24	1	7.2 X10 ⁶	-	-	0.39
Cañete	6	12	1	6.8 X10 ⁶	-	-	0.39
Huachochiri	10	10	-	-	-	-	-
JUNIN:							
Huancayo	8	10	1	2.6 X10 ⁶	-	-	0.39
Tarma	6	10	-	3.2 X10 ⁶	-	-	-
Chanchamayo	5	13	1	3.2 X10 ⁷	-	-	0.39
AREQUIPA:							
Camana	6	3	1	1.6 X10 ⁷	-	-	0.39
Cailloma	6	4	1	4.2 X10 ⁶	-	-	0.39
La Joya	4	4	-	-	-	-	-
Caraveli	6	6	2	5.6 X10 ⁶	-	-	0.39
				3.2 X10 ⁶	-	-	0.39
MADRE DE DIOS	8	8	1	2.8 X10 ⁷			
			1	1.2X10 ⁷	-	-	0.78
Totales	175	256	18		3	1.17	7.03

y semiesféricos. Las 3 cepas de *B. sphaericus* presentaron esporas centrales y ovoides, cuerpos parasporales amorfos.

Las características morfológicas de colonias en Agar nutricio de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas se muestran en la Fig. 1, 1 A, tabla N° 4, Correspondiendo

en su mayoría a formas circulares de 6-8 mm de diámetro, aplanadas, opacas y de color blanco mate, bordes ondulados o rizoides.; morfológicamente correspondían a bacilos rectos, de extremos redondos o romos, Gram positivos, con esporas ovales subcentrales o terminales (Fig.2 y 3 Tabla N°5).

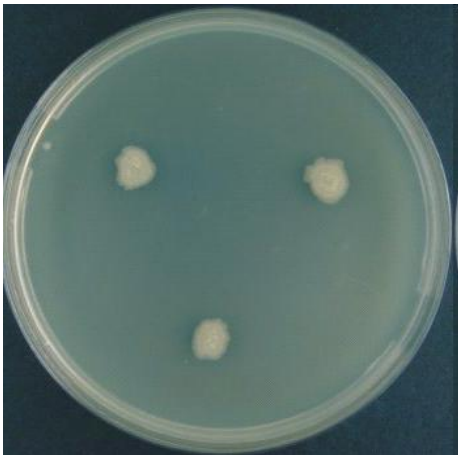


Fig.1 COLONIA DE *B. sphaericus* EN A. NUTRICIO



Fig. 1A. COLONIAS DE *B. thuringiensis* EN A.N.- LECITINA



Fig.2 *B. th.* COLORACIÓN GIEMSA



Fig.3 *B. th.* COLORACIÓN GRAM



Fig. 4 *B. th.* SOBRE AGAR PEMBA

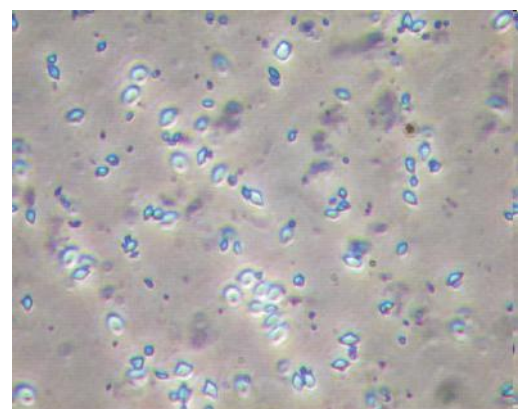


Fig. 5 MICROFOTOGRAFIA DE *B. thuringiensis* POR CONTRASTE DE FASES

TABLA N°2. DISTRIBUCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* y *B. sphaericus* POR REGIÓN GEOGRÁFICA DE MUESTREO

Estación de Muestreo	Clave	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. sphaericus</i>	Total <i>Bacillus</i> sp
ANCASH: Huaraz	BT-UNMSM	101		10
	BT-UNMSM	102		10
LAMBAYEQUE: Chiclayo	BT-UNMSM	103	Bs-UNMSM-104	12
	BT-UNMSM	105		10
LORETO:	BT-UNMSM	106	Bs-UNMSM-107	24
UCAYALI:	BT-UNMSM		Bs-UNMSM-108	20
CUSCO: Urubamba	BT-UNMSM	109		20
CAJAMARCA:	BT-UNMSM	110		16
LIMA: Huaral	BT-UNMSM	111		20
	BT-UNMSM	112		24
	BT-UNMSM	113		12
JUNIN: Huancayo	BT-UNMSM	114		10
	BT-UNMSM	115		13
AREQUIPA: Camaná	BT-UNMSM	116		3
	BT-UNMSM	117		4
	BT-UNMSM	118 Y 119		4
MADRE DE DIOS	BT-UNMSM	120		8
	BT-UNMSM	121		
TOTALES		18	3	256

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE COLONIAS DE *B. thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* AISLADOS DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DEL PERU

Cepa	TIPO DE COLONIA DE <i>B. thuringiensis</i> y <i>Bacillus sphaericus</i>				
	Forma	Tamaño	Elevación	Color	Borde
BT-UNMSM-121	Circular	4-7 mm	Aplanada	Blanco mate	Dentada
BT-UNMSM-102, 105	Circular	4-5 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-109, 114	Circular	4-5 mm	Aplanada	Blanco mate	Dentada
BT-UNMSM-103,117, 118	Circular	4-7 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-101, 110	Circular	4-6 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-106	Circular	8 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-111, 119	Circular	4-5 mm	Aplanada	Blanco mate	Entera
BT-UNMSM-116, 120	Circular	6-7 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-112	Circular	5-6 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-115	Circular	5-5 mm	Aplanada	Blanco mate	Ondulada
BT-UNMSM-113	Circular	8 mm	Aplanada	Blanco mate	Entera
BS-UNMSM-104, 107, 108	Circular	5 mm	Plana convexa	Blanco mate	Entera

TABLA 4. TIPOS DE CRISTALES DE CEPAS DE *B. thuringiensis* Y *Bacillus sphaericus* AISLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE SUELOS DE ÁREAS GEOGRÁFICAS DEL PERÚ

Cepa de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. sphaericus</i>	Tipo de suelo	Tipo de cristal	Patotipo
BT-UNMSM-101, 102	Arcilloso	Cuboide	II
BT-UNMSM-102, 103, 106, 109, 117	Arcilloso, húmico	Bipiramidal	IV
BT-UNMSM-106, 111, 112, 113, 120	Arcilloso	Amorfo semiesférico	IV
BT-UNMSM-110, 118	Arenoso	Semiesférico cuboide	II
BT-UNMSM-105, 114, 119, 121	Arenoso, húmico	Bipiramidal	IV
<i>B. sphaericus</i> Bs-UNMSM-104, 107, 108	Agua estancadas	-	-

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DE CEPAS DE *B. thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* AISLADOS DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DEL PERÚ

Cepa de <i>B. Thuringiensis</i>	Coloración		Morfología Microscópica	Posición de la Espora
	Gram	Azul de Coomassie		
BT-UNMSM-102, 106, 113, 118, 121	+	+	Bacilos con extremos romos	Subterminal
BT-UNMSM-101, 103, 109, 110, 114, 115, 120	+	+	Bacilos con extremos romos	Terminal
BT-UNMSM-105, 111, 112, 116, 117, 119	+	+	Bacilos con extremos circulares	Subterminal
Bs-UNMSM-104, 107, 108	+	-	Bacilos cortos con extremos romos	Central y ovóide

Las características culturales y bioquímicas de las cepas de *B. thuringiensis*, se muestran en las tablas N° 6 y 7. Las características descritas concuerdan con las des-

cripciones de Attathom T, Chongrattanameteekul (1995), y de Chatterjee, S. et al. (2007)

TABLA N° 6. CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*

<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>B. sphaericus</i>	A. PEMBA	C.N. NaCl 1%	C.N. NaCl 5%	C.N. NaCl 8%	Catalasa	Lecitinasa	Manitol	Glu
BT-UNMSM 101, 102, 105, 106, 109, 110, 112, 121	+	+	+	-	+	+	-	+
BT-UNMSM-103, 111, 116	+	+	-	-	+	+	-	+
BT-UNMSM- 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>B. sphaericus</i> Bs-UNMSM-104, 107, 108	+	+	+	-	+	+	-	+

TABLA N° 7. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE CEPAS DE *B. thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* AISLADOS DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DEL PERÚ.

Cepas de <i>B. th.</i> y <i>B. sph.</i>	Características Bioquímicas						
	Hidrólisis Gelatina	Hidrólisis caseína	Arginina DH	Indol	V-P	RxNO ₃	Ureasa
BT-UNMSM- 101, 120	+	+	-	-	+	+	+
BT-UNMSM- 102, 117	+	+	-	-	+	+	-
BT-UNMSM- 103, 105, 106, 109, 116, 111	+	+	+	-	+	+	-
BT-UNMSM- 112, 113 114	+	+	-	-	+	+	+
BT-UNMSM- 115, 116	+	+	+	-	+	+	+
BT-UNMSM- 118, 119	+	+	+	+	+	+	-
BT-UNMSM- 121	+	+	+	+	+	+	+
Bs-UNMSM- 104, 107, 108	+	+	-	+	-	+	+

El perfil de proteínas Cry en SDS-PAGE (Fig. 6) de las cepas entomotóxicas examinadas fue similar al de la cepa referencial del serotipo *B. thuringiensis* var. *Israelensis*. El perfil muestra que las cepas examinadas con-

tienen componentes proteicos múltiples con pesos moleculares de 20 a 140 kDa. Los perfiles proteicos de las cepas que tenían cristales bipiramidales y cuboidales eran idénticos

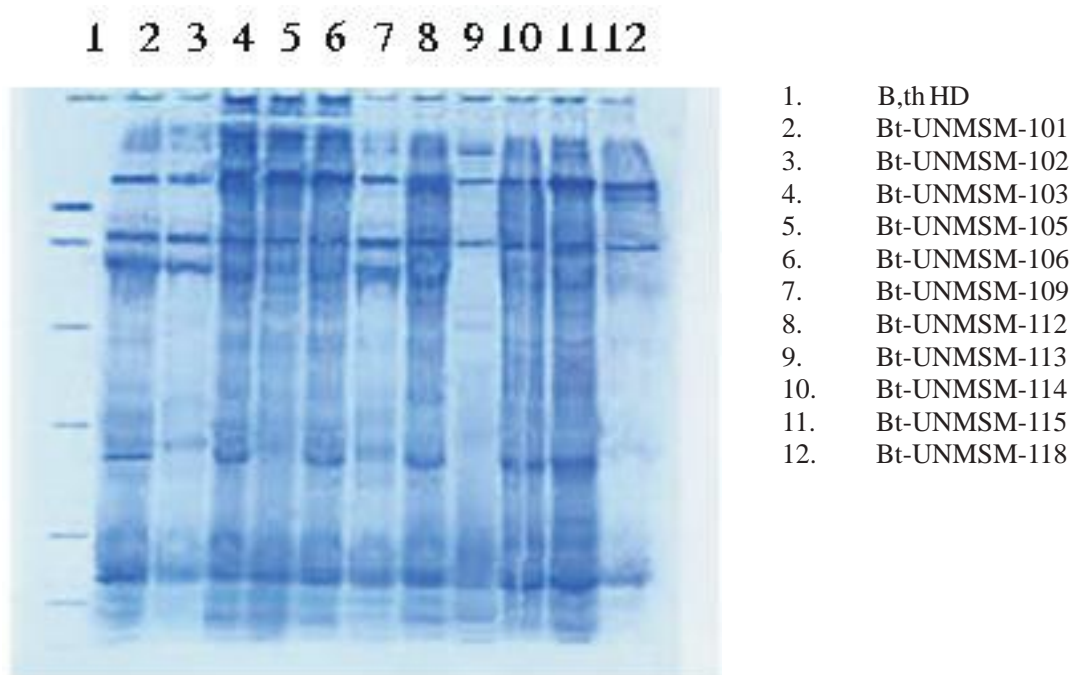


Fig. 6. PERFIL DE PROTEINAS CRY ELECTROFORESIS SDS-PAGE

TABLA N° 8. DETERMINACIÓN PRELIMINAR DE LA MORTALIDAD DE LARVAS DE *Anopheles pseudopunctipennis* EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *B. thuringiensis* *Israelensis* HD-968 y *B. sphaericus* NRRL-23268

Concentración ppp	N° larvas/replica	<i>B. th. Israelensis</i> HD-968					<i>B. sphaericus</i> NRRL-23268				
		Estadio				% mortalidad	Estadio				% mortalidad
		I	II	III	IV		I	II	III	IV	
0.1	25	4	4	3	4	15	3	2	2	3	10
0.5	25	12	10	10	12	44	10	8	8	10	36
0.1	25	16	14	12	12	54	12	12	10	12	46
0.25	25	21	22	20	21	84	20	21	18	17	76
0.5	25	25	22	24	25	96	24	21	21	25	91
1.0	25	25	25	25	25	100	25	25	25	25	100
Control	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tiempo de observación: 72 Hrs.											
Concentración letal											
CL ₅₀		0.865					0.94720				
CL ₉₀		0.7245					0.88020				

TABLA N° 9. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD DE *B. thuringiensis* var. *Israelensis* Y *B. sphaericus* NATIVOS FRENTE A *Anopheles pseudopunctipennis* Y *Culex spp* (CL₅₀ µg/mL)

CEPAS	ESPECIES DE MOSQUITOS			
	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Culex spp</i>		
	24 hr	48 hrs	24 hrs	48 hrs
<i>B. th. Israelensis</i> HD-968	0.175	0.134	1.92	1.78
BT-101	26.10	24.34	52.92	50.78
BT-102	5.75	5.25	15.82	14.14
BT-103	10.12	9.80	32.12	28.38
BT-105	19.15	18.14	52.90	50.78
BT-106	30.14	26.22	45.72	44.52
BT-109	34.15	30.44	35.12	31.78
BT-110	35.55	31.13	48.36	44.50
BT-111	55.52	50.94	68.12	64.02
BT-112	0.245	0.242	0.562	0.488
BT-113	28.46	28.04	45.74	44.88
BT-114	20.74	20.13	36.42	33.12
BT-115	35.50	32.34	51.22	48.44
BT-116	20.18	20.33	35.50	35.08
BT-117	40.54	38.66	42.90	40.78
BT-118	0.36	0.28	0.92	0.88
BT-119	65.46	60.74	78.22	71.68
BT-120	48.75	44.62	61.42	59.38
BT-121	34.45	33.41	51.72	51.08
<i>B. sphaericus</i> -23268	0.52	0.40	0.16	0.18
B.s.-104	1.22	1.10	0.48	0.40
B.s.-107	0.87	0.78	0.34	0.32
B.s.-108	0.92	0.81	0.50	0.48

TABLA N° 10. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD DE *B. thuringiensis* var. *israelensis* y *B. sphaericus* nativos frente a *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex spp* (CL₉₀ µg/mL)

CEPAS	ESPECIES DE MOSQUITOS					
	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>			<i>Culex spp</i>		
	24 hrs	48 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	48 hrs
<i>B. th. israelensis</i> HD-968	0.215	0.234	0.234	1.65	2.48	2.48
BT-101	28.80	26.35	26.35	62.92	60.78	60.78
BT-102	7.85	7.25	7.25	24.72	22.14	22.14
BT-103	12.72	10.80	10.80	36.72	32.48	32.48
BT-105	20.75	20.15	20.15	62.60	58.75	58.75
BT-106	36.45	32.72	32.72	65.12	62.72	62.72
BT-109	54.15	50.44	50.44	75.12	71.78	71.78
BT-110	45.65	41.38	41.38	38.36	34.50	34.50
BT-111	65.52	60.94	60.94	78.12	74.02	74.02
BT-112	0.236	0.340	0.340	2.52	2.68	2.68
BT-113	38.46	32.04	32.04	35.12	35.18	35.18
BT-114	30.14	30.10	30.10	38.42	33.12	33.12
BT-115	45.50	42.74	42.74	61.18	58.45	58.45
BT-116	30.58	30.38	30.38	45.50	42.08	42.08
BT-117	45.54	47.66	47.66	52.90	50.18	50.18
BT-118	0.428	0.386	0.386	3.20	3.105	3.105
BT-119	75.46	70.74	70.74	88.22	81.68	81.68
BT-120	58.75	54.62	54.62	68.52	62.38	62.38
BT-121	44.48	43.41	43.41	59.72	52.08	52.08
<i>B. sphaericus</i> -23268	0.65	0.60	0.60	0.21	0.20	0.20
B.s -104	1.22	1.10	1.10	0.48	0.40	0.40
B.s -107	0.95	0.88	0.88	0.44	0.42	0.42
B.s -108	1.12	1.08	1.08	0.60	0.58	0.58

TABLA 11. DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DE LARVAS DE *Anopheles pseudopunctipennis* EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *B. thuringiensis israelensis* y *B. sphaericus*

Concentration p.p.m	N° larvas/replica	<i>B. th.</i> BT-UNMSM-112				% mortalidad	<i>B. sphaericus</i> B-UNMSM-107				% mortalidad
		Estadio					Estadio				
						I	II	III	IV		
0.1	25	4	4	3	4	2	2	2	2	8	
0.5	25	12	10	10	12	10	8	8	10	36	
0.1	25	16	14	12	12	12	12	10	12	46	
0.25	25	21	22	20	21	20	21	18	17	76	
0.5	25	25	22	24	25	24	21	21	25	91	
1.0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	100	
Control	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiempo de observación: 72 Hrs.											
Concentración letal											
CL ₅₀			0.225						0.87		
CL ₉₀			0.236						0.95		

Los bioensayos preliminares y los específicos se muestran en la tabla N° 9, 10 y 11. Los bioensayos preliminares mostraron que la cepa *B. thuringiensis* BT-UNMSM 112 tipo *israelensis*: fue tóxica para *Anopheles pseudopunctipennis* y la cepa *B. sphaericus* Bs-UNMSM-108 mostró una toxicidad alta para *Culex spp*. Los bioensayos realizados mostraron a las cepas BT-UNMSM-112 y BT-UNMSM-118 como las de mayor capacidad entomocida frente a los primeros estadios de *Anopheles pseudopunctipennis* y Bs-UNMSM-107 mostró la mayor efectividad frente a *Culex spp*.

Se determinó los niveles de susceptibilidad, en el laboratorio, de esta especie a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus sphaericus*, encontrándose una CL₅₀ de 0.245 y 0.360 ìg /mL y CL₉₀ 0.236 y 0.428 ìg/ mL para *B. thuringiensis* BT-UNMSM 112 y BT-UNMSM 118 respectivamente y una CL₅₀ de 0.87 ìg/mL y una CL₉₀ de 0.95 ìg/mL para *B. sphaericus* Bs-UNMSM 107 frente a *An. pseudopunctipennis*. Para *Culex spp* se encontró una CL₅₀ de 0.562-0.920 ìg /mL y CL₉₀ 2.52-3.20 ìg/mL para *B. thuringiensis* BT-UNMSM-112 y BT-UNMSM-118 respectivamente y una CL₅₀ de 0.34 ìg/mL y una CL₉₀ de 0.44 ìg/mL con *B. sphaericus* Bs-UNMSM-107.

DISCUSIÓN

No se ha reportado previamente en el Perú, ningún trabajo relacionado con el aislamiento y caracterización de *Bacillus thuringiensis*, y *Bacillus sphaericus* nativos con potencial mosquitocida, por lo que nuestro trabajo representa la primera contribución de la biodiversidad de *B. thuringiensis* en suelos agrícolas nacionales. *B. thuringiensis* ha sido aislado del suelo, filosfera, insectos muertos, productos almacenados, excreta de animales vegetarianos etc. y aprox. 30-100% bacterias esporuladas de la filosfera se hallaron que correspondía a *B. thuringiensis* (De Barjac H 1978; Martin & Travers, 1989, Johnson C. & Bishop A.H, 1996; Bernhard K, et. al., 1997; Roberts G. M, 1997; Ferré J. 1999;). *B. Bacillus sphaericus* ha sido aislado del suelo, aguas estancadas e insectos muertos (Massie, J., 1985; Thiery I, Barjac H, 1989; De Barjac H. 1990; Baumann, P, 1991; Ribeiro Vilarinhos P. et. al.1996; Smith & Singer S., 2004; Clare M. et. al. 2007; Park, C. M. 2007)

Bacillus sphaericus es una bacteria bacilar Gram +. Aeróbico con esporas redondas comúnmente encontradas en ecosistemas acuáticos y en suelo. Se han encontrado cepas tóxicas a mosquitos en muchas partes del mundo, la cepa *B. sph* SSII-1 en la India, *B. sph.* 1593 de Indonesia; 2362 de Nigeria, 2297 de Sri Lanka y IAB59 de Ghana (Baumann, P. et.al. 1991).

Más de 380 cepas de *B. sphaericus* que son tóxicos a larvas de mosquitos de *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*, forman parte de la colección de la WHO y del Centro de Bacillus entomopatógenos del Instituto Pasteur, París-Francia. (Baumann, P.1991; Clare, M. 2007).

La descripción de colonias, morfología microscópica y cristales enmascarados reportados en el presente trabajo, concuerda con las observaciones de Attathom T. et. al 1995; Rampersad J; & Ammons D. 2005; Chatterjee, S. 2007.

Los bioensayos preliminares muestran que la cepa BT-UNMSM-112 y BT-UNMSM-118 presentaron el mayor grado de entomotoxicidad en relación a las cepas referenciales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* NRRL-HD 968 y *B. sphaericus* NRRL 23268.

Los resultados de mortalidad se sometieron a un análisis de regresión log-Probit método de máxima verosimilitud para establecer la línea dosis-mortalidad y las diferentes CL.

Las cepas nativas de *B. thuringiensis* BT-UNMSM 118, BT-112, mostraron una mayor actividad larvicida frente a *Ann. pseudopunctipennis* comparado con la cepa referencial y nativas de *B. sphaericus*, que mostraron mejor actividad entomocida frente a larvas de *Culex spp.* que coincide en gran medida con las observaciones de Rodríguez I B; et. al (1998), Rojas, J. E; et.al, 2001 y Mulligan 1980).

LITERATURA CITADA

- ATTATHOM T, CHONGRATTANAMETEEKUL W, CHANPAISANG J, SIRIYAN R** (1995). Morphological diversity and toxicity of delta-endotoxin produced by various strains of *Bacillus thuringiensis*. Bull. Entomol. Res. 85:167-173.
- BAUMANN, P., CLARK, M.A, BAUMANN, L & ANDREW H** (1991). *Bacillus sphaericus* as a Mosquito Pathogen: Properties of the Organism and Its Toxins. Microbiological Reviews, Sept. 1991, p. 425-436
- BERNHARD K, JARRETT P, MEADOWS M, BUTT J, ELLIS DJ, ROBERTS G.M, PAULI S, RODGERS P, BURGESH.G.** (1997). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: World wide distribution, Characterization, and Activity against Insect Pests. J Invertebr Pathol. 70: 59-68.
- BRAVO A, SARABIA S, LOPEZ L, CERON, J., L. COVARRUBIAS, R. QUINTERO, A. ORTIZ, M. ORTIZ, E. ARANDA ET AL.**(1994). PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60:353-356
- CLARE M.; PARK, H.W., ZHONG, H.M. HAYES. S.R.** (2007). Isolation of *Bacillus sphaericus* with

- improved efficacy against *Culex quinquefasciatus* J. Am. Mosquito Control Ass. Vol, 23 (4): 478-480.
- CHATTERJEE, S. N.1, BHATTACHARYA, T.2, DANGAR, T. K.3 AND CHANDRA, G.** (2007). Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (13), pp. 1587-1591, 4 July 2007
- CHILCOTT, C. N.; WIGLEY, P. J.** (1993). Technical note: an improved method for differential staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. Letters in Applied Microbiology 7: 67-70.
- COVAGARCIA, PANDE, SUTIL.** (1975). Clave para larvas de anofelinos de Venezuela. Bol. Direcc. Malariol. Saneam. Amnient. 15 : 6-24.
- DE BARJAC H** (1978). Un nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis var israelensis*. Entomophaga 23 (4): 309- 319.
- DE BARJAC H.** (1990). Classification of *Bacillus sphaericus* strains and comparative toxicity to mosquito larvae p. 228-236 In H. Barjac, D J Sutherland (eds): Bacterial Control of mosquitoes & Black flies: Biochemistry, Genetics & Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* Rutgers University Press, New Brunswick
- DULMAGE H.T.; CORREA J.A. Y MARTÍNEZ, A.J.** 1970. Coprecipitation with lactose a means of recovering, the spore crystal complex of *B. thuringiensis*. J. Invert. Pathol. 15: 15-20.
- FAST PG** (1972): The delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III: a rapid method for separating parasporal bodies from spores. J. Inv. Pathology 20:189-140
- FERRÉ J.** 1999. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. Syst. Appl. Microbiol. 22:179-185
- FINEY D.J** (1981). Probit Análisis, 3 ed edition, S. Chand & Company limited Ltd, Ram Nagar, New Delhi, 333 pp.
- MASSIE, J.; GRAHAM R. G.; WHITE, P.J.** (1985) Selective Isolation of *Bacillus sphaericus* from Soil by Use of Acetate as the Only Major Source of Carbon. Applied & Environmental Microbiology, Vol. 49, (6): 1478-1481
- HOLT JG** (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. I and II. Williams Wilkins, Baltimore, USA, 1&2: 965-1599.
- JOHNSON C, BISHOP AH.** (1996): A technique for the effective enrichment and isolation of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters; 142:173-177.
- MARTIN P. A. W, TRAVERS R. S** (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 55 :2437-2442.
- MULLIGAN F., SCHAEFER C., WILDER W.** (1980). Efficacy and persistence of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against mosquitos under laboratory and field conditions. J Econ. Entomol. 73: 648-688.
- PARK, C. M, HYUN-WOO, HE ZHONG, MANGUM, HAYES. S.R.** (2007). Isolation of *Bacillus sphaericus* with improved efficacy against *Culex quinquefasciatus*. J. Am. Mosquito Control Ass. 23 (4) pp 478-480
- PRIEST F. G.** (1992). Biological control of mosquitoes and other biting flies by *B. sphaericus* and *B. thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol. 72: 357-369.
- RAMPERSAD J; AMMONS D.** (2005): A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results BMC Microbiol. 5: 52
- RIBEIRO VILARINHOS P, MARUNIAK J. E, HALL, D. W** (1996). Characterization and Biological Activity of a Brazilian Isolate of *Bacillus sphaericus* (Neide) Highly Toxic to Mosquito Larvae. Mem. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 91 (6): 771-776
- ROBERTS G.M., PAULI S., P. ROGERS & H.D. BURGES.** (1997). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* worldwide distribution, characterization and activity against insect pest. J. Invertebr. Pathol. 70: 59-68
- RODRIGUEZ I B., TAIDE W.P., DIAS J.M.** (1998). Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93 (4): 441-444.
- ROJAS, J. E; MAZZARRI, M.; SOJO, M; YSRAEL GARCÍA G.** (2001). Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 sobre larvas de *Anopheles nuñeztovari*. Mérida, Venezuela. Invest. Clín. Ven. 42 (2)
- RUBIO-PALIS Y., CURTIS C.F.** (1992) Evaluation of different methods catching anopheline mosquitoes in western Venezuela. J. Amer. Mosquitoes Contr. Assoc., 8: 261-267.
- SMIRNOFF W.A.** (1962). A staining method for differentiating spores, crystal and cell of *Bacillus thuringiensis* (berliner). Journal of Insect Pathology 4: 384-386.
- SMITH, R.A.; SINGER, S.** (2004). *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. Biotechnology and Bioengineering Vol. 22 (7): 1335 -1355
- THIERY I, BARJAC H** (1989). Selection of the most potent *Bacillus sphaericus* strains based on activity ratios determined on three mosquito species Appl. Microb. Biotechn. 31: 577-581

INSTRUCCIONES PARA LA PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS EN LA REVISTA BIOTEMPO

Los artículos, cuyos contenidos son de estricta responsabilidad de sus autores, se presentarán en original en papel tamaño A4, a doble espacio y en páginas numeradas en forma correlativa, letra Times New Roman 12, adjuntando el CD del archivo en la versión de Word para Windows 98, 2000.

Las figuras y tablas en hoja aparte, con sus respectivas leyendas. La fotografía en papel brillante y con buen contraste; en el reverso debe anotarse con lápiz la numeración correspondiente. Igualmente los archivos en Excel, de fotografía digitalizada, deben estar incluidos en el CD.

Siempre que sea posible, los artículos deben tener la siguiente estructura:

1. Título: debe ser corto, claro y no debe tener más de dos líneas
2. Nombre de los autores, omitiendo grados académicos y títulos, indicando la institución en la que realizó el trabajo. Indicar la dirección electrónica del primer autor
3. Resumen en español: con un máximo de 200 palabras
4. Palabras claves: Tres palabras claves en español
5. Summary: resumen en inglés, con un máximo de 200 palabras
6. Key words: tres palabras claves en inglés
7. Introducción
8. Material y Métodos
9. Resultados
10. Discusión
11. Conclusiones
12. Referencia Bibliográfica, en la que sólo figurarán los autores citados en el texto. Las pautas a seguir son: Apellido (1ro), iniciales del nombre, año, título del trabajo, nombre de la revista en extenso en letra cursiva, el volumen y las páginas inicial y final del trabajo separadas por guión.

Ejemplos:

- HAWROT, E. 1991. Phosphatidylserine decarboxylate from *Escherichia coli*. *Methods of Enzymology*. 71: 571-576
- DOWHAN, W.; WICKNER, T. & TAKAHASHI, C. 2001. Intracellular distribution of enzymes of phospholipids metabolism. *Journal of Bacteriology*. 132: 455-467