

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS ENDEMICAS DE *Bacillus thuringiensis* DE LA MESA DE LOS SANTOS (S) Y ESTUDIO PRELIMINAR DE SU ACTIVIDAD INSECTICIDA EN LARVAS DE *Musca domestica*

ELIANA BUSTOS CARO

SILVIA NATALIA CASTILLO HERNANDEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Centro de Documentación y Bibliografía BIBLIOTECA		No. Clasificación B
No. Adquisición	28 OCT. 2000	9837
No. Inventario 100104	Revisión	Dpto. Solicitante

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
2000**

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS ENDEMICAS DE *Bacillus thuringiensis* DE LA MESA DE LOS SANTOS (S) Y ESTUDIO PRELIMINAR DE SU ACTIVIDAD INSECTICIDA EN LARVAS DE *Musca domestica*

**ELIANA BUSTOS CARO
SILVIA NATALIA CASTILLO HERNANDEZ**

**TRABAJO DE GRADO
PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR
AL TITULO DE BIOLOGO**

**DIRECTOR
JORGE HERNANDEZ TORRES, Ph D.
Ph.D Cienc. or Biol. Molec.**

**CODIRECTOR
ANA ISABEL GUARACAO AYALA, Ph D.
Ph.D Microbiología.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
2000**

A Maria Eugenia y Rafael por su formación, su paciencia y por hacer realidad este sueño.

A Fabian por su amor y su entrega incondicional.

A David y Eva por su confianza.

Y a todas las demás personas que llevo en mi corazón.

BIBLIOTECA UIS

Silvia

A la Fuente y Luz de todo bien, El Amado de mi corazón, dentro del cual soy, me muevo y existo.

A mi familia, en especial a mi mamá Lupe que nunca ha dejado de confiar en mí a pesar de todo y que ha sido mi gran apoyo.

A mis ángeles y mediadores, todos los amigos que unidos a mi sentir, han perseverado junto a mí colaborando material o espiritualmente en la tarea de sacar adelante esta meta.

A mis maestros, en especial a Ana Isabel Guaracao y Jorge Hernández quienes con su constancia, paciencia y dedicación, me han enseñado no sólo el camino de la ciencia, sino también el valor de la limpia conciencia y la rectitud de intención.

Y a todos los que siendo puertas fueron muros, los que siendo alegría aportaron tristeza, los que siendo fuerza mostraron debilidad; pues gracias a ellos se fortaleció mi constancia, se purificaron mis intenciones y se agudizó mi paciencia.

Eliana

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Jorge Hernández, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la UIS, por sus aportes científicos, su colaboración, su paciencia y por transmitirnos el amor a la Biología Molecular.

A la Doctora Ana Isabel Guaracao, Directora de la Escuela de Bacteriología, por acogernos y brindarnos siempre su apoyo moral e intelectual.

Al Doctor Sergio Orduz, director de la Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, por facilitarnos las cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis*, material para Biología Molecular, bibliografía y sus conocimientos.

A la Escuela de Biología de la UIS por habernos facilitado las condiciones logísticas para la realización de este proyecto.

A la Escuela de Bacteriología de la UIS y su equipo humano, por su apoyo logístico y su paciencia y al Laboratorio de Genética de la UIS adscrito a Ciencias Básicas, por facilitarnos el equipo de microfotografía.

BIBLIOTECA UIS

Al Ingeniero Hector Delgado, los Doctores Alvaro Rueda, Fabio Gómez, Flor Marina Gil, y al CINBIN, por aportarnos material biológico, bibliografía y conocimientos durante el desarrollo de esta investigación.

A nuestro amigo y compañero Fabian Galvis , porque gracias a su colaboración fue posible la terminación de éste proyecto.

A Vicerectoría Académica, Dirección de Investigaciones de la Facultad de Ciencias (DIF) y a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, por haber financiado este proyecto.

CONTENIDO

1	INTRODUCCION	1
2	REVISION DE LITERATURA	4
2.1	CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.1.1	Morfología y fisiología de <i>B. thuringiensis</i>	6
2.1.2	Ecología de <i>B. thuringiensis</i>	11
2.1.3	Clasificación de <i>B. thuringiensis</i> según la proteína cristal	21
2.1.4	δ -endotoxinas y su modo de acción	24
2.1.5	Expresión de los genes <i>cry</i>	31
2.1.6	Establecimiento de la actividad insecticida de una cepa	35
2.1.7	Bacteriófagos de <i>Bacillus spp</i>	37
2.1.7.1	Generalidades	37
2.1.7.2	Ciclo de Replicación	39
2.2	USO COMERCIAL DE LA δ -ENDOTOXINA COMO INSECTICIDA	42
2.3	MOSCA DOMESTICA	47
2.3.1	Generalidades	47
2.3.2	Ciclo de vida y descripción	47
2.4	APLICACIONES O PERSPECTIVAS EN EL USO DE <i>B. thuringiensis</i>	52
3	METODOLOGIA	59

BIBLIOTECA UIS

4.4.6	Desarrollo del Ensayo Preliminar de Toxicidad (EPT)	118
4.4.6.1	Preparación de cultivos de Bt para liofilización	118
4.4.6.1.1	A partir de cultivos líquidos	118
4.4.6.1.2	A partir de cultivos sólidos	121
4.4.7	Inoculación de las diluciones al MOv	121
4.5	DETECCION DE LA PRESENCIA DE UN FAGO BACTERIANO	122
4.5.1	Aislamiento del Fago	122
4.5.2	Infección	122
5	DISCUSION	125
5.1	AISLAMIENTO DE CEPAS ENDEMICAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	126
5.2	CARACTERIZACION MOLECULAR DE AISLAMIENTOS ENDEMICOS DE <i>B. thuringiensis</i>	128
5.2.1	Electroforesis de proteínas	128
5.2.2	Inmunoblotting	132
5.3	PRUEBAS BIOQUIMICAS	136
5.4	BIOENSAYO	138
5.4.1	Desarrollo del EPT	139
5.4.2	Realización del Ensayo Preliminar de Toxicidad: EPT	139
5.5	DETECCION DE LA PRESENCIA DE UN FAGO BACTERIANO	141
6	CONCLUSIONES	144
7	RECOMENDACIONES	146
	BIBLIOGRAFIA	149

3.5 AISLAMIENTO DE UN BACTERIOFAGO PRESENTE EN EL AISLADO	
SiEI.Bt 26 E INFECCION DE OTRAS LINEAS CELULARES	87
3.5.1 Aislamiento del fago	88
3.5.2 Infección de líneas celulares con el fago de SiEI.Bt 26	88
4 RESULTADOS	91
4.1 AISLAMIENTO DE CEPAS ENDEMICAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	91
4.1.1 Area de muestreo	91
4.1.2 Aislamiento de colonias endémicas	93
4.1.3 Conservación de los aislados endémicos	101
4.1.3.1 Stock de esporas	101
4.1.3.2 Tiras de papel de filtro	101
4.2 CARACTERIZACION MOLECULAR DE AISLAMIENTOS ENDEMICOS	
DE <i>B. thuringiensis</i>	101
4.2.1 Electroforesis de proteínas	101
4.2.2 Inmunoblotting	109
4.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS	113
4.4 BIOENSAYO	113
4.4.1 Adecuación de jaulas	113
4.4.2 Captura de insectos	116
4.4.3 Aclimatación	116
4.4.4 Medios de oviposición y alimentación	117
4.4.5 Ensayo de Desarrollo (EnDes)	118
4.4.5.1 Duración del ciclo de vida en cautiverio	118

3.1 AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	59
3.1.1 Area de muestreo	59
3.1.2 Colección de muestras de suelo	59
3.1.2.1 Sitios de muestreo	60
3.1.2.2 Procesamiento de las muestras	60
3.1.3 Microorganismos de referencia	62
3.1.4 Aislamiento de colonias endémicas	62
3.1.5 Conservación de los aislados de <i>B. thuringiensis</i>	66
3.2 CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE Bt	68
3.2.1 Electroforesis de proteínas	68
3.2.2 Inmunoblotting	72
3.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS	75
3.4 BIOENSAYOS	75
3.4.1 Adecuación de jaulas	75
3.4.2 Captura de insectos	77
3.4.3 Aclimatación	81
3.4.4 Ensayo de Desarrollo (EnDes).	81
3.4.5 Ensayo preliminar de toxicidad (EPT)	82
3.4.5.1 Desarrollo del EPT	82
3.4.5.1.1 Preparación de cultivos de <i>B. thuringiensis</i> para liofilización	84
3.4.5.1.2 Liofilización de cultivos de <i>B. thuringiensis</i>	86
3.4.5.1.3 Preparación de las diluciones	86
3.4.5.1.4 Inoculación de las diluciones de Bt al MOv (MOv-Bt)	87

LISTA DE TABLAS

1	Clasificación de los genes <i>cry</i> de acuerdo a su secuencia nucleotídica	23
2	Fagos temperados encontrados en especies de <i>Bacillus</i>	41
3	Microorganismos utilizados como controles en la caracterización macro y microscópica de los aislamientos endémicos, Immunoblotting, pruebas bioquímicas e infección con el fago	63
4	Medios para cultivo de <i>B. thuringiensis</i>	64
5	Tinciones utilizadas para la visualización de las células y cristales paraesporales de Bt	67
6	Soluciones para electroforesis de proteínas	70
7	Gel SDS-PAGE 9% según Laemmli	71
8	Soluciones para Immunoblotting	74
9	Medios utilizados en la cría de <i>M. domestica</i> para Bioensayo	79
10	Medios nutritivos usados en el aislamiento del fago Silel.Bt 26 y en la infección de líneas celulares	89
11	Características morfológicas de las inclusiones cristalinas de los aislados endémicos de Bt	99

LISTA DE CUADROS

1	Características bioquímicas para <i>Bacillus</i> pertenecientes al grupo I ^a	9
2	Resumen comparativo de los caracteres usados para identificar especies de <i>Bacillus</i> formadoras de inclusiones cristalinas	10
3	Pruebas bioquímicas para algunas subespecies de <i>B. thuringiensis</i>	12
4	Productos basados en <i>B. thuringiensis</i> disponibles comercialmente a nivel mundial	46
5	Estados de desarrollo de <i>Musca domestica</i> y sus características	48
6	Ubicación y características de las muestras de suelo positivas para aislados de Bt	92
7	Descripción de la morfología colonial de los aislados endémicos de Bt	94
8	Control de la formación de cristales de los aislados endémicos de Bt	100
9	Resultados de las pruebas bioquímicas para los aislados nativos y comparación con los patrones	114
10	Comparación de las características bioquímicas entre especies de <i>Bacillus</i> formadoras y no formadoras de inclusiones cristalinas y los aislados SilEI.Bt	115
11	Resultados del Ensayo de Desarrollo (EnDes)	119

LISTA DE FIGURAS

1	Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> .	7
2	Estructura tridimensional de la δ -Endotoxina Cry 3A	16
3	Ciclo de germinación, brote y esporulación de una típica bacteria formadora de esporas	17
4	Modo de acción hipotético de las δ -endotoxinas	27
5	Esquema general de la proteína δ -endotoxina, tipo Cry I y IV.	28
6	Esporulación y síntesis del cristal	33
7	Descripción del Bacteriófago T2	38
8	Ciclo de replicación del fago Lambda (λ)	40
9a	Dimorfismo sexual en <i>M. domestica</i> . Macho.	50
9b	Dimorfismo sexual en <i>M. domestica</i> . Hembra	50
10 ^a	Dimorfismo sexual en <i>M. domestica</i> . Ojos hembra	51
10b	Dimorfismo sexual en <i>M. domestica</i> . Ojos macho	51
11	Hoja de vida de las muestras recolectadas	61
12	Metodología usada para el aislamiento e identificación microscópica de colonias tipo Bt	65

13 Preparación de extractos de proteínas y resolución en geles SDS-PAGE 9%, según Laemmli	73
14 Inmunoblotting para los aislamientos de <i>B. thuringiensis</i>	74
15 Jaulas para el mantenimiento de <i>M. domestica</i>	78
16 Medio de oviposición para <i>M. domestica</i>	78
17 Medio de alimentación y suministro de agua para <i>M. domestica</i>	80
18 Jaulas con <i>M. domestica</i>	80
19 Medio de oviposición para el mantenimiento de larvas	83
20 Larva de <i>M. domestica</i>	85
21 Características macroscópicas de Bt	95
22a Morfología microscópica de los aislados. SilEI.Bt 26	97
22b Morfología microscópica de los aislados. SilEI.Bt 27	97
23a Morfología microscópica de los aislados. SilEI.Bt 67	98
23b Morfología microscópica de los aislados. SilEI.Bt 88	98
24 Electroforesis de proteínas de los aislados SilEI.Bt y controles, en medio HCO liquido	106
25 Electroforesis de proteínas de los aislados SilEI.Bt y controles, en medio sólido T3	108
26 Inmunoblotting de los aislados SilEI.Bt y controles, en medio HCO liquido	111
27 Inmunoblotting de los aislados SilEI.Bt y controles, en medio sólido T3	112
28 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (CIB) infectado con el fago proveniente del aislado SilEI.Bt 26	123

LISTA DE ABREVIATURAS

GUS	β -Glucuronidasa
ADN	Acido desoxiribonucleico
cm	Centímetros
C°	Centígrados
Conc.	Concentración
g	Gramo
Ha	Hectárea
Hy	Higromicina
Kb	Kilobase
Km	Kanamicina
l	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milimetro
ml	Mililitro
mg	Miligramo
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetros

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium dodecil sulfato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
Vol	Volumen
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

TITULO*

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS ENDEMICAS DE *Bacillus thuringiensis* DE LA MESA DE LOS SANTOS (S) Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD INSECTICIDA EN LARVAS DE *Musca domestica*.

AUTORES: BUSTOS CARO. E. & S.N. CASTILLO HERNANDEZ**

PALABRAS CLAVES:

Entomopatógenos, cristal paraesporal, δ - endotoxinas, *Musca domestica*.

DESCRIPCION:

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria que en el proceso de esporulación produce cristales paraesporales con actividad tóxica contra diferentes órdenes de insectos. Varias subespecies de Bt se distribuyen comercialmente para el control de insectos plaga tales como *Aedes aegypti* (dípteros), *Heliothis virescens* (lepidópteros) y algunas especies de coleópteros. No obstante, aún no se han aislado cepas de Bt tóxicas contra larvas de *Musca domestica* por lo cual se persiste en el uso preferencial de insecticidas químicos.

Durante la realización de este proyecto se colectaron muestras de suelo de los sectores I y II de la Mesa de los Santos (S), seleccionando esporas bacterianas a través de cultivo en caldo Luria Bertani (LB) con tampón de Acetato de Sodio 0.25 M. Aislándose en total 125 colonias bacterianas con morfología de bacilo, Gram (+), formadoras de esporas y cuatro de ellas (SileI. Bt 26, 27, 67, 88) mostraron inclusión cristalina paraesporal. Estas cepas fueron caracterizadas bioquímicamente usando el test BBL- Crystal GP, Beckton-Dickinson y las pruebas de Finegold & Martin, 1989. Además fueron caracterizadas molecularmente usando electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Inmunoblotting con anticuerpos policlonales de ratón anti-proteínas cristal de Bt. subsp. *israelensis* (CIB) mostrando la presencia de proteínas tipo Cry.

Se realizó un bioensayo para estudiar de forma preliminar la actividad tóxica de las cepas SileI.Bt contra larvas de *Musca domestica*, utilizando polvo liofilizado espora-cristal en concentraciones de 0.5 mg/ml y 1 mg/ml. Bajo las condiciones ensayadas no se reportó toxicidad significativa. Se usó como control positivo Bt. subsp. *damstadiensis*, la cual mostró los mismos resultados. Finalmente se constituyó un banco de cepas bacterianas formadoras de esporas, *Bacillus* spp, iniciándose la colección de Bt en la Universidad Industrial de Santander, Colombia.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Jorge Hernández Torres.

SUMMARY

TITLE*

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDEMIC STRAINS DE *Bacillus thuringiensis* OF THE MESA DE LOS SANTOS (S) AND PRELIMINAR STUDY INSECTICIDE ACTIVITY AGAINST *Musca domestica* LARVAE.

AUTHORS: BUSTOS CARO. E. & S.N. CASTILLO HERNANDEZ. **

KEY WORDS:

Entomopatogenics, parasporal crystal, δ - endotoxinas, *Musca domestica*.

DESCRIPTION:

Bacillus thuringiensis (Bt), it is a bacterium that produces parasporals crystalline inclusions with toxic activity against different orders of insects in the esporulation process. Several subspecies of Bt are distributed commercially for the such control of insects plague as *Aedes aegypti* (dipteral), *Heliothis virescens* (lepidopterons) and some species of coleopterons. Nevertheless, strains of toxic Bt have not still been isolated against larvas of *Musca domestica* reason why you persists in the preferential use of chemical insecticides.

During the realization of this project soil samples of the sectors I and II of the Mesa de los Santos (S) were collected, selecting bacterial spores through cultured in broth Luria Bertani (LB) with tampon of Sodium Acetate 0.25 M. Being isolated in total 125 bacterial colonies with bacillus morphology, Gram (+), producer spores and four of them (SileI. Bt 26, 27, 67, 88) showed crystalline parasporal inclusion. These strains were characterized biochemically using the test BBL - Crystal GP, Beckton-Dickinson and the tests of Finegold & Martin, 1989. They were also characterized molecularly using protein electroforesis in poliacrilamida gels (SDS-PAGE) and Immunoblotting with antibodies policlonales raised in mouse anti-proteins crystal of Bt. subsp. *israelensis* (CIB) showing the presence of proteins type Cry.

It was carried out biological assays to study in a preliminary way the toxic activity of the strains SileI.Bt against *Musca domestica* larvae, using powder liofilizado spore-crystal in concentrations of 0.5 mg/ml and 1 mg/ml. Under the rehearsed conditions significant toxicity was not reported. It was used as positive control Bt. subsp. *darmstadiensis*, which showed the same results. Finally a bank of strains bacterial spore producer, *Bacillus* spp, was constituted beginning the collection of Bt in the Industrial University of Santander, Colombia.

* Undergrade project

** Faculty of Ciencias, Biology School, Jorge Hernández Torres.

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria que en el proceso de esporulación produce cristales paraesporales con actividad tóxica contra diferentes órdenes de insectos. Varias subespecies de Bt se distribuyen comercialmente para el control de insectos plaga tales como *Aedes aegypti* (dípteros), *Heliothis virescens* (lepidópteros) y algunas especies de coleópteros. No obstante, aún no se han aislado cepas de Bt tóxicas contra larvas de *Musca domestica* por lo cual se persiste en el uso preferencial de insecticidas químicos.

Durante la realización de este proyecto se colectaron muestras de suelo de los sectores I y II de la Mesa de los Santos (S), seleccionando esporas bacterianas a través de cultivo en caldo Luria Bertani (LB) con tampón de Acetato de Sodio 0.25 M. Aislándose en total 125 colonias bacterianas con morfología de bacilo, Gram (+), formadoras de esporas y cuatro de ellas (SilEI. Bt 26, 27, 67, 88) mostraron inclusión cristalina paraesporal. Estas cepas fueron caracterizadas bioquímicamente usando el test BBL- Crystal GP, Beckton-Dickinson y las pruebas de Finegold & Martin, 1989. Además fueron caracterizadas molecularmente usando electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e

Inmunoblotting con anticuerpos policlonales de ratón anti-proteínas cristal de Bt. subsp. *israelensis* (CIB) mostrando la presencia de proteínas tipo Cry.

Se realizó un bioensayo para estudiar de forma preliminar la actividad tóxica de las cepas SilEI.Bt contra larvas de *Musca domestica*, utilizando polvo liofilizado espora-cristal en concentraciones de 0.5 mg/ml y 1 mg/ml. Bajo las condiciones ensayadas no se reportó toxicidad significativa. Se usó como control positivo Bt. subsp. *darmstadiensis*, la cual mostró los mismos resultados. Finalmente se constituyó un banco de cepas bacterianas formadoras de esporas, *Bacillus* spp., iniciándose la colección de Bt en la Universidad Industrial de Santander, Colombia.

1. INTRODUCCION

Durante los últimos treinta años se ha acumulado evidencia científica sobre los efectos nocivos y las implicaciones ambientales del uso de insecticidas químicos. Su toxicidad y los problemas que causan al ambiente unido al aumento de la resistencia que presentan los insectos hacia algunos pesticidas, han generado un interés creciente en el uso de estrategias alternativas para controlar insectos plagas.

Bacillus thuringiensis (Bt) es un microorganismo ampliamente estudiado en el mundo, por sus características insecticidas y su utilidad en el control de insectos de diferentes órdenes. Entre los años 1925 a 1935 comenzó a ser utilizado para el control del barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*, plaga importante en el sur de Europa. Hoy en día los insecticidas que utilizan como principio activo la proteína tóxica producida por esta bacteria, son el principal renglón productivo del mercado mundial de biopesticidas (Ordúz et al., 1997; Realpe et al., 1998).

La investigación dedicada a esta área, promovida por la urgente necesidad de resolver problemas agrícolas y de salud pública, ha dado lugar a un conocimiento exhaustivo de su biología. La diversidad de cepas diferentes de *B. thuringiensis* ha permitido desarrollar productos principalmente, pero no exclusivamente, para el control de insectos (Realpe et al., 1998). Con los nuevos adelantos de la biología

molecular, se ha logrado comprender su mecanismo de acción, a la vez que potenciar y extender sus capacidades entomopatógenas. Las colecciones hechas hasta hoy satisfacen parcialmente las expectativas de los gremios agrícolas a nivel mundial, reflejado en el creciente número de compañías dedicadas a investigar sobre este organismo en particular y en los logros obtenidos por la comunidad científica en general. Sin embargo, es importante aumentar estas colecciones y es aún más importante caracterizar los aislamientos allí incluidos de acuerdo a su eventual toxicidad hacia nuevos organismos, además de la detección de cepas con niveles de toxicidad superior a las ya conocidas y que tengan potencial para un desarrollo biotecnológico. El descubrimiento de nuevas toxinas justifica un estudio exhaustivo y detallado para disminuir la probabilidad del desarrollo de organismos resistentes a nivel de campo y así enfrentar el reto de desarrollar alternativas ecológicamente amables con nuestro planeta.

En Colombia son muchas las investigaciones realizadas acerca de Bt, con el fin de aislar y caracterizar colonias nativas del microorganismo que sean potencialmente tóxicas contra las plagas de insectos y vectores de enfermedades.

Entre los pioneros de estas investigaciones en nuestro país se encuentran:

1. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), quienes en 1992 aislaron y caracterizaron la serovariedad colombiana *Bacillus thuringiensis* Subsp. *medellin*, H30 (Orduz et al., 1992), tóxica contra Dípteros;
2. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia en Santafé de Bogotá;
3. Vecol S.A. de Corpoica;
4. Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes;
5. ICA;
6. Universidad del Quindío.

Estas instituciones actualmente forman parte de la Red *Bacillus thuringiensis*, creada en 1993 a instancias de Colciencias.

En el marco de este trabajo pretendemos que la Universidad Industrial de Santander se convierta en pionera en la investigación de *B. thuringiensis* en Santander, a la vez que generadora, en el futuro, de soluciones a los problemas agrícolas y de salud pública locales, como el ocasionado por la mosca de la piña, la broca del café, la mosca doméstica o el mosquito *Aedes aegypti*, sin recurrir a soluciones que perjudiquen aún más nuestro ambiente y no brinden una solución real al problema. Además este proyecto es el inicio para la realización de estudios más puntuales en biología molecular, celular, biotecnología, genética y bioquímica entre otros.

Este proyecto pretende establecer las condiciones para el aislamiento de Bt en los laboratorios de Biología de la UIS, dando inicio a una colección de cepas endémicas de Bt con potencial actividad tóxica contra *Musca domestica*. Con las pruebas moleculares y los bioensayos pretendemos conocer mejor el mecanismo de toxicidad de estas bacterias.

Con el aislamiento de cepas endémicas de la zona de la Mesa de los Santos en Santander, se pretende la futura utilización de microorganismos autóctonos en el control de insectos, adaptados a las condiciones locales y que no perjudiquen la salud humana, la flora, ni la fauna de la región.

2. REVISION DE LITERATURA

El control de insectos plaga ha sido una necesidad del hombre por años, ya que estos se han convertido en uno de los principales problemas de los cultivos, en donde ocasionan pérdidas que representan entre el diez y el treinta por ciento de los costos de producción, además de ser importantes vectores de enfermedades para los animales y el hombre. Hasta hace unos años, eran combatidos exclusivamente mediante el uso de insecticidas químicos.

Los insecticidas químicos pueden ser tóxicos y causar graves problemas de contaminación ambiental cuando se usan inapropiadamente. Tienen la característica de ser poco biodegradables y presentar baja especificidad (Bravo et al., 1998).

Si a esto sumamos la restricción que en muchos países se está haciendo sobre el uso de insecticidas químicos, la emergencia ocasionada por problemas de resistencia de los insectos a estos productos y el alto costo que conlleva el desarrollo de nuevos insecticidas, el uso de estrategias alternativas de menor impacto en la ecología para el control de insectos cobra gran importancia.

El manejo integrado de plagas constituye una alternativa biológica que incluye el uso de depredadores, parásitos y patógenos (Ascencio & Torifio, 1995). Como parte importante del control biológico, el control microbiano se define como el uso

de microorganismos (virus, bacterias y hongos) o sus productos para el control de insectos plaga. (Badii et al., 1993).

Bacillus thuringiensis (Bt), una bacteria formadora de esporas, es probablemente el microorganismo más importante para el control biológico de insectos en el ámbito mundial (Realpe et al., 1998). Las propiedades entomopatogénicas de esta bacteria se deben en gran medida a la producción de las proteínas δ -endotoxinas, que desde hace más de treinta años se utilizan en el control de insectos, principalmente de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera, presentando ventajas importantes en comparación con los insecticidas químicos. Son biodegradables por lo que no contaminan suelos y aguas y por su gran especificidad, no son tóxicas hacia plantas y otros animales (Bravo, 1995a).

A mediados de los 80, los bioinsecticidas representaron el 1% del mercado mundial de insecticidas (Ordúz et al., 1997). A partir de entonces, el uso de Bt ha entrado en una fase de desarrollo debido al éxito comercial del Bt subsp. *kurstaki* y el hallazgo de las subsp. *israelensis* y *morrisoni*. En la actualidad esta bacteria representa más del 90% de los bioplaguicidas comerciales a base de entomopatógenos (Bravo, 1995b; Ordúz et al., 1997).

La tecnología del ADN recombinante y otros descubrimientos en el campo genético, han ampliado las posibilidades de utilización de esta bacteria y se continúa trabajando para explotar las propiedades tóxicas que posee.

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE *B. thuringiensis*

2.1.1 Morfología y fisiología de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis fue descubierto en Japón en 1901, y su descripción formal se hizo en Alemania entre 1911 y 1915; desde su descubrimiento ha sido investigado como insecticida microbiano (Galán, 1993a). Es una bacteria esporulada, Gram positiva y facultativa, que produce inclusiones cristalinas durante la esporulación (Figura 1).

Junto con *B. mycoides* y *B. anthracis*, *B. thuringiensis* pertenece al grupo de *B. cereus*. Estas especies, en conjunto con *B. megaterium*, están clasificadas en el grupo 1 del género *Bacillus* en la familia *Bacillaceae* (Damgaard, 1996 citado por Realpe et al., 1998). Bt pertenece al grupo 1, según el análisis de las secuencias basadas en rRNA 16S (Sonenshein et al., 1993). Es cosmopolita, sin embargo la razón de esta diversidad no es conocida y su ecología ha sido poco estudiada (Martin et al., 1989).

Para realizar una identificación general de células bacterianas, se pueden seguir procedimientos simples tales como: descripción de su morfología celular, coloración de Gram, análisis de su capacidad para crecer en condiciones aerobias o anaerobias y requerimientos de sustratos especiales para su cultivo. También pueden identificarse con base en las propiedades bioquímicas, antigénicas o con pruebas de sensibilidad a antibióticos.



FIGURA 1. Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Instituto Pasteur (Francia). Cortesía de la CIB (Medellín).

Las pruebas bioquímicas se basan en la capacidad de la bacteria para producir enzimas como: catalasa, coagulasa, oxidasa, lecitinasa, entre otras; en la capacidad para crecer en varios sustratos como: glucosa, lactosa, sacarosa, arginina, etc., y en la capacidad para metabolizar azúcares por oxidación o fermentación (Mims et al., 1995). Para la identificación microbiana de bacilos se utiliza generalmente un set de pruebas bioquímicas como lo muestra el cuadro 1. Partiendo de esta base pueden destacarse algunas características bioquímicas de los aislados de Bt, como son; producción de catalasa, hidrólisis de almidón y caseína, crecimiento en NaCl al 7% y formación de cristal parasporal, entre otras (Mims et al., 1995).

Dentro del género *Bacillus*, especies como *B. sphaericus* (Bsph) y *B. popilliae* (Bp) producen, al igual que Bt, toxinas insecticidas de tipo proteico que son sintetizadas durante la esporulación y se depositan como inclusiones cristalinas paraesporales, como lo reporta Aronson (1993, citado por Sonenshein et al., 1993). De esta forma es relevante destacar características generales de estas dos especies, tanto de carácter bioquímico como morfológico, ya que pueden usarse como géneros de comparación dentro de la caracterización realizada a un grupo de aislados desconocidos, con el fin de determinar la especie a la que pertenecen (Cuadro 2). Bsph es un bacilo Gram (+); posee espora esférica que deforma notablemente el cuerpo del bacilo y cuya ubicación puede ser terminal o subterminal. Pertenecer a las clasificaciones grupales para *Bacillus* II^a y IV^b. Bioquímicamente se caracteriza por tener un metabolismo estrictamente oxidativo. No utiliza azúcares como fuente de carbono y energía, sino que utiliza acetato o aminoácidos como el glutamato

^a Grupo de clasificación rARN

^b Grupo de clasificación según similitudes fenotípicas

CUADRO 1. Características bioquímicas para *Bacillus* pertenecientes al grupo I^a

CARACTERISTICA	ESPECIES DE <i>Bacillus</i>						
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformes</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. coagulans</i>
CATALASA	+	+	+	+	+	+	+
VOGES PROSKAUER (VP)	+	+	+	+	+	-	+
CRECIMIENTO ANAEROBICO	+	-	+	+	-	-	+
CRECIMIENTO ANAEROBICO A 50 C	-	+	-	+	+	-	+
CRECIMIENTO EN NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	-
FORMACION DE ACIDO Y GAS A PARTIR DE GLUCOSA	-	-	-	-	-	-	-
REDUCCION DE NO ₃ A NO ₂	+	-	+	+	-	V	V
HIDRÓLISIS DE ALMIDON	+	+	+	+	-	+	+
CRECIMIENTO A 65 C	-	-	-	-	-	-	-
pH EN VP, MEDIO/6.0	-	V	-	V	-	V	-
FORMACION DE ACIDO DE GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	-
HIDRÓLISIS DE CASEINA	+	+	+	+	+	+	V
FORMACION DE CRISTAL PARAESPORAL	+	-	V	-	-	-	-

^a Grupo de clasificación según ARN

(+) = Positivo: mayor del 85% en cepas examinadas por Gordon, Haynes and Pang (1973); (-) = negativo: menor del 85%; (V) = de carácter variable. Adaptada de Slepecky & Hemphill, 1992.

CUADRO 2. Resumen comparativo de los caracteres usados para identificar especies de *Bacillus* formadoras de inclusiones cristalinas

CARACTERISTICA	ESPECIES DE <i>Bacillus</i>		
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. popilliae</i>
GRUPO *	II	IV	I
POSICION Y FORMA DE LA ESPORA	C, PC y O, N	ST, T y R, S	T y O
CATALASA	+	+	-
VOGES PROSKAUER (VP)	+	-	-
CRECIMIENTO ANAEROBICO EN AGAR	+	-	+
CRECIMIENTO EN NaCl 7%	+	V	-
FORMACION DE ACIDO Y GAS A PARTIR DE GLUCOSA	+	-	+
REDUCCION DE NO ₃ A NO ₂	+	-	-
HIDROLISIS DE ALMIDON	+	-	-
FORMACION DE ACIDO DE GLUCOSA	+	-	+
HIDROLISIS DE CASEINA	+	V	-

C : central, PC : paracentral, ST : subterminal, T : terminal; O : ovalada, R : redonda; N : no deforma el cuerpo del bacilo, S : si deforma el cuerpo del bacilo; V : caracter variable. * Grupo : según similitudes fenotípicas, adaptado de Priest, 1993 (citado por Sonenshein et al., 1993)

(Priest, 1993 citado por Sonenshein et al., 1993). Bp es también un bacilo Gram (+) que posee espora elipsoidal en posición terminal y pertenece en ambos casos^a, ^b al grupo I. Se destaca bioquímicamente por presentar reacciones negativas para Catalasa, Voges Proskauer e Hidrólisis de Caseína (Priest, 1993 citado por Sonenshein et al., 1993). Hasta ahora ha sido aislado únicamente de escarabajos disecados (Slepecky & Hemphill, 1992).

Según Díaz et al (1993), las pruebas bioquímicas para el acercamiento a la identidad de las subespecies de Bt, no son un patrón confiable de identificación; sin embargo muestran algunas similitudes entre ellas, como puede verse en el cuadro 3.

2.1.2 Ecología de *B. thuringiensis*

Hay varias hipótesis para explicar su rol en el ambiente, las cuales están basadas principalmente en el origen del material que ha sido usado para aislarla. Una de ellas se refiere a esta bacteria como entomopatógeno, porque ha sido aislada de insectos enfermos o muertos, aunque no es común encontrar estos ataques epizoóticos en el medio externo (Burges, 1973 citado por Vallejo et al., 1995); como ejemplo está el descubrimiento de Bt subsp. *israelensis*, aislada de larvas muertas de *Culex pipiens* en Israel (Goldberg & Margalit, 1977 citado por Vallejo et al., 1995). Este aislado, extremadamente tóxico para mosquitos y larvas de voladora negra, es el serotipo H-14 (Barjac & Franchon, 1990).

CUADRO 3. Pruebas bioquímicas para algunas subespecies de *B. thuringiensis*

CARACTERISTICA	SUBESPECIES DE <i>B. thuringiensis</i>		
	<i>israelensis</i> 1884	<i>morrisoni</i> serotipo 8a : 8b	<i>darmstadiensis</i>
LECITINASA	+	-	-
CATALASA	-	-	+
ARGININA DIHIDROLASA	-	-	+
CASEINA	+	ND	ND
HEMOLISIS EN AGAR SANGRE	β	β	β
UREASA	-	-	-
OXIDASA	-	+	+
SACAROSA	-	+	-
ESCULINA	-	+	+

(+) = reacción positiva; (-) = reacción negativa; (ND) = dato no obtenido; (β) = hemólisis beta en agar sangre. Adaptada de Martín & Travers, 1989; Orduz et al., 1992; Díaz et al., 1993 y Galán, 1993.

Otra se refiere a su asociación a estructuras de las plantas, ya que ha sido aislada de hojas de deciduos y coníferas en Norte América (Smith & Couche, 1991 citado por Vallejo et al., 1995) y de raíces de hidrófitos. Según Smith & Couche (1991), éstas podrían servir como un reservorio funcional para las esporas de Bt durante el invierno, siendo transportadas hasta allí por el viento. Finalmente como un habitante del suelo porque ha sido extensamente aislada de éste. Se ha propuesto que Bt crece en el suelo solo bajo condiciones especiales, y el origen de las esporas en él podría venir de la actividad de insectos y/o caída de hojas de plantas, actuando como un sumidero para las esporas de Bt, las cuales pueden ser diseminadas por el viento o las lluvias (West & Burges, 1985, West et al., 1985 citados por Vallejo et al., 1995). Sin embargo, el número reportado de especies de insectos del suelo susceptibles a las δ -endotoxinas, es pequeño en comparación a la alta cantidad de cepas aisladas de muestras de suelo. Esto puede indicar que allí existe la posibilidad de descubrir nuevas especies blanco, si se desarrollaran los modelos adecuados. Es posible que la altitud y la temperatura jueguen un papel importante en la distribución geográfica de Bt, ya que en el análisis de los aislamientos realizados en diferentes regiones de Colombia, se reportó que un 74% de éstos aislamientos, fueron obtenidos en zonas con altitudes superiores a 1450 m.s.n.m y temperaturas inferiores a 20 C, no encontrándose en las zonas desérticas muestreadas (Ascencio & Torifio, 1995)

A diferencia de otros bacilos como *B. cereus*, Bt no sobrevive en el suelo. Cuando las bacterias son esparcidas en suelos cultivados existe una pérdida de más del 90% y el resto permanece como esporas que no germinan a menos que se

incubén en medios de cultivo enriquecidos, mostrando que el factor más importante para la supervivencia de Bt, es la disponibilidad de nutrientes (Bravo, 1995a). Cabe suponer que la colonización de Bt al interior del intestino de los insectos susceptibles, es una estrategia desarrollada para su adaptación; ya que el complejo espora-cristal encuentra en el pH alcalino de este ambiente, las condiciones óptimas para su reproducción que no le brinda el suelo.

B. cereus se ha aislado comúnmente del suelo junto con *B. thuringiensis* encontrándose en un número más alto, lo que podría indicar que está más adaptado a las condiciones del suelo. La mayor diferencia entre Bt y Bc, es la producción de cristales δ -endotoxinas por Bt (Baumann et al., 1984, Priest et al., 1988, Zahner et al., 1989 citados por Vallejo et al., 1995). Posiblemente la habilidad de Bt para producir cristales está relacionada con los requerimientos para la formación de la espora, y así la pérdida o modificación de la información genética que codifica para las δ -endotoxinas podría modificar los requisitos para la formación de las esporas (Jarret, 1985 citado por Vallejo et al., 1995).

El método de aislamiento ha sido reportado por diferentes grupos de investigación (Carozzi et al., 1991, Cerón et al., 1994 citado por Bravo, 1995a) y básicamente consiste en la selección de la espora de Bt por medio de pasteurización, que permite eliminar de la muestra los organismos que se encuentran en fase vegetativa de crecimiento (Bravo, 1995a). Travers et al (1987), desarrollaron una técnica de aislamiento selectivo con acetato de sodio 0.25 M, que incrementa la eficiencia de aislamientos de Bt en presencia de otras bacterias formadoras de esporas. La mayoría de aislados de Bt conocidos hoy, provienen de muestras de

suelo colectadas alrededor del mundo. Sin embargo, en pocos estudios se ha probado la correlación entre las cualidades del suelo y la presencia o ausencia de Bt en una muestra particular (Vallejo et al., 1995). El estudio de esta correlación podría arrojar resultados en los cuales se encuentren propiedades físicas o químicas en el suelo que puedan ser usadas para estimar la probabilidad de encontrar aislados de Bt y aumentar su estabilidad, una vez aplicado como insecticida. *B. thuringiensis* posee la capacidad de formar endosporas de forma elipsoidal, de ubicación terminal o subterminal, que no deforman el cuerpo del bacilo (Stahly et al., 1992).

El desarrollo de esporas le permite a Bt permanecer viable bajo condiciones de estrés ambiental, tales como escasez de nutrientes o desecación, debido a su estructura y a su casi nula actividad metabólica. La germinación de las esporas y la subsecuente división celular, ocurre en respuesta a cambios ambientales asociados con condiciones favorables para la multiplicación (Vallejo et al., 1995).

Probablemente la característica más sobresaliente de Bt, es la producción de cristales proteicos con propiedades insecticidas (Bravo, 1995b). Estos cristales presentan formas distintivas que pueden ser reconocidas bajo microscopía de luz y de contraste de fase, son termolábiles y solubles en soluciones alcalinas (Arévalo et al., 1993). Estas inclusiones son comprimidos de proteínas tóxicas conocidas como Proteínas Cristal Insecticida (PCI), proteínas Cry o δ -endotoxinas, con un peso molecular entre 27 y 140 KDa (Hofte & Whiteley, 1989) (Figura 2). Bt presenta un ciclo de vida vegetativo y uno de esporulación (Vallejo et al., 1995) (Figura 3).



Figura 2. Estructura tridimensional de la δ -Endotoxina Cry 3A (Bt13), obtenida por difracción de rayos X. Tomada de la página Web de Protein Data Bank (PDB).

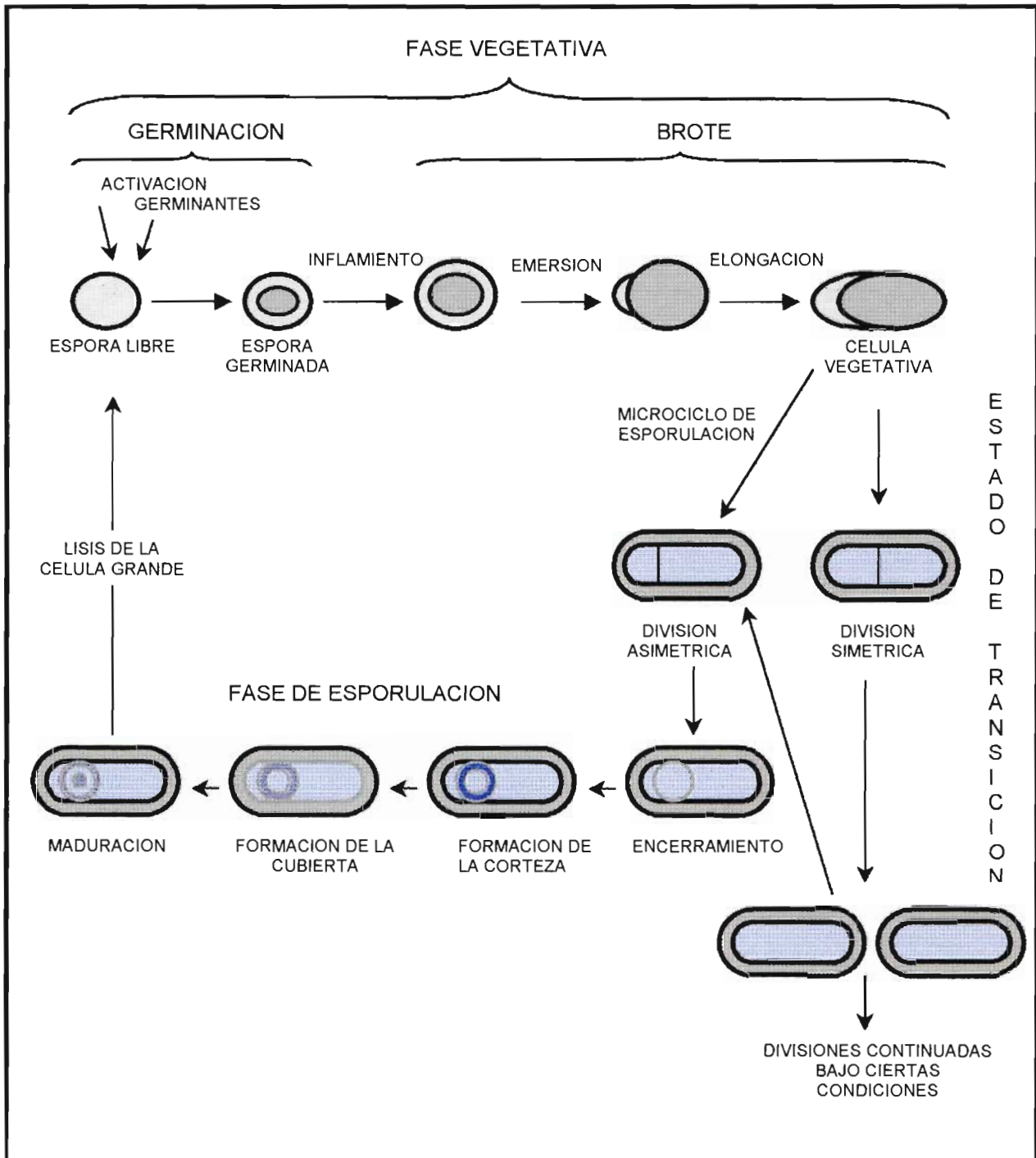


FIGURA 3. Ciclo de germinación, brote y esporulación de una típica bacteria formadora de esporas (Adaptada de Slepecky & Hemphill, 1992)

La biosíntesis de las toxinas está profundamente regulada durante el ciclo de vida de Bt, el cual puede dividirse en tres fases de acuerdo al patrón de expresión de sus genes. La primera es la fase vegetativa de aclimatación metabólica durante la cual germinan las esporas, las células expresan enzimas extracelulares y se da un crecimiento exponencial, en el que ocurre la proliferación máxima en donde se expresan una serie de exotoxinas; la segunda es un estado de transición de la fase vegetativa a la fase de esporulación como respuesta a la detección del agotamiento de nutrientes, durante el cual cambia el patrón de expresión de genes para afrontar el medio adverso (en esta etapa se inicia la síntesis de las δ -endotoxinas) y finalmente, la fase de esporulación que representa un fenómeno de diferenciación terminal, en la que llega a su máximo nivel la expresión de δ -endotoxinas (Agaisse y Lereclus, 1995, Aronson, 1993, Lereclus, 1988 citados por Realpe et al., 1998). Las δ -endotoxinas se sintetizan en gran cantidad durante el estado de transición y todo el proceso de esporulación, llegando a constituir el 30% del peso seco de las células (Agaisse & Lereclus, 1996 citado por Realpe et al., 1998). Esto indica una producción masiva de estas proteínas y se puede predecir que se utiliza una gran parte de la maquinaria celular en la síntesis de las mismas (Bravo, 1995b).

Las cepas de Bt se reconocen por una morfología colonial característica y por la presencia del cristal proteico insecticida, visible al microscopio de luz (Ascencio & Torifio, 1995). La morfología y la composición proteica de los cristales parasporales difiere entre las cepas de Bt y depende de la composición del medio

de cultivo y de las condiciones de crecimiento utilizadas (Burgues & Hurst, 1977 citado por Realpe et al., 1998).

Las inclusiones parasporales contienen varias δ -endotoxinas, y es esta diversidad lo que determina la selectividad de la actividad insecticida de cada cepa. Estas toxinas son selectivas, no específicas, porque aunque cada toxina tiene su actividad predominante hacia una especie de insecto en particular, también muestra actividad insecticida contra otros insectos, pero en menor proporción (Sarjeet et al., 1995).

Existe una correlación entre el espectro de acción tóxica de una cepa dada y la forma del cristal que esta cepa produce. De esta manera se producen cristales bipiramidales, romboides, cuboidales u ovoides. Muchas cepas de Bt que producen cristales bipiramidales son activas hacia larvas de insectos lepidópteros, como en el caso de la subsp. *kurstaki*. Los cristales romboidales son indicativos de una actividad hacia lepidópteros o hacia éstos y dípteros y los cristales cuboidales y ovoides hacia coleópteros y dípteros respectivamente, como en el caso de la subsp. *israelensis* que produce múltiples cristales pleomórficos y globulares y es tóxica para dípteros (Stahly et al., 1992). Cabe anotar que la correlación entre la morfología del cristal y el espectro insecticida, no es estricta. Por ejemplo, aunque la cepa S137J produce cristales bipiramidales, es tóxica hacia coleópteros y no hacia lepidópteros (Van Rie, 1995a).

Las δ -endotoxinas de algunas subespecies, son las toxinas más potentes que se conocen; 300 veces más que los insecticidas de tipo piretroide y 80.000 veces

más que los organofosforados (Ordúz et al., 1997; Feitelson et al., 1992 citado por Realpe et al., 1998)

Además, durante el ciclo vegetativo, *B. thuringiensis* produce exotoxinas solubles de varios tipos (Damgaard, 1996 citado por Realpe et al., 1998); algunos investigadores han propuesto que ellas sean consideradas factores de virulencia adicionales a las δ -endotoxinas, lo cual explicaría la alta patogenicidad de esta bacteria hacia sus organismos blanco (Ellar, 1996, Federici y Johnson, 1996, Lereclus, 1996, Salamitou et al., 1996 citados por Realpe et al., 1998). Algunos de estos factores de virulencia alternativos incluyen:

- α - exotoxinas (Hemolisina I y II y Thuringiolisina), proteínas citolíticas inespecíficas de 29-47 KDa.
- β - exotoxinas (Thuringiensinas), análogos nucleotídicos del ATP y UTP que son sintetizadas por enzimas cuyos genes se encuentran en plásmidos conjugativos, compiten por las ARN-polimerasas y así bloquean la síntesis de ARNr en mamíferos; al inhibir la transcripción, ejercen actividad mutagénica (Carlberg et al., 1995 citado por Realpe et al., 1998). Son usadas para el control de mosca doméstica en Africa (Ohba et al., 1981 citado por Realpe et al., 1998)
- Fosfolipasas, proteínas citotóxicas de dos tipos, una específica para hidrolizar fosfatidil-colina y otra para fosfatidil-inositol.
- Enterotoxina, proteína citotóxica semejante a la encontrada en *B. cereus* (40 KDa).

- Thuricina (péptido antibacteriano), bacteriocina semejante a la cereína de *B. cereus* y a la megacina de *B. megaterium*, está codificada en un plásmido de 233 Kb (Realpe et al., 1998).

También se ha encontrado recientemente, que algunas cepas de *B. thuringiensis* producen otro tipo de toxinas denominadas PVI (Proteína Vegetativa Insecticida), las cuales se expresan durante la fase vegetativa de crecimiento y exhiben toxicidad superior a algunas δ -endotoxinas (Estruch et al., 1996 citado por Realpe et al., 1998).

2.1.3 Clasificación de *B. thuringiensis* según la proteína cristal

La diversidad de las proteínas δ -endotoxinas del cristal de Bt, ha resultado del estudio de miles de aislamientos realizados en cerca de 50 países de los 5 continentes (Vallejo et al., 1995; Orduz, et al., 1997). La búsqueda de nuevas cepas con nuevas actividades o con mayor toxicidad, ha motivado esta labor.

El rango de especificidad es amplio, incluyendo diferentes órdenes de insectos (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, y Mallophaga) y en ácaros. Ya han sido descritas cepas para el control de otros invertebrados como nematelmintos, platelmintos y Sarcomastigophora (Vallejo et al., 1995; Bravo et al., 1998).

De Barjac et al. han desarrollado una de las colecciones más grandes de Bt y la han tipificado de acuerdo al antígeno H flagelar (Barjac & Frachon, 1990; Dulmage, 1981 citado por Bravo, 1995a). Hasta la fecha se han descrito 68

subespecies, pero su estatus de serovariedad no refleja sus características patogénicas, que son definidas por la composición de la proteína cristal (Barjac & Frachon, 1990; Realpe et al., 1998).

Una gran cantidad de genes *cry* han sido clonados y secuenciados. En un principio éstos fueron clasificados de acuerdo a su especificidad de acción en grupos (I, II, III,...) y a su secuencia nucleotídica en subgrupos (a, b, c,...) (Hofte & Whiteley, 1989; Bravo, 1995a).

Recientemente esta clasificación ha sido revisada y se basa exclusivamente en la secuencia nucleotídica. Con la descripción de nuevos genes, 108 en total, se han conformado 26 clases en las que se incluyen dos citolisinas y los genes de *Clostridium bifermentans* serovar. *malaysia* y de *B. popillae*. A la vez, se han reportado los nuevos genes denominados proteínas vegetativas insecticidas (PVI) descritas por Estruch et al (1996) (Ordúz et al., 1997).

Las proteínas tóxicas para insectos lepidópteros pertenecen a los grupos Cry1, Cry 2 y Cry 9; las toxinas activas contra insectos coleópteros a los grupos Cry 3, Cry 7 y las Cry 8 al igual que las Cry 1B y Cry 1C, que tienen actividad para ambos. Las proteínas Cry 5, Cry 12, Cry 13 y Cry 14 son nematocidas y las Cry 2, Cry 4, Cry 10, Cry 11, Cry 16, Cry 17, Cry 19 y proteínas Cyt, son tóxicas para insectos dípteros (Tabla 1). (Bravo et al., 1998).

Las secuencias completas de cada uno de los genes que codifican las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* están disponibles en la base de datos GenBank (Realpe et al., 1998).

TABLA 1. Clasificación de los genes *cry* de acuerdo a su secuencia nucleotídica

TIPO DE GENES	ACTIVIDAD*	OCURRENCIA**	PESO MOLECULAR KDa
<i>cry 1</i>	L	kur, sot, aiz, ent, thu, ale, dar, tol, gal, ken	130-140
<i>cry 2</i>	L/D	kur	70
<i>cry 3</i>	C	mor (ten, san), tol	73
<i>cry 4</i>	D	aiz, mor, isr, med, tou, dar	70-134
<i>cry 5</i>	N	5 cepas patentadas por Micogen	80
<i>cry 6</i>	N	5 cepas patentadas por Micogen	128
<i>cry 7</i>	C	mor	ND
<i>cry 8</i>	C/L	ND	ND
<i>cry 9</i>	L	kur, aiz, mor,	ND
<i>cry 10</i>	D	mor, isr, med, tou	ND
<i>cry 11</i>	D	mor, isr, med, tou	ND
<i>cry 12</i>	N	ND	ND
<i>cry 13</i>	N	ND	ND
<i>cry 14</i>	N	ND	ND
<i>cry 15</i>	ND	ND	ND
<i>cry 16</i>	D	isr, mor	ND
<i>cry 17</i>	D	isr, mor	ND
<i>cry 18</i>	ND	ND	ND
<i>cry 19</i>	D	isr, mor	ND
<i>Cyt</i>	D/Cytol	isr, mor	88.5

* Especificidad del rango de huésped: L, Lepidoptera; C, Coleoptera; D, Diptera; N, Nematoda; Cytol, citolítico. ** kur, *kurstaki*; thu, *thuringiensis*; sot, *sotto*; aiz, *aizawai*; ent, *entomocidus*; ale, *alesti*; dar, *darmstadiensis*; tol, *tolwarthi*; ken, *kenya*, gal, *galleriae*; mor, *morrisoni*; ten, *tenebrionis*; san, *sandiego*; isr, *israelensis*; med, *medellin*; ND, no disponible. Tomada de Galán et al (1995a) y Bravo et al (1998).

2.1.4 δ -endotoxinas y su modo de acción

Las proteínas tóxicas producidas por Bt en su configuración cuaternaria, se presentan como un cristal paraesporal en forma de protoxinas o toxinas no activas que se mantienen en él presumiblemente debido a interacciones complejas como hidrofobicidad, enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno, etc.; Estas son modificadas post-traduccionalmente mediante la adición de residuos glúcidos y formación de puentes disulfuro que dan lugar a un patrón regular (celda cristalina) el cual permite el crecimiento posterior del cristal que compone la inclusión parasporal (Schnepf, 1995 citado por Realpe et al., 1998). Una vez el organismo susceptible ingiere los cristales, el pH del intestino, al igual que las proteasas, solubilizan las protoxinas y activan las toxinas (Ordúz et al., 1997).

Un gran número de factores afectan la actividad insecticida de estas toxinas y su modo de acción. La actividad tóxica de Bt sólo es posible si los cristales parasporales son ingeridos por un organismo susceptible. La especificidad en este nivel se restringe, entonces, a aquellos organismos con un mínimo de características en su sistema de captación de alimentos (dimensiones de la cavidad bucal y tipo de hábitos alimenticios) (Realpe et al., 1998). Un segundo nivel de especificidad lo constituye la solubilización de los cristales bajo las condiciones fisicoquímicas específicas del intestino medio de las larvas del organismo susceptible (pH alcalino usualmente y condiciones reductoras), de tal manera que se liberen las protoxinas en forma soluble (Realpe et al., 1998). El intestino medio tiene numerosas funciones esenciales para la homeóstasis

normal del insecto. La clave de estas funciones es la regulación iónica. El conocimiento de esta regulación es crucial para el entendimiento del modo de acción de las toxinas de Bt, porque la principal consecuencia de la toxicidad es el rompimiento del balance osmótico celular del intestino medio. Allí las enzimas involucradas en la digestión como la tripsina y la quimotripsina, también juegan un rol en el procesamiento de las toxinas de Bt; las protoxinas solubles son reconocidas por éstas enzimas que actúan sobre puntos específicos de clivaje proteolítico liberando de esa manera los fragmentos tóxicos. Esto representa un tercer nivel de especificidad, en este caso de carácter bioquímico. Así mismo las enzimas participan en la detoxificación de productos secundarios de plantas, función que puede verse afectada por las toxinas y de este modo afectar la habilidad del insecto para metabolizar estos productos (Sarjeet et al., 1995).

Bajo condiciones normales, el borde apical de la membrana de las células del intestino medio de las larvas de insectos transporta activamente iones K^+ , creando potenciales de membrana que son mantenidos por una bomba ATPasa electrogénica tipo V, localizada en la parte terminal de la cavidad de las células goblet, y que envía H^+ al interior del intestino. Las toxinas activadas se unen a la membrana del intestino medio e incrementan la conductancia de las células columnares, lo que lleva a la interrupción de los gradientes eléctricos y de pH (Ordúz et al., 1997). Se presenta una severa restricción en el transporte de K^+ , que se cree es el responsable del mantenimiento del alto pH del intestino medio en condiciones normales. Este transporte es inhibido en un 78% alrededor de los 10 minutos posteriores a la ingestión y pasadas varias horas, todo el transporte activo

cesa (Slepecky & Hemphill, 1992).

De las hipótesis formuladas para explicar el modo de acción de las toxinas en el intestino del insecto, la más aceptada es la que concluye que las toxinas formen poros no selectivos con radios entre 0.6 a 1.0 nm, los cuales son más grandes que los iones K^+ , Na^+ y NH_4^+ , donde las moléculas de la toxina interactúan con la membrana para formar canales que la cruzan. Una vez la toxina se ha insertado en la membrana, se forman agregados y el tamaño del poro aumenta a medida que el agua entra en la célula, dando lugar a la lisis celular y a la muerte del insecto (Figura 4). (Mc-Gaughey et al., 1992; Van Rie, 1995b).

Las toxinas activadas se caracterizan por un patrón funcional de tres dominios (Figura 5), cada uno de ellos cumple una función diferente a nivel molecular, incluyendo la interacción con los receptores celulares de las membranas vellosas del intestino medio, constituyendo así un cuarto nivel de especificidad (del reconocimiento molecular) (Realpe et al., 1998).

El dominio I es el extremo N-terminal y consiste de un haz de siete hélices α . Se ha propuesto que este haz helicoidal es el formador del poro y que cinco hélices α juegan un rol clave en la inserción a la membrana (Gazit et al., 1994 citado por Sarjeet et al., 1995).

El dominio II consiste de tres hojas β , correspondientes a la región hipervariable que se piensa está involucrada en la unión al receptor de muchas toxinas. Las secuencias identificadas como responsables por la selectividad de la toxina, están contenidas dentro de este dominio (Ge et al., 1989, Ge et al., 1991, Lee et

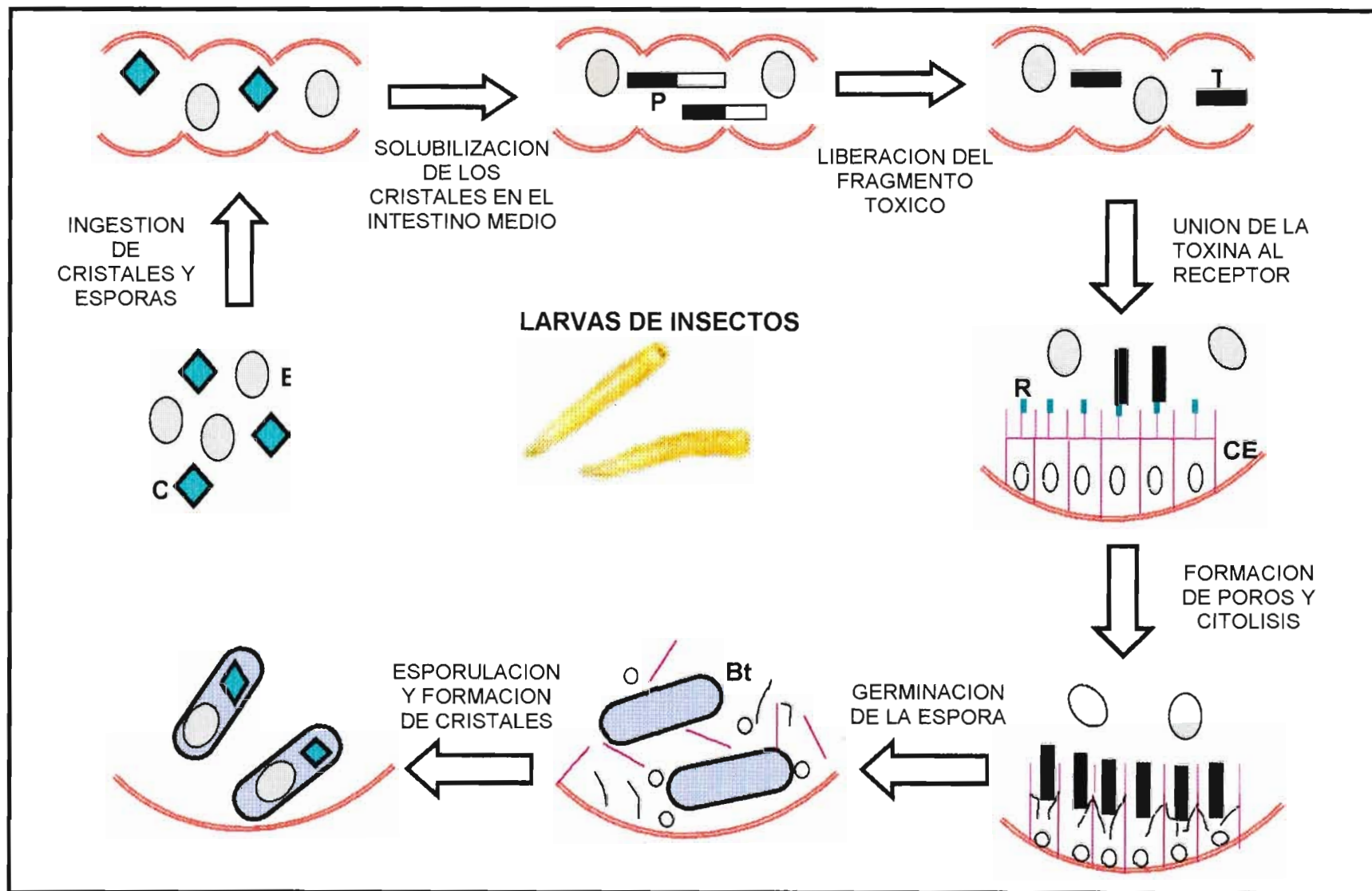


FIGURA 4. Modo de acción hipotético de las δ -endotoxinas. **C** : cristal, **E** : espora, **P** : protoxina, **T** : toxina, **R** : receptor específico, **CE** : células epiteliales y **Bt** : *B. thuringiensis*

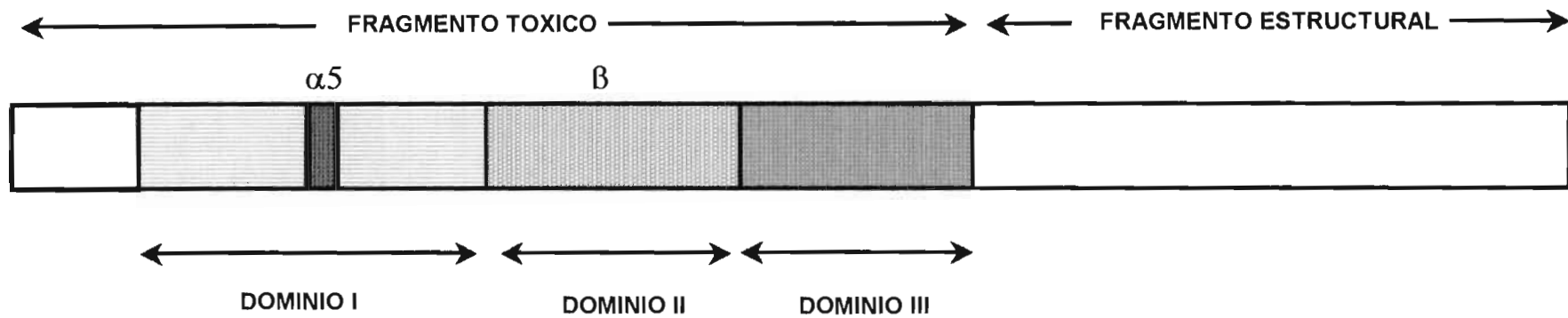


FIGURA 5. Esquema general de la proteína δ -endotoxina, tipo Cry 1 y 4. Los rectángulos en blanco indican regiones conservadas.

al., 1992, Lu et al., 1994, Widner & Whiteley, 1990, Li et al., 1991 citados por Sarjeet et al., 1995).

El dominio III compone el C-terminal de la molécula y también juega un rol en la toxicidad (Chen et al., 1993 citado por Sarjeet et al., 1995). Se piensa que la interacción del dominio III con el dominio I es importante para la estabilidad y la integridad del cristal (Li et al., 1991 citado por Sarjeet et al., 1995).

Como se ha dicho antes, el mecanismo molecular por el cual las δ -endotoxinas de Bt causan la muerte de los insectos susceptibles, no es claro. Pero se ha establecido que los dos pasos claves en la etapa inicial de la interacción de las toxinas con las células del insecto, son la solubilización y activación de las toxinas y la interacción de éstas con receptores específicos localizados en la membrana de las células. Aunque no se considera la solubilización como determinante de la toxicidad, es probable que la selectividad observada en la toxina sea en parte debida a una solubilización diferencial de ésta en el intestino de varios insectos y que la falta de actividad insecticida en un número de cepas de Bt, se explique por la pobre solubilidad de sus inclusiones paraesporales (Sarjeet et al., 1995).

Sin embargo, la especificidad de las toxinas depende de la presencia de los receptores apropiados en la membrana de las células. Estas δ -endotoxinas requieren un receptor de membrana específico sobre las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. Varios estudios han demostrado que hay una correlación positiva entre la actividad biológica de las toxinas Cry y su habilidad para unirse a las vesículas del borde de la membrana intestinal de larvas susceptibles (Hofmann et al., 1988c, Hofmann et al., 1988^a, Hofmann et al., 1988b,

Van Rie et al., 1989, Van rie et al., 1990 a, Van Rie et al., 1990b citados por Sarjeet et al., 1995).

Los últimos estudios realizados demuestran que la toxicidad parece estar más relacionada con el número de receptores que con la afinidad de las toxinas por el receptor. La clase de receptor depende en cada caso, de la especie susceptible y se cree que éste es una proteína glicosilada (McGaughey et al., 1992; Orduz et al., 1997). Los primeros síntomas del envenenamiento en la larva, son anorexia y parálisis del tracto alimenticio; posteriormente presenta vómito, diarrea, parálisis total y la muerte. A nivel de estructura microscópica, las células columnares del intestino medio pierden las involuciones basales, sufren hinchamiento de las microvellosidades, formación de vesículas del retículo endoplásmico, pérdida de los ribosomas, hinchamiento de las mitocondrias, de las células y los núcleos, con la subsecuente ruptura de los organelos nucleares y de la membrana plasmática. Otros signos microscópicos de la intoxicación incluyen un incremento en el tamaño y el número de los poros de la membrana basal y casi completa destrucción de las células Goblet, fenómenos que en general, progresan desde la región apical hasta la membrana basal (Ascencio & Torifio, 1995).

Los estudios realizados hasta ahora y que pretenden dilucidar el modo de acción de las toxinas en el insecto susceptible, han arrojado más información sobre insectos lepidópteros que sobre dípteros (Sarjeet et al., 1995). El modo de acción de las δ -endotoxinas ha sido principalmente estudiado usando proteínas Cry I. Se asume que otros tipos de Proteínas Cristal Insecticida (PCI) ejercen su efecto tóxico esencialmente de la misma manera (Van Rie, 1995b).

2.1.5 Expresión de los genes *cry*

Una de las estrategias más eficientes para acumular grandes cantidades de proteína en una célula, es expresar el gen correspondiente a partir de un promotor fuerte dentro de una célula que no se divida, de esta manera se evita la dilución de la proteína por división celular. Este es el tipo de estrategia que ha desarrollado Bt, en donde las proteínas Cry se producen en cultivos estacionarios durante la fase de esporulación. El mecanismo de esporulación ha sido ampliamente estudiado en *B. subtilis*. Cuando las bacterias se encuentran en un medio limitante de nutrientes, entran en una fase de transición del crecimiento activo vegetativo a fase estacionaria (Bravo, 1995b).

En *B. thuringiensis* se pueden encontrar plásmidos con pesos moleculares entre 2.2 y 280 Kb., su número de copias y tamaño depende de cada cepa aunque no existe relación alguna con el serotipo o el patotipo al que pertenece (González et al., 1981 citado por Realpe et al., 1998); usualmente estos plásmidos son crípticos, excepto los que codifican factores de virulencia como las proteínas Cry cuya función se presume tiene valor adaptativo aunque su número de copias usualmente es muy bajo (Sanchis et al., 1988 citado por Realpe et al., 1998). Las δ -endotoxinas producidas por Bt son codificadas por genes localizados en plásmidos de 62.3 a 233.6 kb (Agaisse y Lereclus, 1996, Lereclus et al., 1989, Whiteley y Schnepf, 1986 citados por Realpe et al., 1998; Slepecky & Hemphill, 1992). Se encontró que tres cepas de esta bacteria, transmitieron el fenotipo proteína- cristal a variantes de Bt que habían perdido el plásmido (González et al., 1982 citado por Aronson, 1993).

Los genes de protoxinas de una subespecie dada no están distribuidos al azar en un solo plásmido, sino tienden a estar confinados en pocos plásmidos. Por ejemplo, los genes para las 4 protoxinas activas contra dípteros en *Bt* subsp. *israelensis*, están todos sobre un plásmido de 112 Kb (Hofte & Whiteley, 1989; Aronson, 1993). Estos genes comparten una extensa región de homología en su extremo 3' (Carozzi et al., 1991).

En general el ambiente genético que circunda los genes de las δ -endotoxinas, se caracteriza por la presencia de secuencias de inserción aledañas, y en algunos casos, de transposones que pertenecen a la familia Tn3 de elementos genéticos móviles (Sherra't, 1989 citado por Realpe et al., 1998).

El desarrollo de la esporulación está regulado en el tiempo al nivel de la transcripción, por medio de la activación sucesiva de seis factores sigma, los cuales mediante la unión a la ARN polimerasa, determinan cuáles promotores génicos son reconocidos y por lo tanto cuáles genes serán transcritos (Haldenwang, 1995, Moran, 1989 citados por Bravo, 1995b).

Estos factores son el factor σ de fase vegetativa, σ_A , y cinco factores sigma de esporulación denominados σ_H , σ_F , σ_E , σ_G y σ_K , de acuerdo a su orden de aparición durante el desarrollo de la esporulación. Estudios bioquímicos y de microscopía electrónica han demostrado que en *Bt* las proteínas Cry se sintetizan en el citoplasma de la célula madre (Bravo, 1995b). La proteína comienza su expresión alrededor de la etapa II. (Figura 6).

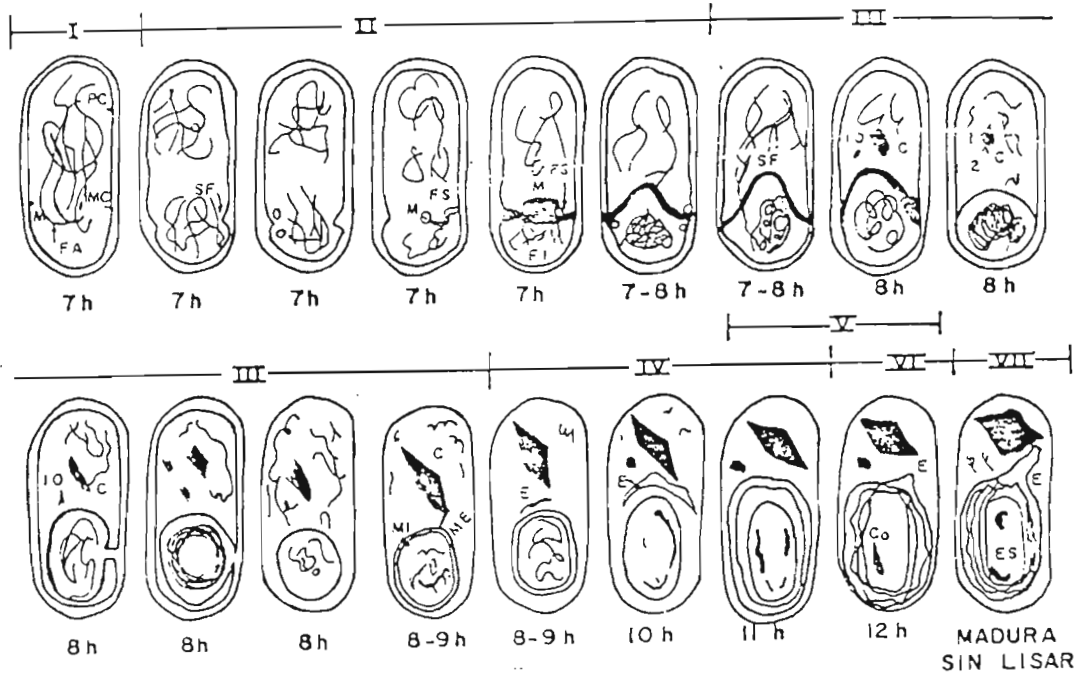


FIGURA 6. Esquema de la esporulación y síntesis del cristal en *B. thuringiensis*.

PC, pared celular; **FA**, filamento axial; **IO**, inclusión oval; **ME**, membrana externa; **ES**, espora madura en una célula sin lisar; **MC**, membrana celular; **SF**, septo de la preespora; **C**, cristal; **E**, exosporo; **M**, mesosoma; **PI**, preespora incipiente; **MI**, membrana interna; **CO**, corteza. Figura tomada de Pereira, 1993.

Se ha sugerido que la activación de los genes de la proteína cristal, es también regulada por cambios de la polimerasa. El análisis de la secuencia de ADN del gen para la proteína cristal de 133 KDa del Bt subsp. *kurstaki* HD-1-Dipel, reveló dos promotores traslapados, uno usado primero en la esporulación (Btl) y el otro activado en la mitad del desarrollo (BtII). (Wong et al., 1983 citado por Slepecky & Hemphill, 1992). La comparación de estos promotores con los estudiados en el sistema de *B. subtilis*, muestra pequeñas homologías con promotores ligados a la ARN polimerasa vegetativa (Slepecky & Hemphill, 1992).

Se ha considerado que esta bacteria sería económicamente muy costosa como biopesticida, de no ser por el alto nivel de expresión de los genes que codifican las δ -endotoxinas (Baum y Malvar, 1995 citado por Realpe et al., 1998). La razón por la cual *B. thuringiensis* acumula tal cantidad de δ -endotoxinas en forma de cristales proteicos es difícil de discernir. Sin embargo, el mecanismo molecular se está comenzando a dilucidar y se ha visto que involucra fenómenos básicos de regulación en la expresión génica, entre otros como promotores especiales, expresión concertada entre loci, estabilidad aumentada del ARNm; así como mecanismos postraduccionales y optimización del proceso de cristalización asistido por proteínas chaperonas con actividad foldasa. Estos fenómenos son independientes espacialmente pero están acoplados temporalmente a procesos de tal complejidad como la esporulación (Agaisse y Lereclus, 1995, Baum y Malvar, 1995, Whiteley y Schnepf, 1986 citados por Realpe et al., 1998).

2.1.6 Establecimiento de la actividad insecticida de una cepa

Con el aislamiento de cepas de Bt endémicas, se hace necesaria una caracterización que permita hacer un diagnóstico del espectro de actividad bioinsecticida que posea la δ -endotoxina de cada cepa de Bt en particular. En este sentido es muy importante contar con un sistema de análisis que permita identificar cepas de Bt que portan genes ya conocidos, de las que podrían portar genes completamente nuevos (Bravo et al., 1998).

Se han establecido diferentes estrategias para identificar genes *cry* conocidos dentro de una colección de bacterias. Estos métodos son secuenciación, PCR (Bourque et al., 1993; Cerón et al., 1994; Bravo et al., 1998) e hibridaciones tipo Southern blot con sondas específicas de diferentes genes *cry* (Kronstad y Whiteley, 1986 citado por Bravo, 1995a). Para la identificación de proteínas Cry, se utilizan pruebas como Western Blot usando anticuerpos para determinar el péptido de la proteína y análisis de reactividad para anticuerpos monoclonales o policlonales (Reguero et al., 1994).

La toxicidad de una cepa aislada de Bt puede predecirse de varias maneras: a través de un Rocket inmunológico, por PCR, utilizando células de insectos y por bioensayos, que evalúan directamente la actividad insecticida de Bt sobre los insectos o grupos blanco contra los que se presume actividad biocida (Ascencio & Torifio, 1995). Esta última forma es la más eficaz para verificar la toxicidad, con ella se determina de forma completa la potencia del microorganismo patógeno en una población de insectos estandarizada (Tovar et al., 1993).

Para el desarrollo de un ensayo biológico con Bt se deben tener en cuenta entre otros aspectos, el uso de una colonia estandarizada de insectos como referencia; la incorporación de las dosis a suministrar en los alimentos que ingiere el insecto y el control de calidad de la producción del bioinsecticida; éste debe seguirse y medirse a través de los mismos bioensayos hasta estandarizarlos, así se podrá determinar qué tan susceptible es la plaga en cuestión al bioinsecticida (Tovar et al., 1993).

Existen dos tipos de ensayos biológicos:

- Para cepas cuya actividad tóxica es aún desconocida, se utilizan ensayos preliminares que incluyen tres diluciones (de 10^{-2} a 10^{-4}), con cuatro repeticiones y un testigo, aceptando la cepa que reporte 100% de toxicidad (todos los insectos muertos).
- Para cepas cuya actividad tóxica es conocida, se buscará determinar la Concentración Letal Media (CL 50)(o dosis letal media DL 50). Esta se obtiene utilizando el análisis Probit con los datos de mortalidad arrojados por el bioensayo y la concentración del bioinsecticida. El número de insectos usados por dilución será de 25 a 30 individuos, haciendo cuatro repeticiones por cada dosis en días distintos. El rango de mortalidad no debe ser mayor del 90% ni menor del 10%. El conteo debe hacerse 24 horas después de la exposición al ensayo biológico. No es recomendable alimentar las larvas durante la realización del bioensayo (Tovar et al., 1993).

En dependencia directa con la susceptibilidad de los insectos, la dosis letal media de cada prueba se compara con la dosis letal media de una preparación estándar,

es decir, con preparaciones de Bt conocidas y usadas anteriormente, probada el mismo día y con la misma población de insectos (Tovar et al., 1993).

2.1.7 Bacteriófagos de *Bacillus spp*

2.1.7.1 Generalidades

Los bacteriófagos son virus que infectan células bacterianas, cumpliendo un ciclo de replicación en su interior. Estos virus o fagos, existen como partículas llamadas viriones, los cuales contienen una pequeña molécula de material genético, que dependiendo del fago, puede ser de ADN o de ARN y de cadena simple o de cadena doble. Dicho material es llevado en una cápsula proteica denominada cápside, la cual está hecha de un número específico de subunidades. El fago porta la información genética que codifica la producción de las proteínas de la cápside (Karp, 1996).

Los bacteriófagos se consideran virus complejos, un ejemplo de ello es el bacteriófago T, cuya estructura posee una cápside poliédrica que contiene el ADN, un cuello cilíndrico con el cual el ADN es inyectado dentro de la célula bacteriana y las fibras de la cola, las cuales le permiten adherirse a la superficie bacteriana para provocar la infección; estas fibras le confieren especificidad para infectar las líneas celulares (Figura 7) (Karp, 1996)

Una forma de reconocer los fagos en las líneas celulares es la presencia de placas turbias y/o claras en los cultivos.

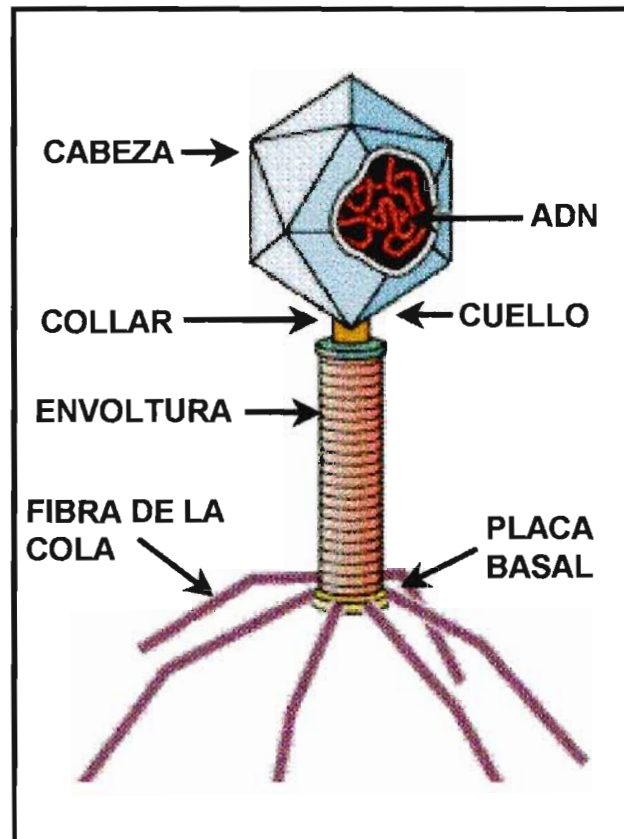


FIGURA 7. Esquema del Bacteriófago T2

2.1.7.2 Ciclo de Replicación

Los bacteriófagos pueden tener dos vías durante su ciclo de replicación (Figura 8) permitiendo clasificarlos de esta forma:

1. Lisogénicos o temperados

Se caracterizan por mantener la infección en la línea celular pasando de una generación a otra. Generalmente insertan su material genético en el genoma de la célula huésped, manteniéndose en forma de profago. En *Bacillus spp.* han sido reportados muchos fagos temperados (Karp, 1996), como se ilustra en la tabla 2.

La importancia de estos fagos radica en su utilidad como herramienta genética, como mediadores de transducción especializada y generalizada y como vehículos potenciales de clonación.

Thorne (1978); Landen et al. (1981) y Heierson et al. (1993), encontraron varios fagos capaces de hacer mediación de transducción generalizada en aislados de Bt y Perlak et al. (1979), describieron cómo un fago puede convertir una línea celular espora-cristal negativa en espora-cristal positiva.

Posteriormente Barsomian et al. (1984), realizaron trabajos donde se utilizaron fagos transductores para realizar enlaces con marcadores genéticos en el cromosoma de Bt y Ruhfel et al. (1984), transfirieron plásmidos entre colonias de *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis* (Todos los autores citados por Reynolds et al., 1988).

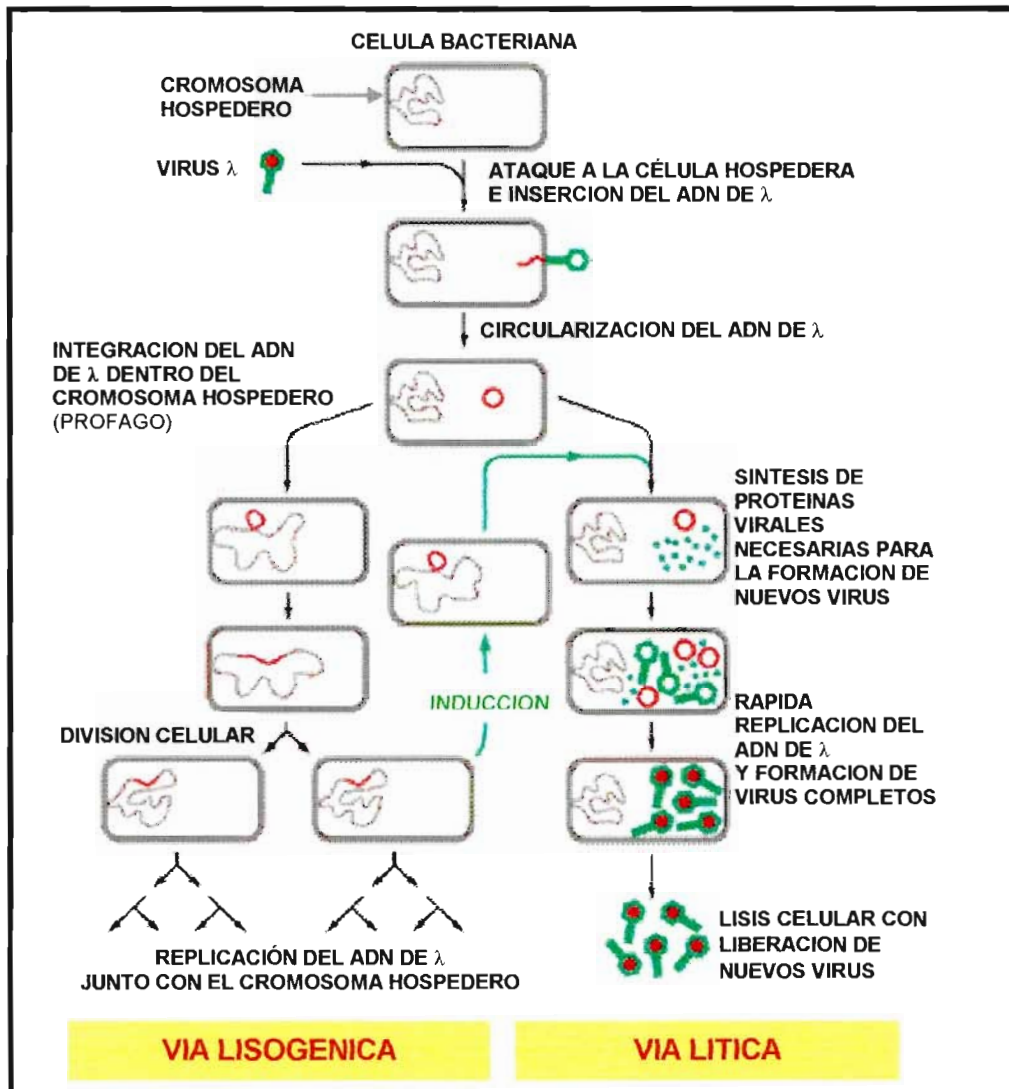


FIGURA 8. Ciclo de replicación del fago Lambda (λ)

TABLA 2. Fagos temperados encontrados en especies de *Bacillus*

NOMBRE DEL FAGO	ESPECIE EN LA QUE SE HA ENCONTRADO	REPORTADO POR
CP-51	<i>B. cereus</i>	Thorne, 1968
TP-15	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	Thorne & Kowalski, 1976
H2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Reynolds et al., 1988
LP-51	<i>B. lincheniformis</i>	Reynolds et al., 1988
CP-55	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	Dean et al. (1978) citado por Slepecky & Hemphill, 1992
SP β	<i>B. subtilis</i>	Dean et al. (1978) citado por Slepecky & Hemphill, 1992
ϕ 3T	<i>B. subtilis</i>	Dean et al. (1978) citado por Slepecky & Hemphill, 1992

Comúnmente se encuentra en las especies de *Bacillus spp.* la capacidad de transducir información genética, hallándose fagos transductores implicados en estos procesos. Estos pueden ser de transducción generalizada, si el fago se inserta en un lugar cualquiera del cromosoma bacteriano y de transducción especializada, cuando tiene un sitio específico de inserción. Entre los fagos compartidos por especies de *Bacillus spp.*, se encuentran SP10, SP15 y PBS1, los cuales pueden hospedarse en *B. subtilis*, *B. lincheniformis* y *B. liquefaciens* (Thorne, 1968).

2. Líticos

Se caracterizan por lizar las células que infectan luego de su multiplicación en el interior de las mismas. Aquellos que infectan especies de *Bacillus*, pueden ser aislados comúnmente de agua o suelo. La importancia de estos fagos ha sido demostrada en su utilización para el estudio de la regulación de la transcripción viral, como es el caso de dos grupos de estos fagos que infectan *B. subtilis*, del grupo 1 están SPO1 y SP82 y del grupo 2 está ϕ 29 (Hemphill & Whitley, 1975 citado por Slepecky & Hemphill, 1992).

2.2 USO COMERCIAL DE LA δ -ENDOTOXINA COMO INSECTICIDA

Los primeros intentos por usar Bt en programas de control de insectos se desarrollaron entre 1925 y 1935, fundamentalmente para el control del barrenador

europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis*, que era una plaga importante en el sur de Europa (Vallejo et al., 1995). Durante las siguientes dos décadas se realizaron extensas pruebas de campo para el control de insectos lepidópteros en Europa y Estados Unidos, dando como resultado que la primera formulación comercial saliera al mercado francés en 1938, bajo el nombre de Sporeine y desde entonces se desarrolló una producción masiva en varios países como la República Checa, Francia, Alemania y la ex URSS. En Estados Unidos, el primer producto comercial se vendió en 1957 bajo el nombre de Thuricide. En estos y muchos otros casos posteriores, las diferentes cepas usadas de país en país y la falta de uniformidad en los productos desarrollados, incidió en la variabilidad y falta de reproducibilidad de los resultados iniciales para el control de plagas (van Frankenhuyzen, 1993 citado por Realpe et al., 1998).

El hallazgo de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* por Dulmage (1970), mejoró significativamente su actividad en condiciones de campo, debido a su alta potencia. La adopción de un sistema internacional que estandarizó la potencia de las preparaciones, introdujo otro punto favorable estableciéndose, en la década de los 80, su producción y uso en el ámbito mundial. En 1986 el volumen de ventas era de 50 millones de dólares, lo cual representa menos del 1% del mercado mundial de insecticidas (Baldwin, 1987 citado por Realpe et al., 1998). En 1993 el mercado de biopesticidas, del cual Bt representa el 98%, era del 6%. Debido a las restricciones inherentes al uso de insecticidas químicos y la eficacia de los biopesticidas, se espera que el mercado de productos basados en Bt, tenga un crecimiento anual entre el 10 y 15% en los próximos 10 años (Menn, 1996 citado por Realpe et al., 1998).

En la actualidad el mercado se dirige principalmente a la producción de tres o cuatro cepas y básicamente al control de insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros. El mercado más importante es el programa de control de insectos en cultivos forestales, donde el Bt ha comenzado a desplazar paulatinamente el uso de insecticidas químicos, llegando a representar el 60% del consumo de insecticidas (Orduz et al., 1997).

Las ventajas del uso de estos bioinsecticidas están en su alta especificidad, lo que permite su utilización hasta fechas cercanas a las cosechas de los cultivos, su aspecto inofensivo para el medio ambiente, la fauna benéfica y demás organismos vivos, incluyendo al hombre (Galán et al., 1995a), adaptable a múltiples tipos de formulaciones, como por ejemplo estimulantes, feromonas, adhesivos que sean más atractivos a los insectos, su no acumulación en las cadenas tróficas, la baja expectativa a desarrollar resistencia en los insectos observados, su almacenamiento prolongado en forma de producto seco y concentrado (Galán & Taméz, 1993) y la alta probabilidad de disminución de los costos de producción debido a los avances tecnológicos, microbiológicos y genéticos, lo que lo hace comercialmente competitivo frente a los insecticidas químicos (Ascencio & Torifio, 1995; Galán et al., 1995c).

A pesar de sus evidentes ventajas ecológicas su empleo se encuentra aún muy limitado en diversos países y particularmente para los pequeños agricultores, debido a que los precios de estos productos resultan altos en comparación con los químicos y al poco conocimiento que las personas tienen sobre su uso y beneficio, ya que las firmas tradicionalmente productoras de químicos se encuentran muy

bien afianzadas y su propaganda supera la de los productos biológicos (Fernández, 1995).

Otras desventajas tienen que ver con la baja persistencia en el medio ambiente, su espectro de huésped reducido, su costo intermedio que aunque no es muy alto, tampoco es bajo y que su actividad tóxica depende de la ingestión, por lo tanto, la actividad de alimentación es vital para su acción y ésta a su vez depende de las condiciones ambientales (Galán & Taméz, 1993; Galán et al., 1995a).

Entre las subespecies de Bt que poseen actividad tóxica conocida contra dípteros son: *aizawai*, *israelensis*, *morrisoni*, *darmstadiensis* y *medellin* (Galán et al., 1995a).

Hasta el momento la utilización comercial de las δ -endotoxinas para el control de dípteros no ha sido enfocada contra larvas de *M. domestica*, desconociéndose publicaciones que reporten actividad insecticida (mortalidad) de dicha toxina en éstas larvas, sólo Indrasith et al. (1992) reporta actividad insecticida proveniente de una cepa de Bt subsp. *kurstaki* (HD1) manipulada en laboratorio, contra adultos de este insecto y en larvas muestra un porcentaje de inhibición de la pupación. El desarrollo de ensayos ha sido realizado con la β -exotoxina que se produce durante la fase vegetativa, con resultados positivos (Arévalo, 1993).

Entre las formulaciones comerciales a base de Bt que pueden adquirirse en el mercado están: Bactospeine, Biobit, Nubilacid, Teknar, Vectobac, Trident entre otras, las cuales tienen espectro de acción contra diferentes órdenes de insectos (Cuadro 4) (Galán et al., 1995a,b).

CUADRO 4. Productos basados en *B. thuringiensis* disponibles comercialmente a nivel mundial

CEPA DE <i>B. thuringiensis</i>	HUESPED	PRODUCTO	COMPAÑÍAS PRODUCTORAS
<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	Bactospeine Bactuside Bernan B.t. Biobit Foray Dipel Delfin Javelin Thuricide Condor Cutlass Larvo B. t. Fermone B. t. MVP* Baturad Nubilacid	Duphar Compagnia di Ricerca Chim Bactec Novo Novo Abbott Sandoz Sandoz Sandoz Ecogen Ecogen Fermone Fermone Mycogen Radonja Radonja
<i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>	Certan	Sandoz
<i>israelensis</i>	<i>Diptera</i>	Bactimos Skeetal Teknar Vectobac Bactis Moskitocid	Duphar Novo Sandoz Abbott Compagnia di Ricerca Chim Radonja
<i>sandiego</i>	<i>Coleoptera</i>	M-One M-One Plus Trident Novodor	Mycogen Mycogen Sandoz Novo
<i>tenebrionis</i>	<i>Coleoptera</i>	Trident Novodor	Sandoz Novo
Conjugado	<i>Lepidoptera</i> / <i>Coleoptera</i> <i>Lepidoptera</i>	Foil Agrree	Ecogen Ciga-Giegy

*Transconjugado de Bt subsp. *kurstaki* y Bt subsp. *aizawai*. Tomado de Galán et al., 1995a

2.3 MOSCA DOMESTICA

2.3.1 Generalidades

Musca domestica perteneciente al orden Diptera, es quizás uno de los insectos mayormente distribuidos en el planeta, ocupando una posición base en la cadena alimenticia. Sus adultos frecuentan los excrementos humanos y los alimentos convirtiéndose en un vector de organismos patógenos, como *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Treponema spp*, etc; y vector de enfermedades de alto riesgo, entre las cuales figuran disentería, tifoidea y cólera.

El ciclo de vida normal de este insecto puede ser de 28 a 30 días dependiendo de las condiciones de temperatura, aumentándose el potencial de crianza durante el tiempo cálido, pasando por una metamorfosis completa y presentando una alta tasa de desarrollo y de huevos producidos por una hembra (aproximadamente 130 en cada postura hasta con 21 periodos de oviposición);

Las larvas de este insecto¹ son ricas en proteínas (18.5%), lípidos, fósforo y vitaminas A y C (Cuadro 5).

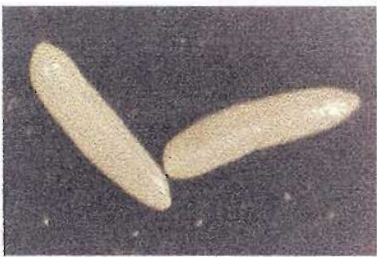
2.3.2 Ciclo de vida y descripción

- **Adultos.**

El cuerpo está dividido en cabeza, tórax y abdomen, siendo el tórax de color gris,

¹ http://ianrwww.uni.edu/ianr/entomol/history_bug/gallery/house_fly_drawing.ht

CUADRO 5. Estados de desarrollo de *Musca domestica* y sus características

ESTADO	CARACTERISTICAS	GRAFICO
HUEVOS	De color blanquecinos, alargados, de 1.2 mm de tamaño, en forma de banano. Son colocados en masa sobre el medio fermentado o el estiércol. El número de huevos producidos está en función del tamaño de la hembra. Eclosionan entre las 8 y 48 horas después de su oviposición.²	
LARVAS	Se pueden diferenciar 3 instares larvales: ▪ El primero y el segundo, cuya duración es de 24 horas. ▪ El tercero que puede ser de 3 o más días. Características de la larva de tercer instar: Son gusanos, blanco-amarillentos, de 11 mm de largo, cilíndricos; mostrando una parte posterior ancha y una parte anterior estrecha. Su cabeza presenta un par de ganchos bucales oscuros para su alimentación En su parte posterior posee los espiráculos para el intercambio gaseoso. Se desplazan por reptación, viéndose favorecido su crecimiento y desarrollo por la humedad del sustrato. Cuando están listas para empupar abandonan el sitio de cría y procuran un lugar seco, prefiriendo temperaturas entre los 30 y 37 C. Normalmente esto ocurre en dos días y el tiempo de duración de larva a pupa es de una semana.³	
PUPAS	Varían de color durante el desarrollo del pupario, desde amarillo, rojo, marrón a negro. Redondeada en los extremos y de 4 a 7 mm de longitud. Posee cuernos respiratorios a lo largo del margen posterior del cuarto segmento. La duración del periodo de pupación es de 3 a 7 días. La mosca adulta joven usa el ptilinum, que le sirve para romper el pupario y emerger. Una vez fuera, las alas que están plegadas en estrechas almohadillas, pueden tardar una hora en llegar a su apariencia común.⁴	

² <http://res.agr.ca/ecorc/apss/fly/house>³ <http://www.garmischa-partenkirchen.com/gesundheitsamt/seuchen/infektionskrankheiten>⁴ <http://parasitology.icb2.usp.br/marcelocp/Musca%20domestica.htm>

con 4 rayas oscuras y anchas ubicadas sobre el dorso. El abdomen tiene lados amarillentos sobre la mitad basal, presentando la porción posterior de color castaño oscuro, además, una línea longitudinal oscura que se extiende a lo largo de la mitad del dorso. Posee un par de alas que le permiten volar hasta 25 Km desde su lugar de nacimiento a una velocidad máxima de 9 Km por hora; en la base del ala se encuentra el halterio, que le ayuda a mantener el equilibrio durante el vuelo. En la cabeza posee un par de ojos compuestos de color rojizo (cada uno tiene 4000 omatidios) que le proyectan una visión amplia y unidireccional.

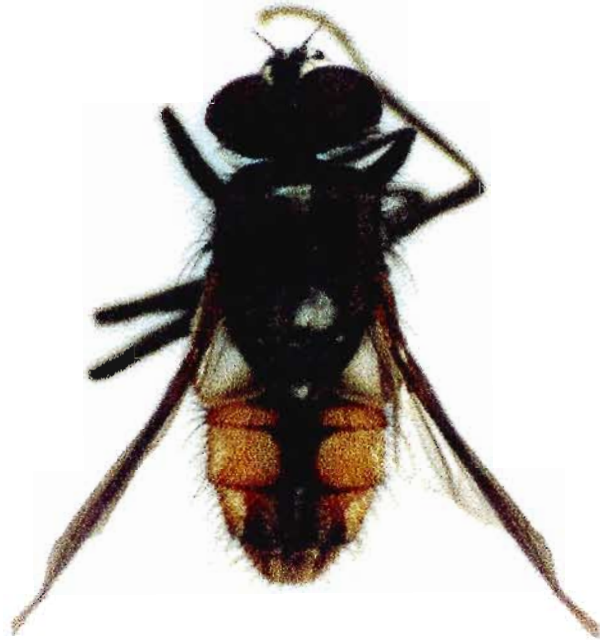
Se alimentan de materiales líquidos utilizando la probóscide y consumen alimentos sólidos por regurgitación salival².

- **Dimorfismo sexual**

Para diferenciar los sexos se deben tener en cuenta las siguientes características:

- El tamaño del macho es de 3 a 5 mm y el de la hembra es de 6 a 7 mm. Aunque esto puede variar dependiendo del desarrollo larvario.
- El abdomen del macho en su parte posterior es amarillento y termina en forma redondeada, mientras el de la hembra es oscuro y termina en forma puntiaguda (Figura 9a y 9b).
- La separación entre los ojos es casi el doble en la hembra respecto a la del macho (Figura 10a y 10b). Esta característica es la mas útil para la diferenciación sexual².

a



b



FIGURA 9. Dimorfismo sexual en *M. domestica*. a. Abdomen del macho amarillento y termina en forma redondeada. b. Abdomen de la hembra oscuro y termina en forma puntiaguda.



FIGURA 10. Dimorfismo sexual en *M. domestica*. **a.** Ojos de la hembra con un doble de separación comparados con los del macho. **b.** Ojos del macho.

BIBLIOTECA UIS

- **Apareamiento**

La reproducción de estos insectos se da sobre estiércol de animales o humanos y desechos vegetales en descomposición y fermentación¹.

Bajo condiciones favorables la hembra puede llegar a ser receptiva 36 horas después de la emersión, apareándose una sola vez en su vida y almacenando los espermatozoides en su spermateca para ser usados en la fertilización progresiva de sus huevos.

Durante el proceso de la cópula la hembra muestra resistencia agresiva dando como resultado el desgaste de las alas del macho. Posteriormente al apareamiento ocurre la postura, donde la hembra permanece cerca al sitio de cría y los machos, por lo general, emigran³.

2.4 APLICACIONES O PERSPECTIVAS EN EL USO DE *B. thuringiensis*

Actualmente los avances en técnicas de ingeniería genética de plantas y ADN recombinante, han mostrado claras posibilidades para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan una utilización más eficiente de Bt. La reducida utilidad de esta bacteria contra organismos que se alimentan en el interior de los tejidos vegetales y otros inconvenientes como la rápida sedimentación de las toxinas en los criaderos, en cepas tóxicas contra mosquitos, han concentrado esfuerzos en el desarrollo de organismos transgénicos. La transferencia de genes del Bt a cepas no homólogas de éstas, para combinar la expresión de proteínas tóxicas con el propósito de producir efectos aditivos o sinérgicos o para expandir el rango de

acción de las toxinas y la transferencia a baculovirus, con el propósito de mejorar la actividad del *B. thuringiensis* sobre el huésped y de acelerar la muerte del insecto, son claros ejemplos. Esto se ha realizado con métodos que van desde la electroporación hasta la conjugación, obteniéndose con este último método, el primer bioinsecticida transconjugante que ha recibido licencia de comercialización en Estados Unidos, bajo el nombre de Foil y que tiene actividad contra insectos de los órdenes Lepidoptera y Coleoptera (Ordúz et al., 1997).

También se han transformado bacterias endofíticas como *Clavibacter xyli*, como medio para colocar las toxinas de Bt en el interior de los tejidos de maíz y *Pseudomona fluorescens*, con el fin de mantener la toxina en las hojas de las plantas más protegidas de la radiación ultravioleta (Ordúz et al., 1995).

Con base en las características de expresión de los genes *cry*, se ha intentado producir las toxinas de *B. thuringiensis* en *Escherichia coli* (Ge et al., 1990 citado por Realpe et al., 1998); también mediante ingeniería genética se han tratado de diseñar cepas de *B. thuringiensis* con combinaciones de genes diferentes haciendo uso de vectores de clonación bifuncionales o mediante transducción mediada por bacteriófagos específicos (Janniére et al., 1993, Lecadet et al., 1992 citados por Realpe et al., 1998). Los resultados han sido muy variables y las dificultades radican sobre todo en la forma de regulación de los genes *cry*, puesto que hasta ahora solo se han encontrado en plásmidos de gran tamaño y de bajo número de copias; este tipo de plásmidos no se replica por el mecanismo usual de círculo rodante asimétrico (modelo de Cairns para colifagos filamentosos de banda simple) característico de los plásmidos de bacterias Gram positivas, lo cual ha exigido el desarrollo de sofisticados vectores de clonación que portan los orígenes

de replicación de plásmidos endémicos de Bt (Bron, 1990, Lereclus, 1988 citados por Realpe et al., 1998).

Los genes de las proteínas tóxicas de Bt también se han constituido en una poderosa herramienta para conseguir plantas resistentes a insectos plaga utilizando técnicas de biología molecular, siendo ésta una de las estrategias más avanzadas para el control de plagas, la producción de plantas transgénicas que expresan estos genes foráneos de resistencia.

De ésta manera se brindan oportunidades para aumentar la persistencia de las toxinas de *B. thuringiensis* en el medio, con la consecuente ventaja de la protección de los tejidos vegetales, independientemente de los factores climatológicos. La transformación y expresión de los genes de Bt en cultivos comerciales de algodón (1990), papa (1990), tomate (1987 y 1989), tabaco (1987) y maíz (1992) han dado como resultado plantas más resistentes al ataque de sus principales plagas, según pruebas de laboratorio y de campo (De la riva et al., 1995; Eborá & Sticklen, 1995).

En Colombia el desarrollo de esta técnica representa una valiosa alternativa para la erradicación de plagas de cultivos, sin utilizar el control químico que perjudica al ecosistema. El estudio y manipulación de los sistemas de expresión de esta bacteria puede tener importantes repercusiones biotecnológicas, ya sea en la sobreproducción de algunas otras toxinas de importancia industrial o en la producción de δ -endotoxinas, que puedan representar una permanencia mucho mayor en el ambiente (Bravo, 1995b).

A pesar de la variabilidad de proteínas Cry descritas hasta ahora, es necesario seguir investigando por más toxinas, ya que un número significativo de plagas no son controladas con las proteínas disponibles hasta ahora. El aislamiento de colonias endémicas de Bt, con posible actividad tóxica contra mosca doméstica, permitirá ampliar el rango de acción de éstas toxinas y se convertirá en el primer paso para la aplicación de los avances científicos que conlleven a una mayor eficiencia de éstas cepas en la solución de problemas, referentes a los daños causados por este tipo de vectores de enfermedades.

En Santander, la zona de la Mesa de los Santos presenta altos niveles poblacionales de mosca doméstica, que perturban la tranquilidad de sus pobladores y aportan significativos riesgos de propagación de enfermedades no solo al hombre, sino también a los animales de cría. Por esta razón escogimos la zona para el aislamiento de cepas endémicas de Bt. Esta región tiene un gran atractivo turístico por su paisaje, clima y ambiente apacible. Junto a las fincas de recreo, también se ha expandido la instalación de gran cantidad de granjas avícolas y ganaderas lo que le ha otorgado un gran desarrollo a la región y la ha convertido en generadora de empleo y fuente importante de ingresos. Esta zona se encuentra ubicada al nordeste del Departamento de Santander, a una distancia de 26 Km. de Bucaramanga sobre la carretera que comunica esta ciudad con Santafé de Bogotá, en el sector denominado Los Curos, en sentido norte-sur, se desvía a la derecha para tomar la vía que conduce a la Mesa de los Santos. Se accede por una vía totalmente pavimentada. Tiene la forma de una elipse y su extensión aproximada es de 15500 Ha. Su altura es de 1700 m.s.n.m y su

temperatura promedio fluctúa entre 19 y 21 C (temperatura máxima 28 C y mínima 14 C). Adicionalmente, en su temperatura influyen de manera importante los vientos que la cruzan en diferentes direcciones y que son corrientes de aire moderadamente frías y en ocasiones templadas, que permiten que el clima se mantenga sin variaciones extremas durante el día, pero que originan resequedad en la superficie del suelo. En términos generales la Mesa de los Santos es una altiplanicie con algunos sectores ondulados. Por sus propias singularidades se encuentra dividida en tres sectores. El primero es la zona más plana de la Mesa con poca arborización y algunos bosques aislados, el segundo presenta algunas irregularidades por donde corren quebradas que permiten construir embalses para almacenamiento de agua y el tercero presenta el aspecto de una leve colina rocosa casi sin vegetación (Palacio, 1999).

Agrológicamente los suelos de la región se caracterizan por su acidez, situación que dificulta su utilización para el desarrollo de cultivos. Sin embargo, en algunas zonas con buenos tratamientos, se presentan predios con aptitudes agrícolas y dependiendo del sector las características del suelo presentan diferencias (Palacio, 1999).

La avicultura se destaca como la principal actividad económica de esta zona, pero a la vez se ha constituido en el foco principal del aumento de poblaciones de *M. domestica*, en parte debido a la inadecuada utilización de los desechos que produce esta labor, ya que la gallinaza al permanecer expuesta al sol y las lluvias atrae las moscas, quienes encuentran allí las condiciones ideales para reproducirse. Esto, sumado a la insuficiencia de soluciones al problema de basuras generado por la población de la zona, ha convertido a la mosca en un

basuras generado por la población de la zona, ha convertido a la mosca en un problema en aumento. Por lo tanto se requiere una acción por parte de los centros de investigación de la región, para generar soluciones que permitan apoyar programas de control en las poblaciones de este insecto, basados en la búsqueda de alternativas como la obtención de nuevos aislados de Bt y de nuevas toxinas insecticidas.

En este mismo sentido, deben proveerse alternativas para el problema de resistencia en insectos, especialmente con respecto a la expresión de genes Bt para proteínas insecticidas en plantas transgénicas. La resistencia desarrollada por los insectos a este tipo de insecticidas biológicos, está mediada fundamentalmente por cambios en el receptor de la toxina en las células del intestino medio del insecto. Se han propuesto alternativas que van desde la búsqueda de nuevos genes insecticidas a los que los insectos resistentes sean susceptibles, hasta sembrar plantas transgénicas junto con plantas normales, y desarrollar plantas transgénicas con promotores que controlen la expresión de las proteínas Cry de manera diferencial y sólo durante la época en que el cultivo es más susceptible al ataque de insectos (Ordúz et al., 1997).

De las colecciones descritas hasta ahora, solo una, reportada por Bernhard et al. 1998, incluye muestras de América Latina. Solo el 5% de estas muestras viene de Sur América (Bravo et al., 1998).

Como se ilustró en los párrafos anteriores, la utilidad de Bt es invaluable; sin embargo los pocos ingresos obtenidos por el uso de insecticidas biológicos, en

comparación con los obtenidos por insecticidas químicos, no proveen un incentivo fuerte a la industria para hacer las inversiones necesarias en la investigación y desarrollo de nuevos agentes de control biológico, trayendo como consecuencia que la producción de estos bioinsecticidas sea costosa y así esté limitada su distribución y utilización. Por lo tanto es claro que el desarrollo de nuevos insecticidas que sean seguros, eficaces y competitivos, requiere extensas investigaciones en muchas áreas básicas y una inversión decidida.

Con la realización de este proyecto se pretende dar inicio a la investigación en la línea de *Bacillus thuringiensis* en la Universidad Industrial de Santander como una respuesta de los centros de investigación a los problemas fitosanitarios del departamento, bajo la perspectiva de generar soluciones que no perturben el equilibrio ambiental, abriendo paso al desarrollo de nuevos agentes de control de insectos.

3. METODOLOGIA

3.1 AISLAMIENTO DE CEPAS DE *B. thuringiensis*

3.1.1 Area de muestreo

La Mesa de los Santos se encuentra dividida en tres sectores de acuerdo a las características topográficas y al tipo de suelos de la zona: el primer sector abarca desde la vía de acceso a la Mesa hasta la quebrada La Honda; el segundo se extiende hacia el sur hasta las quebradas La Fuente y La Arenosa, tiene menor extensión y mayor altura que el anterior; y el tercer sector se encuentra localizado al occidente de las quebradas La Fuente y La Arenosa hasta el municipio de Los Santos (Palacio, 1999).

El área principal de muestreo cubrió básicamente la zona comprendida entre la finca El Moral y el sitio llamado La Fuente, abarcando los dos primeros sectores (Anexo 1).

3.1.2 Colección de muestras de suelo

Las muestras fueron tomadas con la ayuda de palas pequeñas y almacenadas en bolsas plásticas nuevas; cada muestra contaba con un peso aproximado de 100 g

y fue extraída a una profundidad de 5 a 10 cm. En casos en los cuales existía en el suelo una gruesa capa de hojarasca o humus, éstas eran removidas. Algunas muestras fueron tomadas de árboles caídos en descomposición y restos vegetales.

3.1.2.1 Sitios de muestreo

- Inicialmente se ubicaron las fincas con problemas de superpoblación de *M. domestica*, zonas donde se utiliza gallinaza y lugares cercanos a porquerizas y establos de ganado.
- Posteriormente se tomaron muestras de terrenos cercanos a la carretera principal y al borde de algunas fincas.
- Finalmente se tomaron muestras de bosques pequeños intervenidos y poco intervenidos.

3.1.2.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron teniendo en cuenta algunos parámetros citados por Ascencio & Torifio (1995), de la siguiente manera:

- Rotulación e identificación de cada muestra relacionándola con los datos de campo obtenidos (Figura 11).
- Secado a temperatura ambiente (24 C) durante 2 días, en un sitio seco y no soleado, protegidas contra insectos voladores y rastreros.

Fecha :				Número de ficha:	
LOCALIZACION					
Finca:				Vereda:	
Municipio:				Departamento:	
CARACTERISTICAS FISICAS					
Temperatura:				Clase de suelo	
Vocación del terreno					
OBSERVACIONES					
COLECTOR					

FIGURA 11. Hoja de vida de las muestras recolectadas

- Almacenamiento en bolsas plásticas nuevas con su correspondiente etiqueta.

3.1.3 Microorganismos de referencia

Según su uso se dividen en 4 grupos: 1. Para identificación macro y microscópica. 2. Para utilización en biología molecular y bioensayo. 3. Para pruebas bioquímicas. 4. Para la infección con el fago (Tabla 3).

3.1.4 Aislamiento de colonias endémicas

Los procedimientos realizados se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones asépticas en los laboratorios de la Escuela de Bacteriología y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la UIS. Para el aislamiento de colonias tipo Bt se utilizó el método descrito por Travers et al (1987), basado en la incapacidad de las esporas de Bt para germinar en presencia de ciertas concentraciones de acetato de sodio; esta metodología se describe a continuación con algunas modificaciones hechas para adaptarla a las condiciones de los laboratorios.

Fase 1: SELECCION CON ACETATO DE SODIO – CHOQUE TERMICO

Cada muestra fue pesada y macerada, colocándose 500 mg en el medio selectivo con Acetato 0.25 M (Tabla 4), luego se prosiguió como se describe en la Figura 12.

TABLA 3. Microorganismos utilizados como controles en la caracterización macro y microscópica de los aislamientos nativos, Inmunoblotting, pruebas bioquímicas e infección con el fago.

MICROORGANISMO	MARCADOR (FORMA DEL CRISTAL)	REFERENCIA Y ORIGEN	UTILIZACION
<i>B. thuringiensis</i>	Romboidal	Bt <i>darmstadiensis</i> , CIB – Medellín	PB – IB – Bioensayo - Fago
<i>B. thuringiensis</i>	Amorfo	Bt <i>morrisoni</i> PG-14, CIB – Medellín	PB – IB – Bioensayo
<i>B. thuringiensis</i>	ND	Bt <i>toumanoffi</i> , CIB – Medellín	PB – IB – Bioensayo- Fago
<i>B. thuringiensis</i>	Redondeado	Bt <i>israelensis</i> 1884, CIB – Medellín	Morfología – IB - PB - Fago
<i>B. thuringiensis</i>	Redondeado	Bt <i>israelensis</i> 1884, UNAL – Bogotá	Morfología - IB
<i>B. thuringiensis</i>	Redondeado	Vectobac – Laboratorio ABBOTT	Morfología - IB
<i>B. thuringiensis</i>	Bipiramidal	Bt – CINBIN – Piedecuesta	Morfología
<i>B. thuringiensis</i>	Bipiramidal	Bt nativo – A. Rueda -- Bucaramanga	Morfología
<i>B. subtilis</i>	NP	ATCC	IB – Fago
<i>Escherichia coli</i>	NP	BACT – UIS	IB

ND : No disponible; NP : No produce; ATCC : American Tipe Culture Collection; IB : Inmunoblotting; PB : Pruebas bioquímicas

TABLA 4. Medios* para cultivo de *B. thuringiensis*

INGREDIENTES	CANTIDAD/LITRO	CONCENTRACION FINAL
L broth		2X
NaCl	20 g	
Extracto de Levadura	10 g	
Triptona	10 g	
Agar Luria Bertani (LB)		1X
NaCl	10 g	
Extracto de Levadura	5 g	
Triptona	10 g	
Agar-agar	15 g	
L broth Acetato (CLA)		1X
NaCl	20 g	
Extracto de Levadura	10 g	
Triptona	10 g	
Acetato de Sodio	20.6 g	
Medio T3		1X
NaCl	3 g	
Extracto de Levadura	2 g	
Triptona	1.5 g	
MnCl	5 mg	
Fosfato de Sodio pH 6.8	6.9 g	
Agar-agar	15 g	
Agar Trípico de Soya (TSE)		1X
Peptona de soya	5 g	
NaCl	5 g	
Extracto de levadura	1.5 g	
Agar-agar	15 g	
HCO		1X
KH ₂ PO ₄	6.8 g	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	12 mg	
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	14 mg	
MnSO ₄ . H ₂ O	1.6 mg	
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	28 mg	
CaCl ₂ . 4 H ₂ O	110 mg	
Bacto triptona	7 g	
Glucosa	3 g	
Ajustar el pH a 7.2 con KOH 3N		

*Los medios se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 121 C y 15 libras de presión.

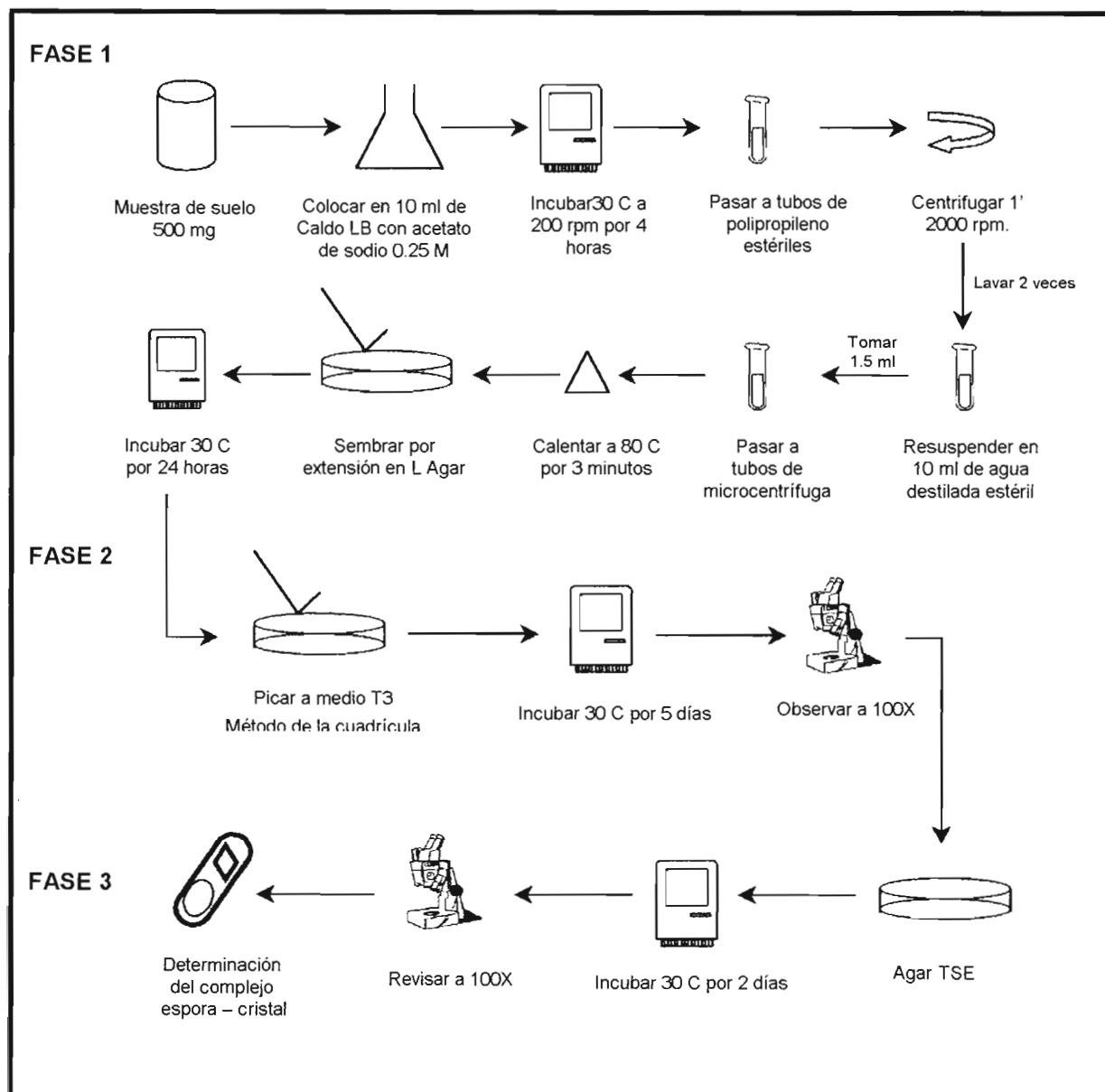


FIGURA 12. Metodología usada para el aislamiento e identificación microscópica de colonias tipo Bt. 1. Exposición de la muestra a caldo selectivo con Acetato de sodio. 2. separación de colonias por tinción diferencial con verde de malaquita. 3. Revisión de las colonias en Agar TSE para determinación final de complejo espora-cristal.

Fase 2: ESPORULACION Y DETERMINACION MORFOLOGICA

Todas las colonias predominantes y con morfología de *Bacillus spp.* presentes en cada caja de cultivo, fueron repicadas con un palillo de madera estériles a cajas con medio de esporulación T3 (Tabla 4), utilizando el método de la cuadrícula (Miller, 1992). Posteriormente se prosiguió a incubar hasta esporulación (Figura 12).

Para determinar la presencia o ausencia de cristal paraesporal se utilizaron la tinción diferencial de Wirtz y la tinción violeta-safranina/OH (Tabla 5). La visualización de las bacterias también fué realizada en solución salina estéril; en todos los casos se observó a microscopio de luz con objetivo de inmersión 100X y algunas veces en microscopio de contraste de fase. Se tomo registro fotografico de las observaciones macroscopicas con una cámara Canon EO5/500, y microscopico con un fotomicroscopio ZEISS Axiolab con cámara MC80 con objetivo ZEISS Achrolab.

Fase 3: REVISION FINAL

Todas las colonias formadoras de spora fueron repicadas para una última revisión selectiva de cristal, a medio Agar TSE (Tabla 4), según lo propuesto por Kablin et al., 1994. La revisión de las colonias se desarrolló como se expone en la Figura 12.

3.1.5 Conservación de los aislados de *B. thuringiensis*

TABLA 5. Tinciones utilizadas para la visualización de las células y cristales paraesporales de Bt

TINCION	TIEMPO
Gram	
Violeta de Gensiana	1 min
Lugol	1 min
Alcohol-acetona	10 seg
Lavado con agua	30 seg
Safranina	30 seg
Wirtz-Conklin	
Verde de malaquita 5 % en agua	10 seg
Calentar la lámina	3 a 6 min (hasta aparecer bordes rojos)
Safranina 0.5 %	30 seg
Violeta – Safranina / OH	
Violeta de Gensiana	1 min
Safranina de Wirtz – Conklin	1 min

Para conservar las colonias aisladas de Bt se utilizaron dos métodos:

- **Stock de esporas** Este método consistió en sembrar las colonias purificadas tipo Bt en medio de esporulación T3 en tubo inclinado; incubando durante 5 días a 37 C, tiempo luego del cual se recogió el crecimiento con 10 ml de agua deionizada estéril; transfiriendo con pipeta el contenido de la suspensión a tubos de vidrio (18 X 116), tapa rosca, estériles; finalmente fueron llevados a baño de María a 60 C por 30 minutos para aplicar choque térmico que permitió destruir las formas vegetativas y que persistieran únicamente las formas esporuladas. Finalmente se almacenaron a 4 C (Guaracao, A. I. Comunicación personal).
- **Tiras de papel de filtro** Partiendo del stock de esporas se tomaron 40 μ l y se sembraron en círculos o tiras de papel de filtro estériles (Wathman 3), se llevaron al horno a 37 C en cajas de Petri estériles cerradas hasta que se evaporó el contenido del líquido, posteriormente se guardaron en papel aluminio estéril, debidamente rotulados y se almacenaron en lugares frescos y secos (Guaracao, A. I. Comunicación personal).

3.2 CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE Bt

3.2.1 Electroforesis de proteínas

Para determinar la presencia de las proteínas del cristal y su peso molecular aproximado, se realizó un perfil electroforético de proteínas con suspensiones de

espora-cristal de las cepas endémicas aisladas y de los controles positivos, utilizando el método descrito por Laemmli (Tablas 6 y 7) (Sambrook et al., 1989). Bt subsp. *israelensis* 1884 (CIB), Bt subsp. *darmstadiensis* (CIB), Bt subsp. *morrisoni* (CIB) y Bt subsp. *toumanoffi* (CIB), fueron tomados como controles positivos y *B. subtilis* como control negativo (Tabla 3). Se utilizó el marcador de peso molecular para proteínas MID-RANGE (Protein Molecular Weight Markers) de Promega, de 97.4 a 14.4 KDa, como patrón para comparar los pesos moleculares de las proteínas.

Las cepas endémicas aisladas y los controles se hicieron crecer en medio HCO líquido según Abarca et al., (Citado por Reguero et al., 1994) y en medio T3 sólido según Travers et al (1987) (Tabla 4), hasta alcanzar una esporulación máxima, es decir, cuando se observó que ya no permanecían formas vegetativas, sino esporas y cristales, lo cual se consideró el 100% aproximado de producción de cristales.

Se probaron dos temperaturas de esporulación para cada medio, a 30 y 37 C para determinar la más adecuada para alcanzar el máximo de esporulación en menos tiempo.

Las cepas se examinaron por microscopía de luz con tinción violeta-safranina/OH en objetivo de 100X (Tabla 5), para comprobar la esporulación y producción de cristales en cepas endémicas y controles positivos y en todos los casos examinar posible contaminación.

TABLA 6. Soluciones para electroforesis de proteínas

SOLUCIONES	STOCK
	g/100 ml
Solución 1	
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	18.15
Solución 2	
30% Acrilamida	30
0.8% Bisacrilamida	0.8
Solución 3	
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	6
	g/L ó ml/L
Tampón para electroforesis	
50 mM Tris-HCl	6 g
384 mM Glicina	28.8 g
0.1% Sodio Dodecil Sulfato (SDS) pH 8.3	1 g
Solución de coloración	
0.25% Azul de Coomassie	2.5 g
50% Metanol	500 ml
10% Acido acético	100 ml
Solución de decoloración	
5% Metanol	50 ml
7% Acido acético	70 ml

TABLA 7. Gel SDS-PAGE 9% según Laemmli

SOLUCIONES	VOLUMEN
Gel de separación 9%	
Agua destilada	4.5 ml
Solución 1	3.75 ml
Solución 2	4.5 ml
10% SDS	0.15 ml
10% Persulfato de Amonio (APS)	75 μ l
TEMED	7.5 μ l
Gel de concentración 6%	
Agua destilada	2.67 ml
Solución 2	1 ml
Solución 3	1.25 ml
10% SDS	50 μ l
10% APS	25 μ l
TEMED	6 μ l
Buffer Laemmli	
Solución 4	250 μ l
50% Glicerol	250 μ l
10% SDS	400 μ l
β -Mercaptoetanol (MET)	100 μ l
1% Azul de Bromofenol	10 μ l

Para la preparación de extractos de proteína, se usó el método para *B. thuringiensis*. (Arámbula, A. L. Comunicación personal) (Figura 13).

Después de concentrar las células se agregó 1 ml de agua destilada y 7 μ l de Fenil Metil Sulfonil Flúor (PMFS) 100mM, se resuspendieron en vórtex y se centrifugaron a 6.000 rpm por 8 minutos, descartándose el sobrenadante.

Con el sedimento mantenido en hielo se lavó con agua destilada estéril tres veces, en el último lavado se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las proteínas con el residuo de agua en vórtex.

Dependiendo de la cantidad de material recolectado y del tamaño del cristal de cada cepa, se adicionó 1:1 v/v (muestra + Tris 50 mM a pH 10 + buffer de carga).

Se sometieron a calentamiento a 100 C por 3 minutos, se centrifugó por un pulso de 10.000 rpm. por 3 segundos y se corrieron en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 9% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando una cámara para electroforesis de proteínas CBS MGV-202 conforme las instrucciones del fabricante.

3.2.2 Inmunoblotting

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia de proteínas CBS EBU-202, manejada según especificaciones del fabricante (Tabla 8) y la eficiencia de transferencia se confirmó por coloración del gel con azul de Coomasie.

Posteriormente, las proteínas se sometieron a inmunodetección con un anticuerpo

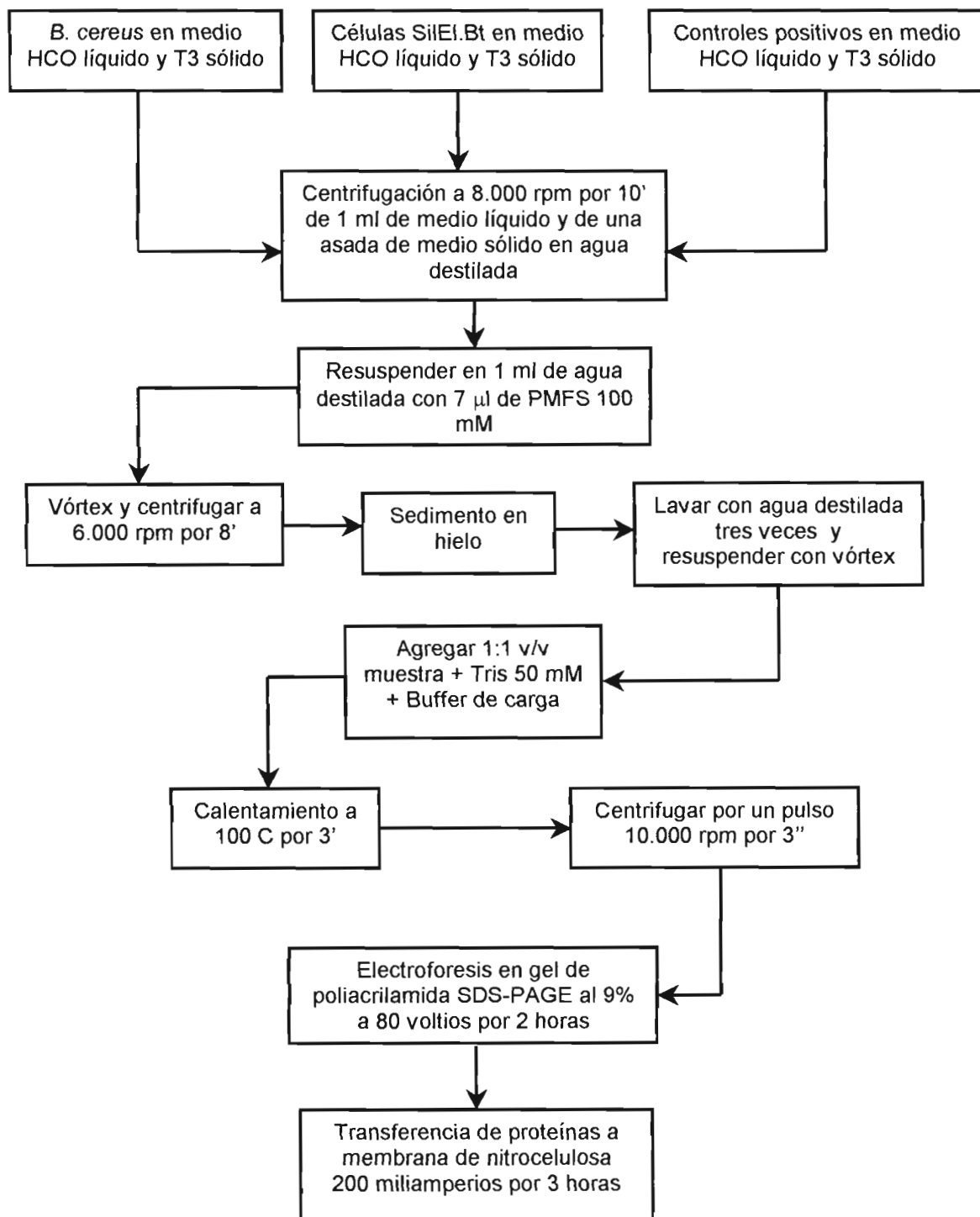


FIGURA 13. Preparación de extractos de proteínas y resolución en geles SDS-PAGE 9%, según Laemmli.

TABLA 8. Soluciones para Immunoblotting

SOLUCIONES	VOLUMEN
Buffer Towbin	1L
25 mM Tris-HCl	3 g
192 mM Glicina	14.4 g
TBS	50 ml
20 mM Tris-HCl	121 mg
150 mM NaCl	
TBST	50 ml
20 mM Tris-HCl	121 mg
50 mM NaCl	
0.05% Tween	25 μ l
1% BSA en TBST	50 ml
1% (w/v) Blot-Qualified BSA en TBST	500 mg
Guayacol+Peróxido de hidrógeno	40 ml
Buffer fosfato 10 mM	39.9 ml
Guayacol	90 μ l
H ₂ O ₂	20 μ l

primario policlonal, constituido por anticuerpos generados en ratón, contra las proteínas totales del cristal de Bt subsp. *israelensis* (Donación de Sergio Orduz, CIB, Colombia) y se agregó un anticuerpo secundario conformado por una antiinmunoglobulina G de ratón, producida en ovino y marcada con peroxidasa (ProtoBlot Western Blot Sistema AP. Promega) (Figura 14).

3.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS

La determinación bioquímica se realizó de dos formas:

- Para Arginina Dehidrolasa (ADH), Ureasa, Sacarosa y Esculina, se utilizó BBL Crystal, Gram positivos/GP; según las especificaciones de la casa comercial Becton Dickinson.
- Para Voges Proskauer, Lecitinasa, Producción de Catalasa, Caseína, Hemólisis en agar sangre, Oxidasa, Reducción de Nitrato, Producción de ácido a partir de Glucosa, Hidrólisis de Almidón, Catalasa, Crecimiento en NaCl al 7% y Crecimiento anaeróbico, como lo indican Finegold & Martin, 1983.

3.4 BIOENSAYOS

3.4.1 Adecuación de Jaulas

Las jaulas fueron suministradas por la sección de entomología de la Escuela de Biología de la UIS; estas son cajas con armazón y fondo de madera, forradas a

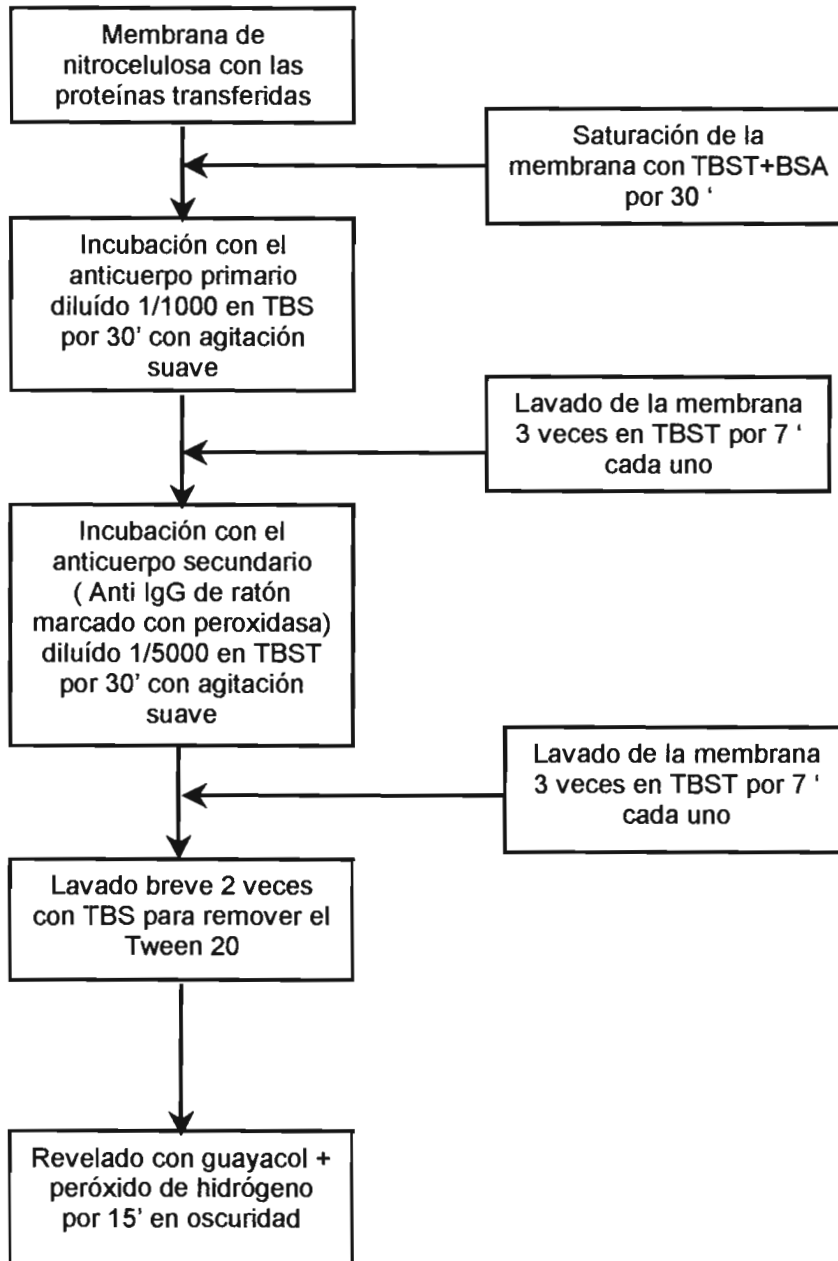


FIGURA 14. Inmunoblotting para los aislamientos de *B. thuringiensis*

los lados por malla de alambre de poro mediano y poseen una manga de tela por la cual se manipulan los insectos. Dichas jaulas fueron lavadas, secadas y sobreforradas con muselina blanca (Figura 15).

Para la colocación del medio de oviposición (Tabla 9), se usaron platos de icopor pintados con vinilo negro, con el fin de resaltar el color de las larvas facilitando su manipulación (Figura 16) y recipientes de plástico con tapa de malla y plástico.

Para la alimentación de las larvas se utilizó un medio sencillo que provee carbohidratos y proteínas (Tabla 9); éste fue depositado en cajas de Petri y en cajas de icopor. El agua fue servida en pequeños vasos plásticos transparentes y éstos colocados por inversión en cajas de Petri con fondo de algodón, de manera tal que el agua se liberara gradualmente (Figura 17).

3.4.2 Captura de insectos

La captura de adultos de *M. domestica* se realizó en instalaciones de una avícola, ubicada en la Mesa de los Santos - Santander. Para esta labor se utilizaron redes entomológicas y bolsas plásticas; estas últimas fueron infladas para evitar que los insectos se asfixiaran o maltrataran. Posteriormente los adultos capturados se trasladaron de forma rápida al Laboratorio de Biología Molecular de la UIS, sección invernadero y fueron ubicados en las jaulas de madera previamente adecuadas (Figura 18).

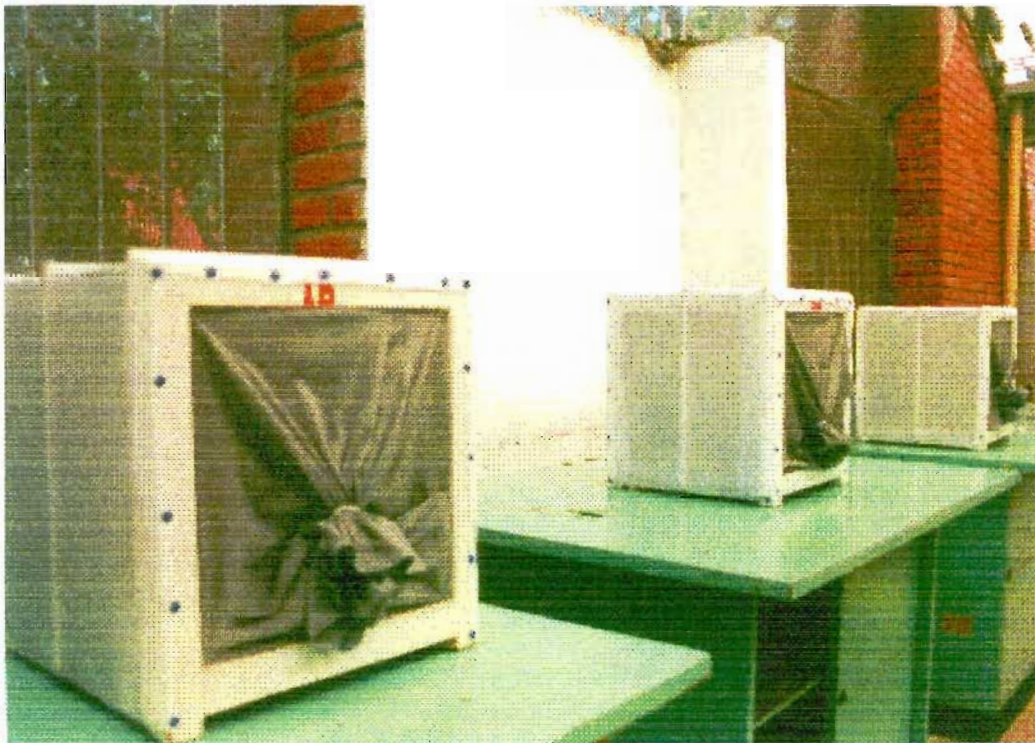


FIGURA 15. Jaulas para el mantenimiento de *M. domestica*



FIGURA 16. Medio de oviposición utilizando platos de icopor pintados de negro

TABLA 9. Medios utilizados en la cría de *M. domestica* para el bioensayo

MEDIO	INGREDIENTES
OVIPOSICION (MOv)	Mezcla de salvado de trigo y agua El salvado de trigo debe quedar humedecido
ALIMENTACION (MA)	Mezcla en partes iguales de panela de caña de azúcar triturada o rallada y leche en polvo



FIGURA 17. Medio de alimentación y suministro de agua para *M. domestica*



FIGURA 18. Jaulas con *M. domestica*.

3.4.3 Aclimatación

Los adultos de *M. domestica* fueron alimentados y observados durante 6 días. Los sobrevivientes adaptados a las nuevas condiciones de vida, se utilizaron en el ensayo de desarrollo (EnDes).

3.4.4 Ensayo de Desarrollo (EnDes).

Algunos parámetros establecidos para el cuidado y crianza de *M. domestica* en esta metodología, están basados en un estudio preliminar realizado en poblaciones de este insecto en Bucaramanga por estudiantes de la materia Biología del Desarrollo, de la Escuela de Biología de la U.I.S, (Bertel. M Comunicación personal.)

Partiendo de la población aclimatada a las condiciones de laboratorio, se escogieron 44 individuos, de los cuales el 50% eran machos y el otro 50% hembras. Para la selección de los insectos se utilizaron los parámetros de dimorfismo sexual citados en la literatura. Se tomaron fotografías para evidenciar estas diferencias, con un cámara Canon EO5.

Una vez colocados en la jaula, se introdujo el MOv (Tabla 9), contándose este día como el número 1 del EnDes.

Obtenidos los primeros huevos, se retiraron los platos con MOv y se trasladaron a una jaula aparte para su cuidado. Cada día era revisado el estado de humedad del MOv y el abastecimiento de agua de los adultos, igualmente cada día se procedió a mezclar este medio para evitar el desarrollo excesivo de hongos.

Al alcanzar el día 5, y por la facilidad de manipulación, las larvas fueron censadas y pasadas a cajas plásticas con tapa de malla y plástico (Figura 19). La finalización del EnDes estuvo determinada por el nacimiento del ultimo adulto de la F1.

Conociendo los porcentajes de supervivencia en cautiverio de estas camadas y conociendo los porcentajes de supervivencia referenciados por Bertel. M. (Comunicación personal), se procedió a desarrollar el ensayo preliminar de toxicidad (EPT).

3.4.5 Ensayo preliminar de toxicidad (EPT)

El objetivo principal de éste, fue detectar el posible efecto tóxico de los aislados caracterizados como Bt, en una población conocida de larvas de *M. domestica*.

3.4.5.1 Desarrollo del EPT

Inicialmente se prepararon los cultivos bacterianos para la liofilización; procediéndose a liofilizar según la metodología utilizada en el Laboratorio de Alimentos de la U.I.S, sede Guatiguará. Con el liofilizado obtenido se realizaron 2 diluciones de cada una de las líneas celulares bacterianas en estudio, usando agua destilada estéril como solvente, en concentraciones de 0,5 mg/ml y 1 mg/ml (Indrasith et al., 1992).



FIGURA 19. Cajas plásticas y platos de icopor con medio de oviposición para el mantenimiento de larvas.

Se inoculó al MOv que contenía 20 larvas de *Musca domestica* de 2-4 días de eclosionadas (Figura 20), colocando 2 réplicas por cada aplicación y utilizando un control negativo (sin Bt.). A las 24 horas se realizó la lectura de mortalidad.

3.4.5.1.1 Preparación de cultivos de *B. thuringiensis* para liofilización

Para la liofilización de las cepas de Bt se siguieron los siguientes pasos:

- Se tomó una asada de la cepa pura en cultivo sólido y se inoculó en 10 ml de medio líquido T3. Se incubó con agitación a 250 rpm por 24 horas a 30 C.
- Se incorporó el inóculo, previamente incubado, a 500 ml de medio líquido T3. Se dejó a una agitación de 250 rpm a 30 C hasta esporulación y producción de cristal paraesporal.
- Se agregó 1 μ l de Metil Fenil Sulfonil Fluor (PMFS) 100 mM, por cada ⁶ ml de medio.
- Se recogió el medio en tubos de polipropileno estériles y se centrifugó a 5.000 rpm hasta sedimentación de las bacterias.
- El precipitado se lavó con agua destilada estéril 3 veces.
- Por último la biomasa recolectada se conservó a -20 C.
- Partiendo de cultivos sólidos que llegaron al 100% de esporulación, previa revisión microscópica, se raspó con rastrillo de vidrio la superficie del agar, lavando con 3 ml de agua destilada estéril.
- Se recogió todo el crecimiento de la caja usando pipetas estériles.



FIGURA 20. Larva de *M. domestica* seleccionado para el ensayo preliminar de toxicidad (EPT). Se usaron larvas de un tamaño entre 2 y 6 mm.

- Se guardó en tubos de polipropileno, agregando 1 μ l de PMFS 100mM por cada ml de agua presente en el tubo y se procedió a lavar como en el caso anterior.
- Los medios sólidos usados fueron T3 y Agar LB.

3.4.5.1.2 Liofilización de cultivos de *B. thuringiensis*

- Se descongeló a temperatura ambiente la biomasa colectada.
- Se vertió subsecuentemente en balones de 1000 ml, balones de 250 ml o 100 ml y en viales de vidrio de 3 ml.
- Se congeló la muestra utilizando hielo seco y acetona al 100%, tratando de que esta quedara pegada alrededor de las paredes del recipiente usado.
- Los recipientes se colocaron en el liofilizador Frezee Dry System / freezone 4.5. Labconco, hasta obtener la biomasa libre de líquido.
- Para recoger el liofilizado se utilizó una varilla de vidrio y se guardaron en tubos de polipropileno o viales de vidrio estériles con su respectivo rótulo.

3.4.5.1.3 Preparación de las diluciones

- Se pesó la cantidad de muestra necesaria para preparar cada dilución, recogiéndola en tubos de polipropileno estériles.
- Se agregó agua destilada estéril y se agitó (eventualmente con vórtex) hasta su disolución.

DIS
BIBLIOTECA

3.4.5.1.4 Inoculación de las diluciones de Bt al MOv (MOv-Bt)

- Se tomaron 20 larvas de 2-3 días de *M. domestica*, se depositaron en recipientes de icopor pintados de negro al cual se le adicionó MOv fermentado.
- Se inocularon 5 ml de las suspensiones de liofilizado bacteriano (0,5 mg / ml y 1 mg / ml) a las larvas seleccionadas. La profundidad del MOv no fue menor de 2 cm, para asegurar el enterramiento de las larvas. Esto corresponde aproximadamente a 14 g. de salvado de trigo humedecido previamente con agua. Las cajas se mantuvieron tapadas con otra caja igual, pintada de negro y con pequeños poros para el paso de aire.
- Se ensayaron 2 réplicas por cada prueba y por cada dilución, usando la misma población de larvas, utilizando como control negativo larvas en MOv sin Bt.
- Las líneas celulares usadas para el EPT fueron SiEI.Bt 26, 27, 67, 88 y Bt. *darmstadiensis* (CIB) como posible control positivo (Ordúz, S. Comunicación personal).
- La lectura de mortalidad se realizó a las 24 horas, teniéndose en cuenta larvas vivas y muertas y determinándose como larvas vivas, cualquiera que tuviera movimiento al ser punzada por una aguja de disección.

3.5 AISLAMIENTO DE UN BACTERIOFAGO PRESENTE EN EL AISLADO SiEI.Bt 26 E INFECCION DE OTRAS LINEAS CELULARES (Según BGL of Massachusetts, 1989)

3.5.1 Aislamiento del fago

- Con palillos de madera estériles se tomaron de 3 a 5 placas presentes en el medio de cultivo, cortando el medio alrededor de la placa.
- Este material se depositó en tubos de vidrio tapa rosca que contenían de 3 a 5 ml de agua peptonada estéril al 1% (Tabla 10) .
- Se agitó con vórtex durante 3 min. para homogenizar la suspensión.
- Se agregó en cada tubo 100 μ l de cloroformo por cada ml de agua peptonada y se agitó fuertemente, dejando reposar entre 3 y 5 min.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min.
- Se filtró el sobrenadante usando filtro Millipore 0.45 μ m.
- El filtrado se almacenó en tubos de vidrio tapa rosca estériles y éste corresponde a la suspensión de fagos libre de células bacterianas.

3.5.2 Infección de líneas celulares con el fago de SiEI.Bt 26

- Se empleó la técnica de siembra en doble capa, utilizando una primera capa de NSA sólido y una segunda capa de NSA blando (Tabla 10)
- El agar blando se mantuvo en estado líquido en tubos de vidrio estériles de 13 por 100 en baño de agua entre 45 y 50 C (punto de fusión del agar), colocando 3 ml de medio NSA blando por cada tubo.
- A este medio se le adicionó la línea celular a infectar y el fago, en cantidades de 100 μ l cada uno.

TABLA 10. Medios nutritivos usados en el aislamiento del fago SiEI.Bt 26 y en la infección de líneas celulares.

INGREDIENTES	CANTIDAD/LITRO	CONCENTRACION FINAL
Agar Lambda (Aλ)		1X
Tryptona	10 g	
NaCl	2.5 g	
Agar-agar	15 g	
Aλ Blando		1X
Tryptona	10 g	
NaCl	2.5 g	
Agar-agar	6 g	
Agua peptonada		1X
Peptona	10 g	
Agua destilada	1000 ml	
Medio R *		1X
Bactotripton	10 g	
Extracto de levadura	1 g	
NaCl	8 g	
Medio Agar R *		1X
Bactotripton	10 g	
Extracto de levadura	1 g	
NaCl	8 g	
Agar-agar	12 g	
Medio Agar R-blando *		1X
Bactotripton	10 g	
Extracto de levadura	1 g	
NaCl	8 g	
Agar-agar	6 g	
Caldo caso	30 g	1X
Agar Nutritivo Salino (NSA)		1X
Caldo nutritivo	8 g	
NaCl	4 g	
Agar-agar	15 g	
NSA Blando		1X
Caldo nutritivo	8 g	
NaCl	4 g	
Agar-agar	7.5 g	

Todos los medios fueron autoclavados a 15 presiones durante 15 minutos.

* Después de autoclavar se les adicionó 2 ml de CaCl₂ 1M y 5 ml de glucosa 20 %

- Se mezcló para garantizar la homogeneidad y el contacto de las células con el fago.
- Se vertió en el medio NSA seco (Tabla 10) y atemperado (37 C), cubriendo completamente la superficie del medio sólido.
- Se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- Se incubó a 37 C por 24 horas.
- Para visualizar claramente la formación de placas, se realizaron siembras individuales de la suspensión del fago sin diluir y de una serie de diluciones en agua peptonada al 1%, 10^{-1} hasta 10^{-4} , las cuales se procesaron como se describió anteriormente.
- Para el cultivo de las líneas celulares a infectar, se usó Caldo Nutritivo Salino (CNS) y Caldo Caso (CC) (Tabla 10) y se prosiguió como se describe a continuación:
- Se tomó 1 asada por cada ml de caldo (si se parte de un cultivo sólido) o 100 μ l de caldo inicial por cada ml de caldo a inocular (si se parte de un cultivo líquido) y se inoculó en 3 a 5 ml de caldo de crecimiento (CNS o CC).
- Se agitó suavemente y se dejó a 37 C durante 14 a 18 horas. Se debe verificar la pureza de los cultivos iniciales.

4. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO DE CEPAS ENDEMICAS DE *B. thuringiensis*

4.1.1 Area de muestreo

De las 55 muestras procesadas, 13 fueron tomadas en el primer sector y 42 en el segundo sector. Las muestras representaron los sitios característicos de la geografía de la Mesa de los Santos. El aislamiento de Bt se produjo de la selección hecha a tres muestras de suelo, las cuales pertenecían al segundo sector. De la muestra # 20, se aislaron dos cepas de Bt, con características microscópicas diferentes (Cuadro 6).

La obtención de Bt se dio en lugares con buena humedad y una capa de humus entre los 2 y 5 cm. En aquellos sitios en los cuales la capa vegetal era pobre y las condiciones de humedad eran muy bajas o excesivamente altas, no se aisló ninguna muestra de Bt.

De las 55 muestras procesadas, 15 fueron tomadas de zona boscosa, donde 3 muestras resultaron positivas para Bt (Cuadro 6), lo que representa un 5.45% del total de muestras procesadas y un 20% de las tomadas en zona boscosa.

CUADRO 6. Ubicación y características de las muestras de suelo positivas para aislados de Bt

MUESTRA DE SUELO	AISLADO DE Bt	CARACTERISTICAS	LUGAR
20	SilEl.Bt 26 SilEl.Bt 27	Terreno húmedo de color negro cubierto de pasto, bajo la sombra de árboles.	Entrada a la finca La Caseta. Segundo sector.
41	SilEl.Bt 67	Bosque poco intervenido con una capa de humus de 2 a 3 cm de grosor	A 500 m de la escuela la Esperanza, a 90° Este, entrando por la cerca a pocos metros. Segundo sector.
47	SilEl.Bt 88	Bosque, junto a un tronco caído. Capa de humus de 3 a 4 cm de espesor	Dentro del bosque, a 300 m de la cerca de entrada. Segundo sector.

4.1.2 Aislamiento de colonias endémicas

- **Fase 1: Selección con acetato de sodio - choque térmico**

En esta fase se seleccionaron 125 colonias de 55 muestras analizadas, por presentar las morfologías coloniales más predominantes y más parecidas a las descritas para Bt.

- **Fase 2: Esporulación y determinación morfológica**

De los 125 aislados endémicos incubados bajo condiciones favorables de nutrientes y temperatura en medio de cultivo sólido T3, 3 desarrollaron la morfología colonial típica de Bt, representando un elemento de valor para su identificación dentro de este género. Las características macroscópicas de estos 3 aislados endémicos corresponden con las descritas en la literatura para Bt (Cuadro 7) (Figura 21).

La revisión microscópica se realizó utilizando coloración de Wirtz y violeta - safranina/OH (Tabla 5). Las 125 colonias seleccionadas en la Fase 1 correspondían a morfologías del tipo *Bacillus* spp con esporas subterminales o terminales que no deforman el cuerpo del bacilo.

Microscópicamente tres aislados endémicos se describieron como *B. thuringiensis* por mostrar: formas vegetativas bacilares de tamaño mediano a grande; extremos

CUADRO 7. Descripción de la morfología colonial de los aislados endémicos de Bt

CARACTERISTICA	DESCRIPCION
Tamaño	Grande
Forma	Plana De borde irregular Lobulado y/o arborescente
Superficie	Rugosa
Consistencia	Blanda
Aspecto	Opaco, mate
Pigmento	Blanco cremoso
Hemólisis en Agar sangre	Beta

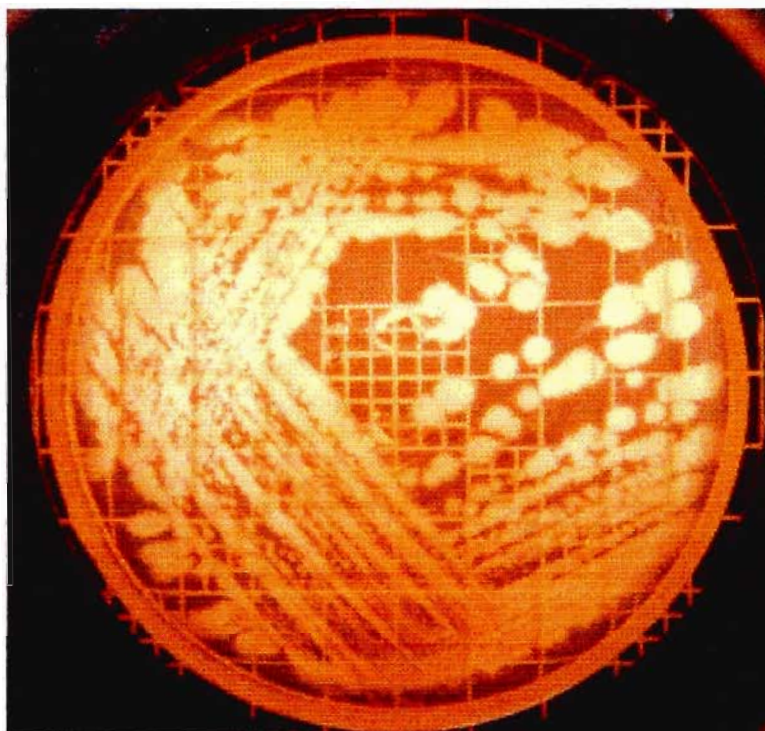


FIGURA 21. Características macroscópicas de Bt en medio T3.

redondeados y formación de cadenas; presencia de espora en posición subterminal que no deforma el cuerpo del bacilo y producción de inclusiones cristalinas con diferentes formas, adyacentes a la espora.

Las colonias fueron denominadas SilEI.Bt 26, SilEI.Bt 27 y SilEI.Bt 67 (Figura 22 y 23a). Estas inclusiones se describen morfológicamente en la Tabla 11.

La utilización de medio T3 como inductor de esporulación para las 125 colonias seleccionadas en la Fase 1, permitió observar presencia de espora entre el tercer y quinto día después de la inoculación del medio de cultivo.

La aparición del cristal paraesporal se evidenció utilizando la coloración de Wirtz (figuras 22 y 23a) y violeta-safranina/OH (Cuadro 8).

- **Fase 3: Revisión final**

Esta fase permitió examinar de forma concluyente los aislados endémicos, encontrando que una de las colonias que inicialmente no mostró el complejo espora-cristal en los días determinados para su revisión, lo produjo posteriormente utilizando el medio TSE (Tabla 4). El aislado fue denominado SilEI. Bt 88 y su origen, caracterización macro y microscópica se observan en los cuadros 6, 7 y 8 y en la tabla 11 (Figura 23b).

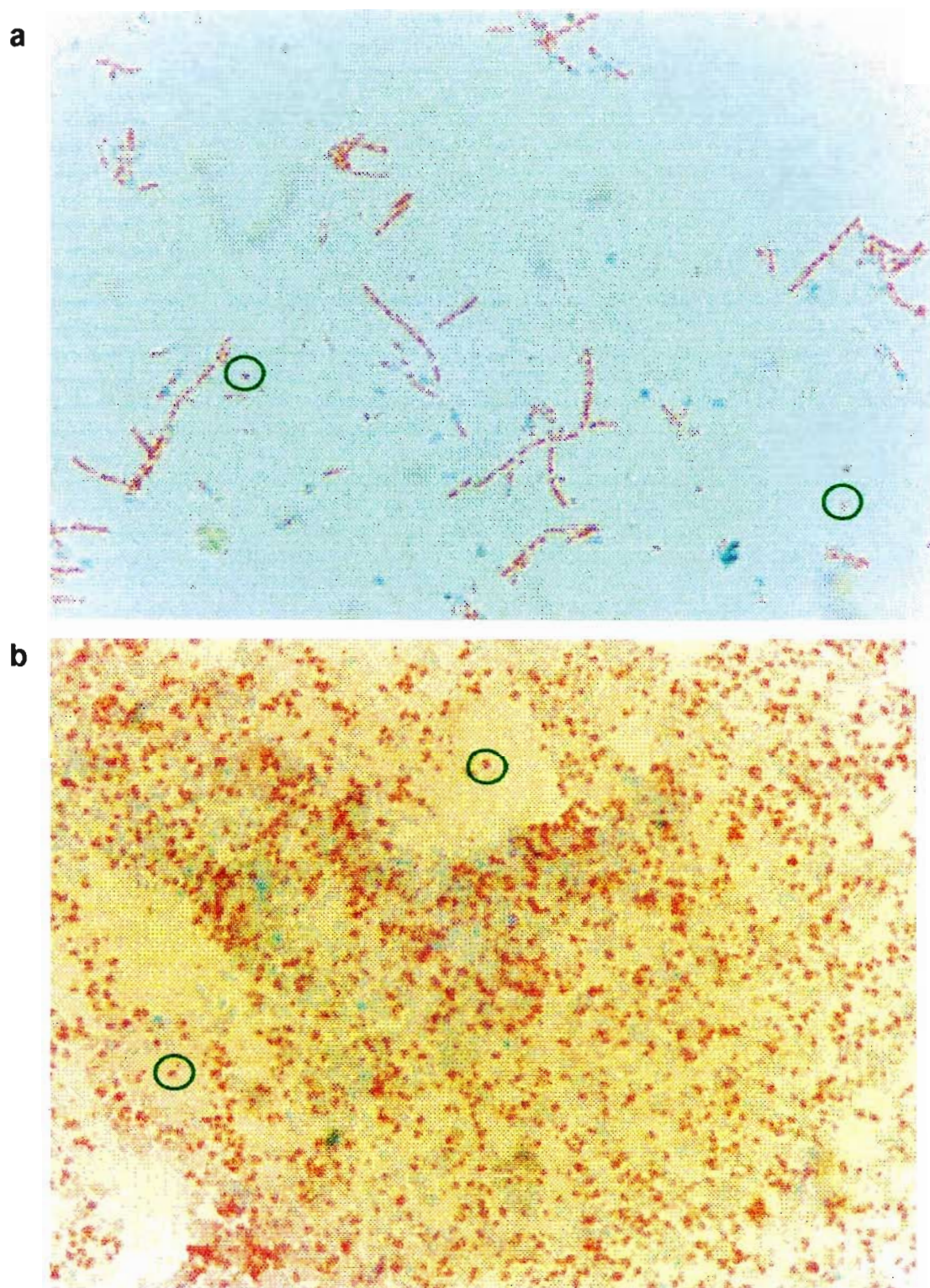


FIGURA 22. Morfología microscópica de los aislados SiEI.Bt 26 **(a)** y SiEI.Bt 27 **(b)**, utilizando coloración de Wirtz. En los círculos se observan los cristales de forma bipiramidal.

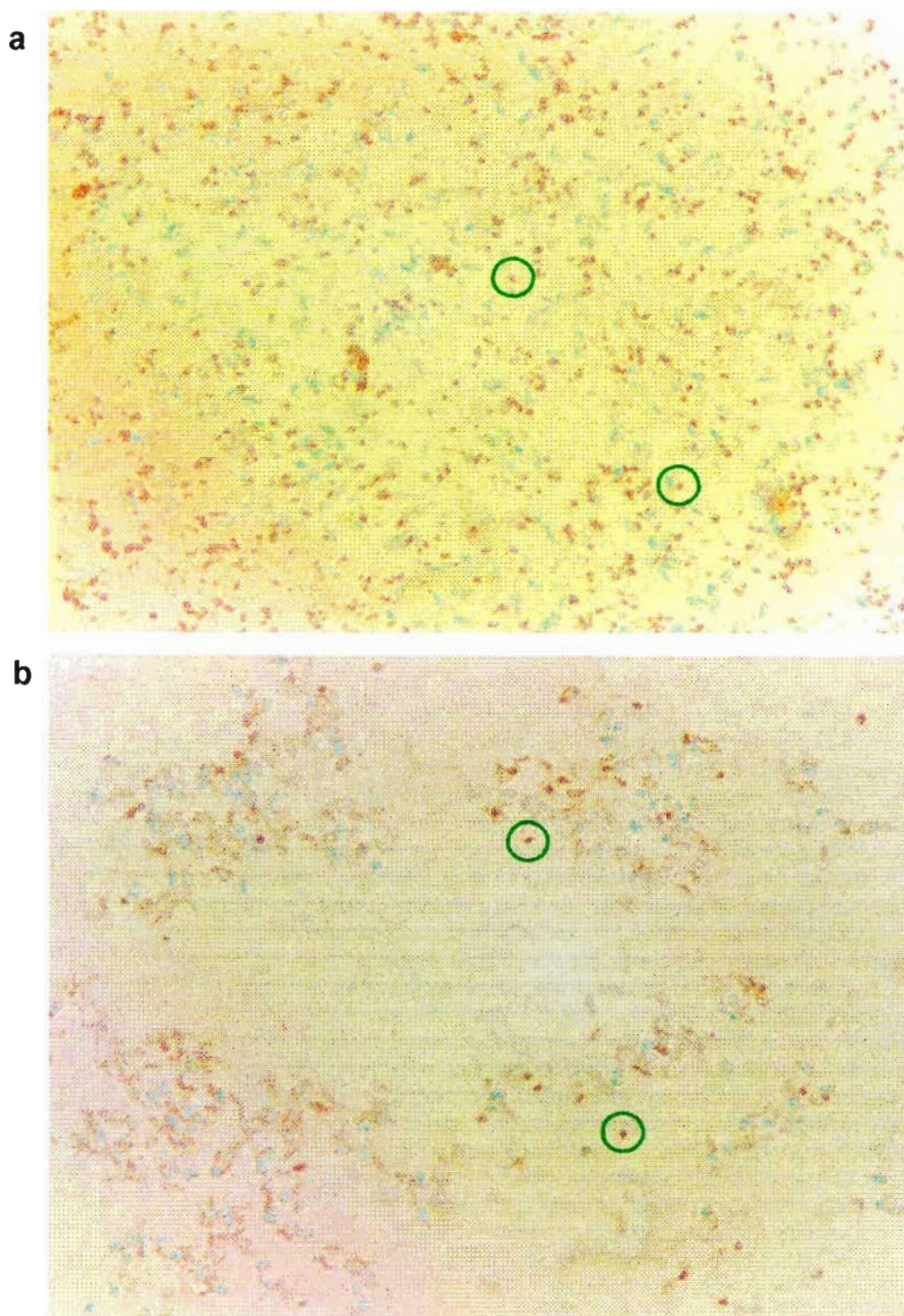


FIGURA 23. Morfología microscópica de los aislados SilEI.Bt 67 **(a)** y SilEI.Bt 88 **(b)**, utilizando coloración de Wirtz. En los círculos se observan los cristales de forma romboide para SilEI.Bt 67 y ovoide para SilEI.Bt 88.

La foto SilEI. Bt 26 (a) se tomó con un filtro para microfotografía de alto contraste.

TABLA 11. Características morfológicas de las inclusiones cristalinas de los aislados endémicos de Bt

AISLADO NATIVO	FORMA DEL CRISTAL	DESCRIPCION GENERAL
		Del tamaño de la espora.
SilEI.Bt 26	Bipiramidal	La resolución del microscopio de luz a 100X permite observar una estructura única a manera de un cristal bipiramidal, con una incrustación angulosa en una de sus caras, que es cuatro veces más pequeño que el bipiramidal y se sugiere que es cuboidal. Al parecer esta morfología puede corresponder al doble cristal de Bt subsp. <i>kurstaki</i> HD -1 basado en Carton (1988, citado por Glazer et al., 1995).
SilEI.Bt 27	Bipiramidal	Más grande que la espora
SilEI.Bt 67	Romboidal	Del tamaño de la espora
SilEI.Bt 88	Ovoide	Casi tan grande como la espora

CUADRO 8. Control de la formación de cristales de los aislados endémicos de *B. thuringiensis*

AISLADOS*	DIAS DE CRECIMIENTO									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SilEI. Bt 26				◆						
SilEI. Bt 27			◆							
SilEI. Bt 67					◆					
SilEI. Bt 88									◆	

*Medio T3 sólido; ◆ aparición de cristales.

4.1.3 CONSERVACION DE LOS AISLADOS ENDEMICOS

4.1.3.1. Stock de esporas

Los aislados morfológicamente caracterizados como *Bacillus* spp. pasaron a formar parte del cepario de la Escuela de Bacteriología de la UIS (BACTUIS).

4.1.3.2 Tiras de papel de filtro

Usando este sistema de conservación quedaron en cepario de BACTUIS, 96 aislados incluyendo los identificados morfológicamente como Bt.

4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS ENDÉMICOS DE *B. thuringiensis*

4.2.1 Electroforesis de proteínas

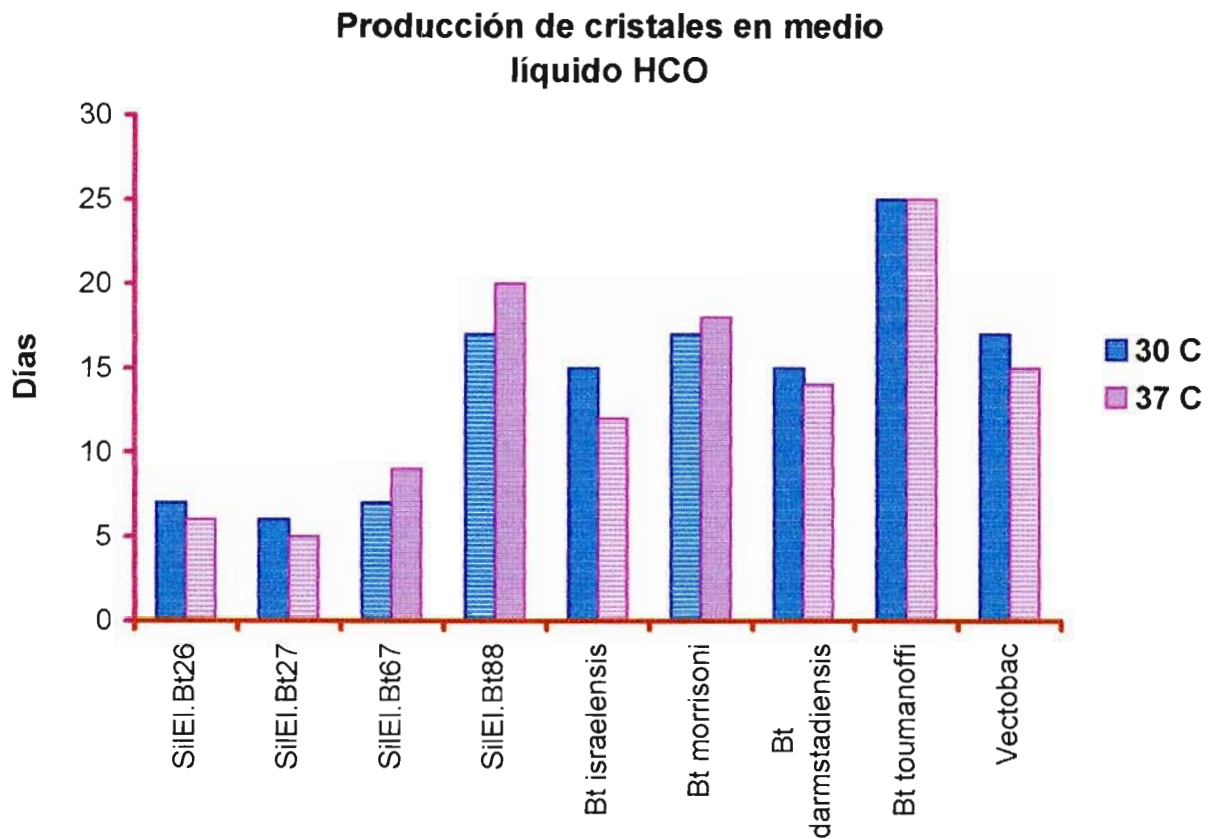
Para la realización de las electroforesis de proteínas, los aislados SilEI.Bt y los controles positivos y negativo, se inocularon en medio líquido HCO y en medio sólido T3, para determinar en cuál de los dos medios se obtenía un mejor perfil electroforético. Además se probaron dos temperaturas de esporulación, a 30 y 37 C. La temperatura más adecuada para cada aislado fue aquella en la cual alcanzaba en menos tiempo su máxima producción de cristales, tomándose como

la condición el cultivo sin formas vegetativas, sino esporas y cristales en abundancia, lo cual se consideró como un 100% de producción de cristales.

Al utilizar HCO líquido como medio de esporulación, no se alcanzó el máximo de producción de cristales en ninguna de las cepas. En este medio se observó la persistencia de esporas y células vegetativas hasta el momento de realizar el aislamiento de proteínas. La producción máxima de cristales en este medio, se calculó en un 80% aproximadamente.

En comparación con el medio HCO, el medio T3 presentó una esporulación del 100% en todas las cepas, con excepción del control positivo Bt subsp. *toumanoffi*, que no alcanzó una producción de cristales del 100% en ninguno de los dos medios utilizados. Bt subsp. *toumanoffi*, mostró una producción muy baja de cristales y la persistencia de gran cantidad de bacilos sin esporular, condición que permanecía constante a partir del día 18. En comparación con las cepas que producían cristales en un 100%, la producción de estas se calculó entre un 40 a 60% aproximadamente. En este caso se esperaron 5 días y se observó que la esporulación y producción de cristales se mantuvo en las mismas condiciones, y se procedió a preparar el extracto de proteínas. Después de sucesivos repiques, Bt subsp. *toumanoffi*, no presentó producción de esporas y cristales.

Al utilizar como temperatura de esporulación 37 C en medio HCO, 6 cepas alcanzaron en menos tiempo su máximo de producción de cristales. Solo la cepa nativa SilEI.Bt 67 y los controles positivos Bt. subsp. *morrisoni* y Bt subsp. *toumanoffi*, utilizaron menos tiempo pero a temperaturas de 30 C en este medio (Grafica 1). En medio sólido T3, igualmente 6 cepas produjeron el máximo de cristales en menos tiempo a 37 C y 3 cepas a 30 C, pero se observó que la colonia



GRAFICA 1. Condiciones de temperatura y tiempo empleadas en cultivos en medio HCO para la preparación de extractos de proteína bacteriana. Las columnas rayadas indican la temperatura en la cual se incubó la cepa hasta la preparación del extracto de proteínas; la producción de cristales fue inferior al 100%.

SilEI.Bt 88, alcanzó en menos tiempo su máximo de producción a 30 C y el control Bt subsp. *toumanoffi* llegó al máximo de producción a 37 C (Gráfica 2). La temperatura a la cual se mantuvieron la mayor parte de las cepas fue 37 C en ambos tipos de medios.

El análisis electroforético de proteínas aisladas de los cultivos de cepas endémicas y controles en medio HCO, mostró gran cantidad de bandas que corresponden a proteínas totales de la bacteria.

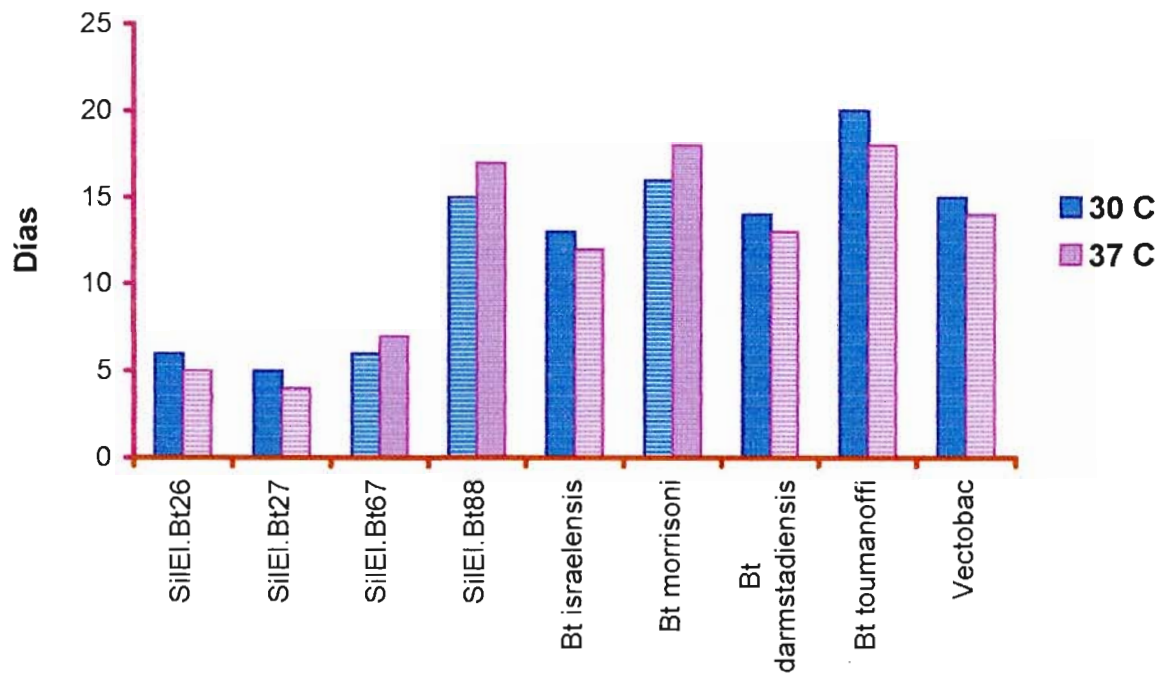
Las 4 cepas SilEI.Bt presentaron bandas en un rango entre 130 y 20 KDa. Estos pesos corresponden al rango de peso molecular de las proteínas del Bt citados en la bibliografía (Orduz et al., 1994; Thiery et al., 1997). Las bandas que comparten están ubicadas a 130, 125, 70, 60, 45, 35, 33 y 28 KDa aprox. (expresión menor 125 y 97)

El control positivo utilizado *israelensis* CIB, mostró un patrón de bandas que corresponde con lo citado en la bibliografía (Orduz et al., 1994; Thiery et al., 1997), exhibiendo bandas a la altura de 125, 97, 70, 68, 60, 50, 45, 35, 29 y 28 KDa (Figura 24).

El resultado de las otras cepas *israelensis* usadas como controles positivos, mostró que a pesar de presentar bandas con los mismos pesos moleculares que la anterior, el nivel de expresión de las proteínas no era la misma.

En la cepa *israelensis* (UNAL) la expresión de algunas proteínas era mayor que en la cepa de la CIB, e.g., las ubicadas a 35 y 28 KDa, igualmente en la cepa *israelensis* aislada del producto comercial Vectobac la expresión fue mayor en las bandas ubicadas a 95 y 30 KDa.

Producción de cristales en medio sólido T3



GRAFICA 2. Condiciones de temperatura y tiempo empleadas en cultivos sobre medio T3 para la preparación de extractos de proteína. Las columnas rayadas indican la temperatura en la cual se incubó la cepa hasta la preparación del extracto de proteínas.

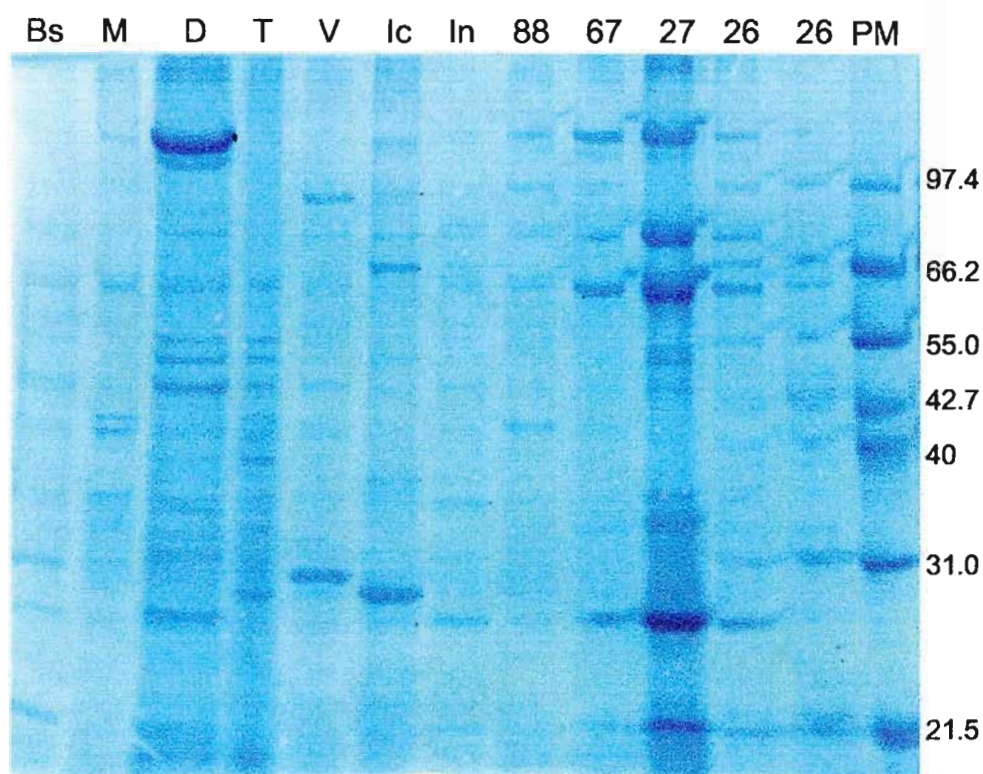


FIGURA 24. Electroforesis de proteínas de los aislados SiEI.Bt y controles, en medio HCO líquido. **Bs**, *B. subtilis*, **M**, Bt subsp. *morrisoni*; **D**, Bt subsp. *darmstadiensis*; **T**, Bt subsp. *toumanoffi*; **V**, Vectobac; **Ic**, Bt subsp. *israelensis* (CIB); **In**, Bt subsp. *israelensis* (UNAL); **88**, **67**, **27** y **26**, aislados endémicos; **MP**, marcador de proteínas.

Los demás Bt no *israelensis* mostraron bandas con pesos correspondientes a los del control positivo *israelensis* CIB como la de 125, 70, 60, 50, 45 y 28 KDa.

En la cepa *darmstadiensis* la banda ubicada a 130 KDa muestra una sobreexpresión de esta proteína.

A la altura de los 97 KDa, los aislamientos SilEI.Bt 26, 67 y 88 mostraron la presencia de una banda, que en el caso de la cepa SilEI.Bt 27 es ligeramente visible. El aislado SilEI.Bt 26 presentó una banda a la altura de los 42 y 68 KDa. El aislado SilEI. Bt 88 presenta además, algunas bandas únicas, como las ubicadas a los 43, 34 y 26 KDa, y la ausencia de otras como la de 20 KDa presente en las otras tres cepas aisladas.

En el medio sólido T3, el análisis electroforético de proteínas presentó menos bandas que en el medio HCO. Se observaron bandas comunes en los 4 aislados de SilEI.Bt a los 130, 60, 50 y 42 KDa (Figura 25).

En el control positivo *israelensis* CIB se observó el mismo patrón de bandas visto en la electroforesis utilizando medio HCO, pero con una expresión mucho menor.

El resultado de la cepa *israelensis* (UNAL), mostró un patrón semejante en las bandas en comparación con *israelensis* CIB con diferencias en la expresión.

La banda ubicada a 35 KDa muestra una expresión mayor y la ubicada a 28 KDa una expresión igual.

La cepa *israelensis* aislada de Vectobac mostró una expresión muy baja de sus proteínas.

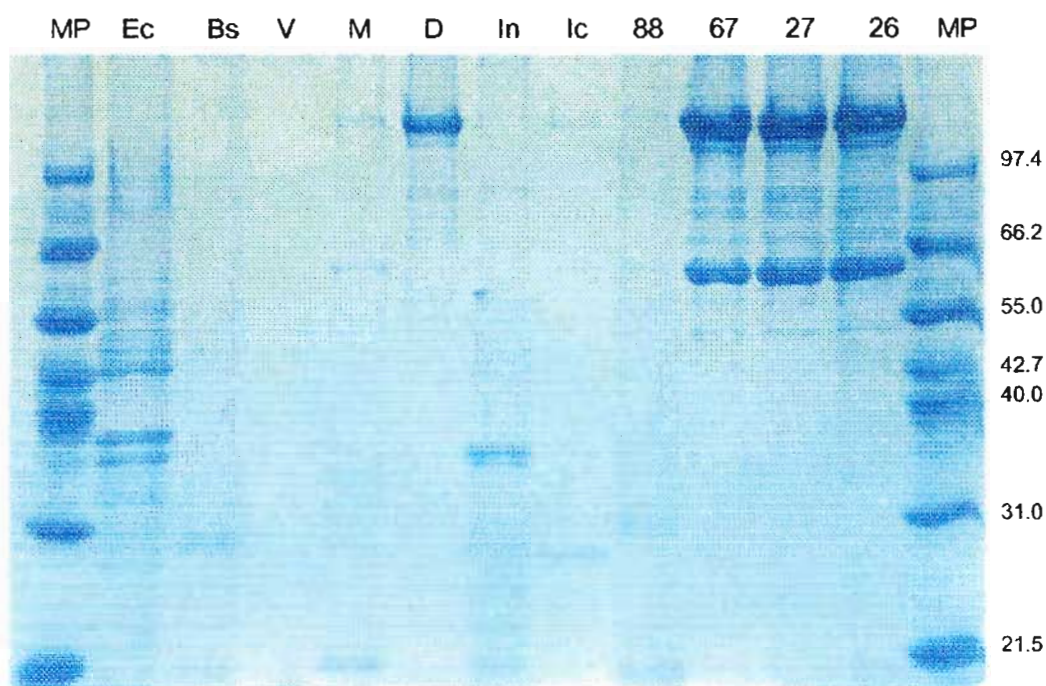


FIGURA 25. Electroforesis de proteínas de los aislados SilEI.Bt y controles, en medio sólido T3. **MP**, marcador de proteínas; **Ec**, *E. coli*; **Bs**, *B. subtilis*; **V**, *Vectobac*; **M**, Bt subsp. *morrisoni*; **D**, Bt subsp. *darmstadiensis*; **In**, Bt subsp. *israelensis* (UNAL); **Ic**, Bt subsp. *israelensis* (CIB); **88**, **67**, **27** y **26**, aislados endémicos.

Los demás Bt no *israelensis* mostraron una banda a los 130 KDa que concuerda con el patrón *israelensis* (CIB), con una sobreexpresión de esta proteína en la cepa *darmstadiensis*. También se observaron bandas a los 60 KDa.

Las cepas SilEI.Bt 26, 27 y 67, mostraron el mismo patrón de bandas, con expresiones similares de las proteínas ubicadas en 130, 125, 90, 33 y 27 KDa; en la cepa SilEI.Bt 88 se observaron bandas a los 45 ,42 y 38 KDa y no se observó la banda de 125 KDa. La expresión fue menor en SilEI.Bt 88.

4.2.2 Inmunobloting

El análisis por inmunodetección para determinar la presencia de proteínas Cry, utilizando anticuerpos policlonales antiproteínas del cristal de *israelensis*, dio como resultado, en ambos medios usados para el aislamiento de proteínas, una reacción positiva para los cuatro aislamientos endémicos.

En el medio HCO líquido, el control positivo (CIB), mostró respuesta positiva al anticuerpo, reaccionando las bandas ubicadas a la altura de 125, 60 y 28 KDa, correspondiendo con lo reportado en la literatura, (Orduz et al., 1994) Además aparecen otras bandas a los 55, 53, 35 y 33 KDa. En las otras dos cepas usadas como control positivo, Bt *israelensis* de la UNAL y Vectobac, se observó reacción a la altura de 33 y 70 KDa, respectivamente.

Bt subsp. *toumanoffi* mostró una banda a la altura de 40 KDa, *darmstadiensis* bandas a los 125 y 40 KDa. y *morrisoni* a los 32, 33, 43 y 60 KDa. El control negativo *B. subtilis*, no mostró ninguna respuesta al anticuerpo (Figura 26).

En los aislados SilEI.Bt 26, 27 y 67 se observa una banda a los 68 KDa. En los aislados SilEI.Bt 27 y SilEI.Bt 67 se observaron bandas a los 125, 60 y 33 KDa; además se observaron bandas únicas en los aislados SilEI.Bt 27 y SilEI.Bt 88, a 55 y 45 KDa, respectivamente.

El resultado obtenido en medio sólido T3 mostró una reacción similar para el control positivo *israelensis* CIB, con bandas a la altura de los 125, 68, 35 y 28 KDa, con la diferencia de que se observó una nueva banda de gran tamaño a la altura de los 140 KDa (Figura 27).

En las otras dos cepas usadas como control positivo Bt *israelensis* de la UNAL y Vectobac, se observó reacción de las proteínas ubicadas a 68, 35 y 28 KDa en el caso de la UNAL y una banda muy débil ubicada a 125 KDa. Bt subsp. *darmstadiensis* reveló la presencia de una banda ubicada a 125 KDa y una banda débil a los 90 KDa. Bt subsp. *morrisoni* reveló la presencia de dos bandas débiles ubicadas a 125 y 68 KDa.

Los controles negativos *B. subtilis* y *E. coli*, como es de esperarse, no mostraron ninguna reacción al anticuerpo.

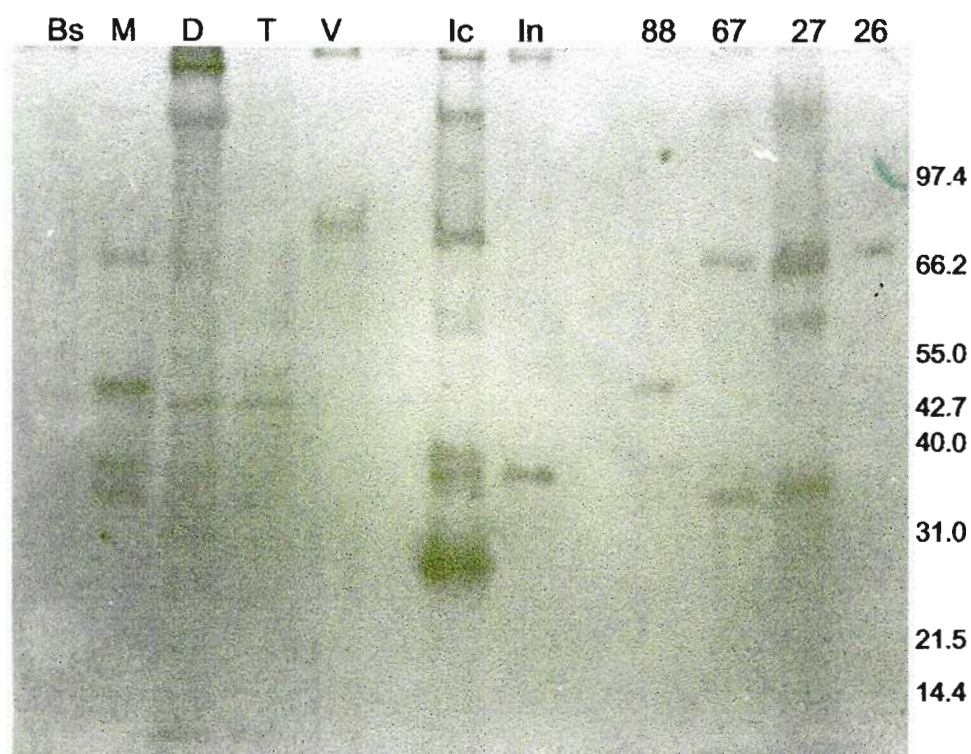


FIGURA 26. Western Blot de los aislados SilEI.Bt y controles, en medio HCO liquido. **Bs**, *B. subtilis*, **M**, Bt subsp. *morrisoni*; **D**, Bt subsp. *darmstadiensis*; **T**, Bt subsp. *toumanoffi*; **V**, Vectobac; **Ic**, Bt subsp. *israelensis* (CIB); **In**, Bt subsp. *israelensis* (UNAL); **88**, **67**, **27** y **26**, aislados endémicos.

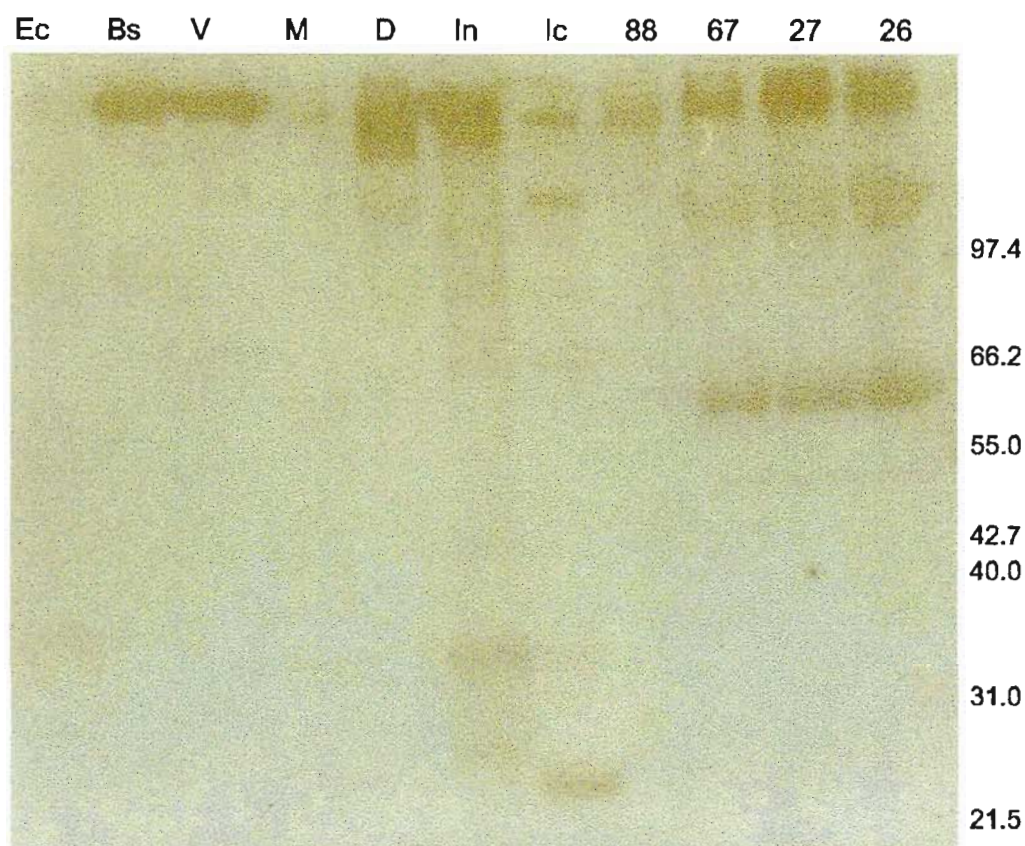


FIGURA 27. Western Blot de los aislados SiIEI.Bt y controles, en medio sólido T3.

Ec, *E. coli*; **Bs**, *B. subtilis*, **V**, *Vectobac*; **M**, *Bt* subsp. *morrisoni*; **D**, *Bt* subsp. *darmstadiensis*; **In**, *Bt* subsp. *israelensis* (UNAL); **Ic**, *Bt* subsp. *israelensis* (CIB); **88**, **67**, **27** y **26**, aislados endémicos.

En los aislados SilEl.Bt 26, 27 y 67 se observaron bandas ubicadas a 125 y 60, con sobreexpresión de la proteína y a 48 y 70 bandas muy débiles. El aislado SilEl.Bt 88 muestra bandas débiles ubicadas a 125 y 60 KDa. Por lo tanto, los aislados endémicos comparten bandas, con el patrón Bt subsp. *israelensis* y con los demás controles, ubicadas a 125 y 65, que pueden corresponder a proteínas del cristal, ya que están presentes en los controles utilizados.

4.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS

En el cuadro 9 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas de los aislados endémicos de Bt, comparados con los patrones utilizados; y en el cuadro 10 se comparan los aislados endémicos de Bt con especies de Bt formadoras y no formadoras de cristal.

4.4 BIOENSAYO

4.4.1 Adecuación de jaulas

De los recipientes usados para MOv, los plásticos resultaron ser más útiles para el desarrollo y crianza de larvas para la obtención de adultos y los de icopor para la realización del EPT.

Se encontraron pequeños insectos invasores tipo díptero en los MOv, mostrando que las jaulas no son efectivas para aislar la población en estudio de estos insectos.

CUADRO 9. Resultados de las pruebas bioquímicas para los aislados nativos y comparación con los patrones.

PRUEBA BIOQUIMICA	AISLADOS DE <i>B. thuringiensis</i>						
	<i>Bt darmstadiensis</i>	<i>Bt morrisoni</i>	<i>Bt israelensis</i>	SilEI.Bt 26	SilEI.Bt 27	SilEI.Bt 67	SilEI.Bt 88
Voges Proskauer	+ ^D	+ ^D	+	+ ^D	+ ^D	+ ^D	+ ^D
Caseína	+	+	+	+	+	+	+
Arginina Dehidrolasa	+	+	+	+	+	+	+
Lectinasa	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	-	-	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	+	+
Hemólisis en Agar sangre	β	β	β	β	β	β	β
Agar NaCl 7%	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento anaerobio a las 24 horas	+	+	+	+	+	+	-
Esculina	-	-	-	-	-	+	+
Sacarosa	-	+	-	+	-	-	+

+^D, débilmente positiva; +, reacción positiva; -, reacción negativa.

CUADRO 10. Comparación de las características bioquímicas entre especies de *Bacillus*, formadoras y no formadoras de inclusiones cristalinas y los aislados SiEI.Bt

PRUEBA BIOQUIMICA	ESPECIES DE <i>Bacillus</i>								
	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. popillae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	SiEI.Bt 26	SiEI.Bt 27	SiEI.Bt 67	SiEI.Bt 88
Voges Proskauer	-	-	+	+	+	+ ^D	+ ^D	+ ^D	+ ^D
Caseína	V	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de glucosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Agar NaCl 7%	V	-	+	+	+	-	-	-	-
Crecimiento anaerobio en agar	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Formación de cristal paresporal	+	+	-	V	+	+	+	+	+

+^D: débilmente positiva; + : reacción positiva; - : reacción negativa; V : de carácter variable

Los resultados de *B. sphaericus*, *B. popillae*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* fueron tomados de Slepecky & Hemphill (1992)

4.4.2 Captura de insectos

Los lugares elegidos para la captura fueron muy frecuentados por *M. domestica* para su reproducción, viéndose una relación entre altas poblaciones del insecto con sitios aledaños a galpones para la crianza de pollos y sitios con gallinaza expuesta a la intemperie.

El uso de bolsas plásticas transparentes fue adecuado, tanto para el transporte, como para el reconocimiento de los adultos de *M. domestica*, ya que al capturar con las redes, otros insectos eran colectados y en este tipo de bolsas eran fácilmente reconocidos y descartados.

4.4.3 Aclimatación

En general los adultos traídos de la Mesa de los Santos sobreviven en las jaulas entre 12 y 18 días. Algunos maltratados murieron rápidamente. Se observó que se adaptaron fácilmente al MA y al MOv.

Las hembras ovipositaron el día 2 luego de la colocación del MOv en estado de fermentación. Los huevos eclosionaron al día siguiente de la postura. Las larvas nacidas mostraron un incremento diario en tamaño y color lo que indicaba la asimilación de los nutrientes del MOv.

4.4.4 Medios de oviposición y alimentación

El MOv presentó inicialmente una degradación fermentativa a la par con el desarrollo larval, mostrando un olor y color característico. En la crianza de posteriores camadas se encontraron cajas que tenían color y olor no acorde con lo mostrado en desarrollos larvales normales.

Durante el acondicionamiento de las condiciones de crianza se presentó muerte larval masiva en varias cajas con MOv. El análisis de muestras del MOv de las diferentes cajas mostró larvas de *Rhabditoides* de nematodos, observadas al microscopio óptico en objetivos de 10 y 40 X. Por otra parte dichas muestras observadas en KOH 10 % mostraron blastoconidias y artroconidias. Al cultivarse en medios para hongos se aisló *Trichosporon spp.* (Torres. A, Comunicación personal).

Las larvas mantienen la humedad de su hábitat por ello la adición de agua al medio es realmente innecesaria excepto en los casos en que la temperatura ambiental aumenta y con ello la evaporación.

El MA usado resultó ser efectivo y practico como fuente de nutrientes, además no fue necesario cambiarlo constantemente.

- **Descripción de los cambios en el medio de oviposición**

Inicialmente el medio humedecido es ocre claro, luego de la eclosión de las larvas el medio se aclara un poco mas incrementándose la humedad en el fondo del

recipiente. Como el medio es homogenizado diariamente, el color de todo el medio cambia de forma constante pasando finalmente a marrón oscuro (casi al llegar el estado prepupal) .

4.4.5 Ensayo de Desarrollo (EnDes)

4.4.5.1 Duración del ciclo de vida en cautiverio

La duración total del ciclo de vida de *M. domestica* fue de 14 días. De huevo a larva la duración fue de un 1 día; de larva a pupa, 6 a 7 días, y de pupa a adulto, 7 días. Los resultados del EnDes se exponen en el cuadro 11 y en la grafica 3.

4.4.6 Desarrollo del Ensayo preliminar de toxicidad (EPT)

4.4.6.1 Preparación de cultivos de Bt para liofilización

4.4.6.1.1 A partir de cultivos líquidos

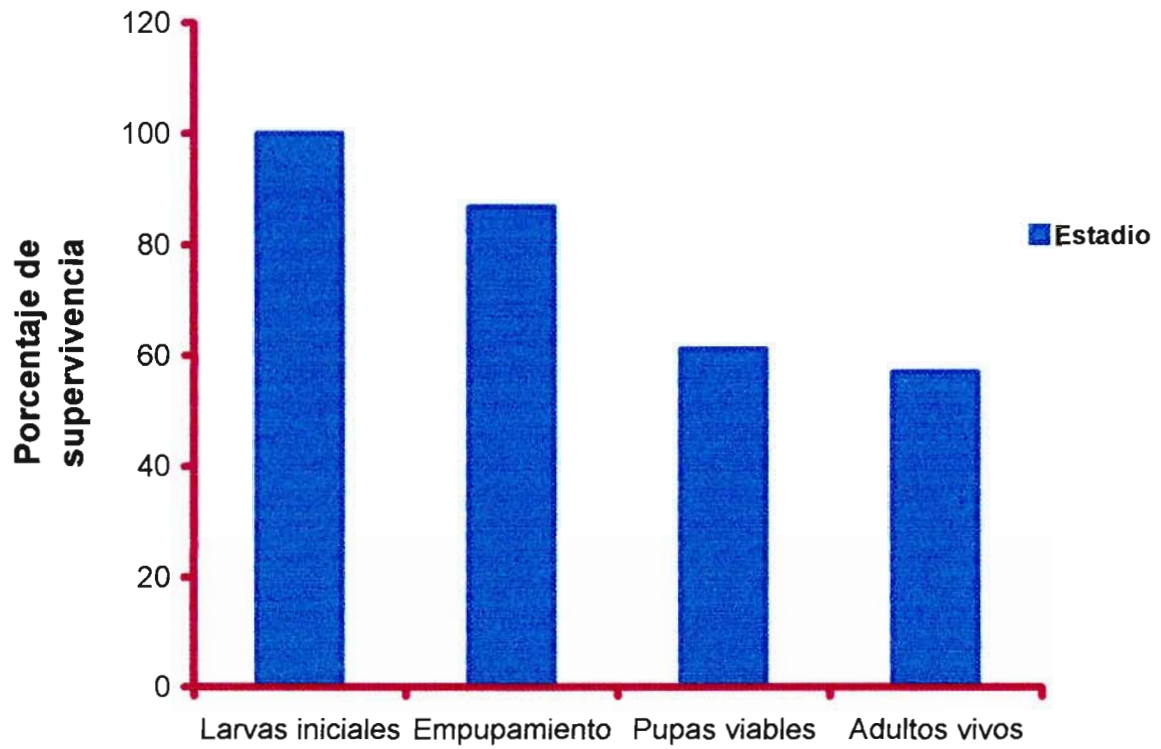
A partir de 500 ml de cultivo líquido crecido en medio T3, mantenido en incubación a 37 C, entre 15 y 21 días, se obtuvo 5 mg. de liofilizado bacteriano. Por observación al microscopio óptico en objetivo de 100 X se evidenció que las líneas celulares no llegaron a un 100 % de esporulación.

CUADRO 11. Resultados del Ensayo de Desarrollo (EnDes)

DIAS	LARVAS *		PUPAS	ADULTOS NACIDOS VIVOS		ADULTOS NACIDOS	
	TOTALES	MUERTAS		HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS
7	336	5	-	-	-	-	-
10	321	-	10	-	-	-	-
15	317	4	-	-	-	-	-
17	317	1	10	-	-	-	-
19	306	-	-	4	5	-	-
21	269	6	31	-	1	-	-
22	222	3	44	23	20	1	-
23	158	4	60	-	-	-	-
25	96	12	50	6	3	-	-
28	57	4	35	67	63	2	11
29	0	5	52	-	-	-	-
TOTAL		44	292	100	92	3	11

* Población larval inicial de 336 individuos.

BIBLIOTECA UIS



Grafica 3. Ciclo de vida en *M. domestica* en el ensayo de desarrollo (EnDes).

4.4.6.1.2 A partir de cultivos sólidos

De 2 cajas de Petri cultivadas en agar T3, incubadas de 3-9 días a 30 C, se obtuvieron 6 mg. de liofilizado bacteriano.

De dos cajas de Petri cultivadas en agar LB, incubadas de 9-12 días a 30 C, se obtuvieron 2 mg. de liofilizado bacteriano.

Del raspado y lavado de 12 cajas de cultivo (para cada línea celular), realizado en agar T3, se obtuvo entre 32 y 60 mg. de liofilizado bacteriano.

La aparición del 100 % de esporulación fue controlada por microscopía óptica como se citó anteriormente.

4.4.7 Inoculación de las diluciones al MOv

Se usaron dos diluciones: 0,5 mg. / ml y 1 mg. / ml, encontrándose en ambos casos que luego de 24 horas todas las larvas permanecían vivas en el MOv inoculado con las soluciones de liofilizado bacteriano, al igual que en el control positivo.

Se continuó el monitoreo diariamente hasta el empupamiento, observándose que el desarrollo larval se presentó de manera normal, apareciendo pupas entre los días 6 y 7 de su ciclo de vida.

4.5 DETECCION DE LA PRESENCIA DE UN FAGO BACTERIANO

La visualización microscópica de estructuras compatibles con placas producidas por bacteriófagos en el cultivo SilEI. Bt 26, sugirió que éste podría portar un fago de tipo lisogénico. Este hallazgo es de gran importancia por la utilidad de los fagos en la manipulación genética de estos microorganismos.

4.5.1 Aislamiento del Fago

Para obtener el posible fago presente en la cepa SilEI.Bt 26, se realizó el aislamiento según la metodología citada anteriormente.

La forma de visualizar el aislamiento fue colocando en contacto líneas celulares de *Bacillus* spp con el sobrenadante obtenido del aislamiento y observando la aparición de placas claras o turbias en los cultivos crecidos.

Los medios basales de cultivo para SilEI. Bt 26 en la fase previa al aislamiento del fago, fueron: CNS y CC, siendo escogido este último, por ser más eficaz para la multiplicación celular.

4.5.2 Infección

Se logró infectar la línea celular Bt subsp. *israelensis* 1884 (CIB), observándose placas claras y turbias (Figura 28). El cultivo se desarrolló en agar λ .

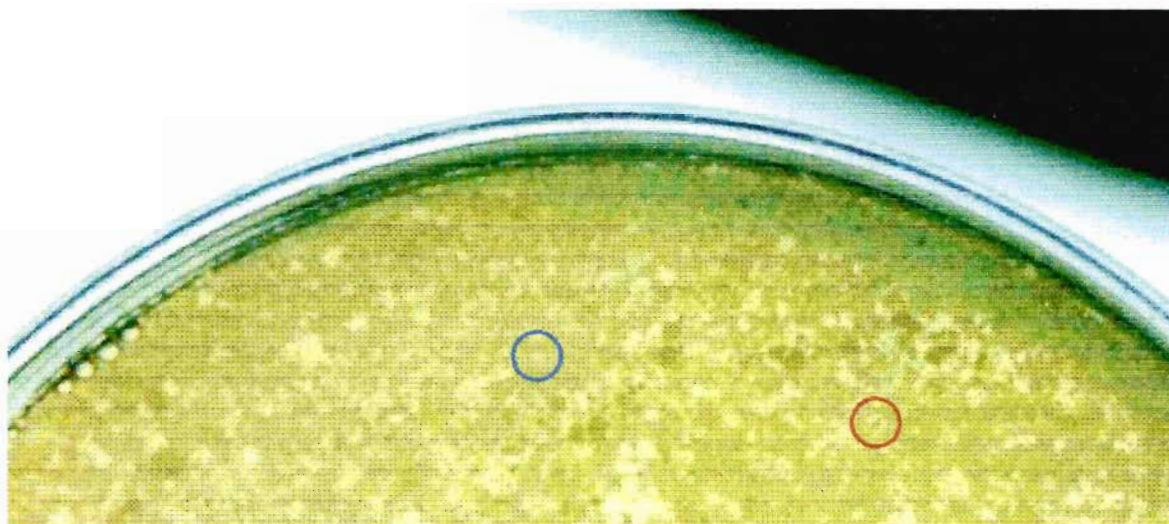


FIGURA 28. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (CIB) infectado con el fago proveniente del aislado SILEI.Bt 26. El círculo rojo señala una placa turbia y el círculo azul, una placa clara.

Se intentó infectar posteriormente *B. cereus*, *B. subtilis* y SilEI. Bt 27, 67, 88, usando agar λ , sin observar aparición de placas.

Se intentó verificar el crecimiento de las líneas celulares en otros medios de cultivo: agar R y NSA, pero en estos hubo poco crecimiento y tampoco se observaron placas.

Para mantener el crecimiento de SilEI.Bt 26 infectada por el fago se realizaron varios repiques, no pudiéndose obtener nuevamente un cultivo SilEI.Bt 26 que presentara placas. Por esta razón en todos los casos de intento de aislamiento se usó la misma caja donde inicialmente se presentaron las placas.

5. DISCUSION

Con este trabajo se inició la investigación sobre *Bacillus thuringiensis* en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Industrial de Santander. En las condiciones del laboratorio, se procuró cumplir con los objetivos inicialmente propuestos, ya que se establecieron las condiciones apropiadas para el aislamiento de Bt de muestras de suelo y el desarrollo de técnicas moleculares como Electroforesis de Proteínas e Inmunoblotting, estandarizándolas a las condiciones del laboratorio, ya que ninguna de estas técnicas se había realizado antes en la UIS. Adicionalmente se sentaron las bases para el mantenimiento en cautiverio de larvas de *Musca domestica* y para la realización de bioensayos con estas larvas, puesto que en una revisión bibliográfica exhaustiva no se encontró ningún reporte sobre bioensayos con larvas de este insecto.

Por razones de infraestructura los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de Biología Molecular de la Escuela de Biología y en los laboratorios de la Escuela de Bacteriología.

Se considera que este trabajo representa el punto de partida en investigaciones sobre Bt en Santander, en la búsqueda de nuevas toxinas y/o nuevos rangos de

acción, que permitan su utilización en la solución de problemas agrícolas o de salud pública a nivel regional y nacional.

En los siguientes párrafos se discutirán los resultados obtenidos en este trabajo, con el fin de establecer las conclusiones y recomendaciones que deben seguir los futuros proyectos que se desarrollen en la misma área y bajo las mismas condiciones.

5.1 AISLAMIENTO DE CEPAS ENDEMICAS DE *B. thuringiensis*

El análisis de los aislamientos de Bt obtenidos en la zona de la Mesa de los Santos, Santander, muestra un resultado contrario al esperado ya que el número de aislados fue muy bajo con relación a la cantidad de muestras de suelo tomadas, aunque el lugar se encuentra entre los rangos de temperatura y altitud favorables para la obtención de Bt en abundante cantidad, de acuerdo con estudios preliminares sobre la bacteria y su distribución geográfica en Colombia (Ascencio & Torifio, 1995).

Aunque esta zona posee temperaturas inferiores a los 20 C y su altitud es de 1700 m.s.n.m, suponemos es poco propicia para el desarrollo o asentamiento ecológico del microorganismo. Esto tal vez debido a que la zona corresponde a una sabana con pocas zonas aisladas de bosques y a terrenos secos con capa vegetal pobre, que se inundan fácilmente en temporada de lluvias, principalmente en el primer sector; razón por la cual se ha aprovechado para el establecimiento de lugares de recreación, levante de ganado e instalación de granjas avícolas. Las

características anteriormente mencionadas de la Mesa de los Santos, hacen limitado el aislamiento de Bt y demuestran, tal vez, por qué no se da un control biológico natural sobre la mosca domestica.

El segundo sector muestra condiciones diferentes de vegetación y humedad, cuenta con una mejor capa vegetal y suelos con mayor permeabilidad. Provenientes de este sector son los cuatro aislados de Bt obtenidos; todos corresponden a sitios donde el nivel de humedad se mantiene por la presencia de una buena capa vegetal y los rayos solares no inciden directamente. Esto podemos evidenciarlo en la muestra de suelo 20, cuyo terreno se encuentra cubierto por árboles y posee una capa vegetal gruesa, con buena humedad; de esta muestra se aislaron dos cepas de Bt diferentes. Las muestras de suelo 41 y 47 corresponden a lugares boscosos, que presentan las características antes descritas en la muestra de suelo 20.

Para hacer una afirmación concreta sobre el comportamiento ecológico de este microorganismo se requiere la elaboración de un diseño experimental que muestree el total de la zona y relacione datos como características del suelo, tipos de vegetación y relación de Bt con la microbiota del lugar. Además, es probable que los pocos aislamientos de Bt obtenidos en este proyecto sean el resultado de haber restringido el área de muestreo a una sola zona.

Según los resultados obtenidos, el método de selección con acetato de sodio utilizado para el aislamiento de Bt resultó ser satisfactorio, aunque al repicar en agar LB se observó el crecimiento de otros bacilos formadores de espora, que al igual que Bt son inhibidos en presencia de acetato de sodio 0.25 M.

Basados en los reportes de Travers et al (1987) y Ascencio & Torifio (1995), al usar el medio selectivo con acetato de sodio 0.25 M, los aislamientos de Bt de diferentes regiones climáticas y zonas geográficas, arrojan resultados positivos, lo que indica que el bajo número de aislamientos reportados en este proyecto, depende más de la zona muestreada, que del método utilizado para el aislamiento del microorganismo (Travers et al., 1987). Se complementó la selección con una revisión usando Agar TSE para tener la certeza de no haber pasado por alto alguna cepa de Bt que no hubiera producido cristal inicialmente en el medio T3; esto suele presentarse como lo muestra Kablin et al., 1994.

5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS ENDÉMICOS DE *B. thuringiensis*

5.2.1 Electroforesis de proteínas

Para el mantenimiento de los cultivos, previa realización de los aislamientos de proteínas, se probaron dos temperaturas de incubación a 30 y 37 C. La temperatura a la cual un mayor número de cepas alcanzó más rápidamente su máximo nivel de producción de cristales, fue 37 C. A 30 C solo los aislados endémicos SilEI.Bt 67 y 88 y el control Bt subsp. *morrisoni*, alcanzaron más rápido su máximo nivel de producción de cristales. El comportamiento de los otros dos aislados endémicos, SilEI.Bt 26 y 27, mostró prácticamente el mismo crecimiento en la relación de temperatura 30 vs. 37, con una pequeña diferencia entre el tiempo utilizado a 37 C, que fue menor. Igual sucedió con los demás controles.

Estas diferencias muestran que cada cepa requiere condiciones particulares en las cuales su crecimiento se ve favorecido, por lo cual muy probablemente entre los aislados endémicos no se encuentra un mismo tipo de Bt, sino diferentes subespecies con características especiales de incubación. La temperatura ideal para el mismo propósito debe determinarse experimentalmente para lograr un máximo de producción en el menor tiempo posible.

Durante la realización de las pruebas moleculares, se utilizaron dos medios para el crecimiento de los aislados SilEI.Bt y de los controles negativos y positivos. El método que se siguió para la extracción de proteínas fue el mismo para ambos tipos de medios, pero el resultado de la electroforesis y el Inmunoblotting, mostró diferencias en cada uno. Mientras que al utilizar como medio de crecimiento HCO líquido se obtuvieron gran cantidad de bandas con fuerte expresión, al utilizar medio sólido T3, la cantidad fue menor y la expresión muy débil.

Estos cultivos permitieron concluir que el medio apropiado para la obtención máxima de cristales en cualquier cepa de Bt es el medio sólido. Probablemente, la formación de colonias conduce a una restricción en la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de desechos celulares y por consiguiente la inducción de la esporulación.

Debemos aclarar que en ninguno de los casos se realizó un aislamiento de los cristales y que el perfil electroforético corresponde a la proteína bacteriana total. Creemos que la razón de estas diferencias radica en el grado de esporulación de las células bacterianas. Al utilizar medio líquido las cepas no alcanzan un 100% de esporulación, y por consiguiente de producción de cristales, lo cual hace que permanezcan formas vegetativas hasta el momento del aislamiento de proteínas.

Esto explicaría la gran cantidad de bandas de las cuales unas deben corresponder a proteínas de la célula vegetativa y otras a la espora y el cristal. En el medio T3 la esporulación y producción de cristales fue del 100%, de tal manera que en el momento del aislamiento de proteínas, se observaron pocas formas vegetativas, lo que permitiría afirmar que las bandas observadas corresponden en su gran mayoría a proteínas de la espora y del cristal con niveles fuertes de expresión. Las demás bandas corresponderían a proteínas de la célula vegetativa, cuya expresión es mínima por la poca cantidad presente en el medio.

En los casos en los cuales la proteína está presente en un gel y no en el otro, podríamos pensar que el nivel de expresión de esta proteína es bajo, o por alguna razón la proteína no se está expresando en ese tipo de medio. La razón de las diferencias en los dos perfiles puede deberse, como hemos dicho, a que en el medio líquido las células se mantienen en agitación constante y por lo tanto distribuidas en todo el medio. Por otra parte, en el medio sólido se concentran las células en colonias lo que limita el crecimiento e induce esporulación, lo que muestra condiciones diferentes de disponibilidad de oxígeno. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que algún componente propio del medio de cultivo esté inhibiendo o activando la expresión de determinadas proteínas.

De ninguna manera consideramos que las condiciones de aislamiento y electroforesis de proteínas, haya conducido a un fraccionamiento de las mismas, de manera tal que percibiéramos en los geles solo aquellas que cumplieran con ciertas propiedades físico-químicas.

Lo anterior nos permite afirmar que el resultado de los dos geles, tanto en medio HCO como en medio T3 es esencialmente el mismo, evidenciado en la presencia

de las mismas bandas. Por otro lado las diferencias en la expresión debidas a los niveles de producción del cristal de cada medio, nos permiten distinguir entre las que corresponden a proteínas del cristal, i.e., aquellas cuya expresión está presente en ambos tipos de medio y las proteínas de la célula vegetativa que muestran elevada expresión en medio líquido, pero menor o ninguna expresión en el medio sólido T3.

En otras palabras, aunque el medio T3 permite una producción de cristales mucho más eficiente, y por consiguiente mayor síntesis de proteína tóxica, el medio HCO refleja la expresión de una gama más amplia de proteína bacteriana, i.e., proteína vegetativa, espora y cristal, contraste que conduce a resultados que se complementan y permiten hacer afirmaciones sobre la naturaleza de las bandas.

Las proteínas de la espora, siempre presentes en los geles, podrían corresponder a algunas de las bandas fuertemente coloreadas.

Las inclusiones de *Bt* subsp. *israelensis* contienen 4 polipéptidos principales, Cry4A (125 KDa), Cry4B (135 KDa), Cry11A (68 KDa) y Cyt1Aa (28 KDa). (Thiery et al., 1997). El control positivo *Bt* subsp. *israelensis* (CIB) presentó bandas que coinciden con este reporte a los 125, 68 y 28 KDa. En el medio T3, la expresión de las bandas es mucho menor, e.g., las ubicadas a 68 y 28 KDa.

Los 4 aislamientos endémicos exhiben algunas bandas que coinciden con los pesos moleculares de las proteínas tóxicas del control *Bt* subsp. *israelensis* (CIB), y se ubican a la altura de los 125, 97, 68, y 28 KDa aprox., lo cual nos permite especular que estas bandas pueden corresponder a las proteínas tóxicas de estos aislados, constituyendo un elemento más que confirma la pertenencia de los aislados a la especie *B. thuringiensis*. *B. subtilis* que pertenece al mismo género,

carece de estas bandas, exhibiendo un patrón de proteínas totalmente diferente de los aislados y del control positivo Bt subsp. *israelensis* (CIB).

A pesar de que las cepas aisladas muestran parecidos con la cepa Bt subsp. *israelensis* (CIB), no es posible afirmar que los aislados correspondan a esta subespecie, menos aún cuando los otros controles utilizados, *morrisoni*, *darmstadiensis* y *toumanoffi*, revelan proteínas de igual peso molecular que *israelensis*. Otras proteínas Cry exhiben pesos moleculares similares, como es el caso de las proteínas Cry 1 con pesos entre 125 y 140 KDa, Cry 2 y 3, con pesos de 70.9 y 70.8 respectivamente (Galán et al., 1995a).. Por lo tanto el resultado de esta prueba no es suficiente para determinar la subespecie, por lo cual es necesario realizar la prueba de antígeno flagelar, que sí es concluyente (Barjac & Franchon, 1990)

5.2.2 Inmunoblotting

El resultado de esta prueba utilizando los medios HCO y T3 para el aislamiento de proteínas, reveló la presencia de bandas que corresponden a proteínas tipo cristal, en los 4 aislados endémicos.

El extracto de proteínas del control positivo Bt subsp. *israelensis* cultivado en medio HCO, mostró el perfil indicado en la bibliografía (Ordúz et al., 1994), observándose la reacción de bandas ubicadas a 130, 68 y 28 KDa aprox., Por otra parte, el Inmunoblotting utilizando extracto de proteínas del control *israelensis* (CIB) cultivado en medio T3, reveló las mismas 3 bandas presentes en el medio HCO (130, 60 y 28 KDa)., lo cual indica que el resultado obtenido para los 4

aislados endémicos es confiable. Es decir, podemos tener certeza de que los métodos fueron correctamente utilizados y que los resultados son evidencia suficiente para confirmar la existencia de proteínas tipo cristal en los aislados.

Las bandas comunes en ambos medios de cultivo, corresponderían a las proteínas del cristal de *Bt. subsp. israelensis*. Sin embargo, en el medio T3 no se observaron las bandas ubicadas a 55, 35 y 33 KDa. ya que en este medio la producción de cristales y esporas es de un 100%, es decir, no contiene proteína vegetativa. Estas bandas en el medio HCO corresponderían a proteínas de la célula vegetativa.

Tres razones nos permiten explicar el hecho de que contradictoriamente ocurra reacción entre los anticuerpos y algunas proteínas de cultivo líquido, mas no de cultivos sólido, el cual, como hemos dicho, si contiene 100% de esporulación.

Una posibilidad, es que las condiciones propias de los medios de cultivo inciden sobre la regulación de la expresión de genes involucrados en la formación del cristal o en la síntesis de las proteínas correspondientes, e.g., concentración de nutrientes, fuerza iónica, formación de agregados bacterianos, acumulación de desechos celulares, etc.

Otra posibilidad es que durante la incubación en medio líquido HCO, proteasas bacterianas degraden las proteínas de la toxina formando péptidos de menor peso molecular pero que conservan la capacidad de reaccionar con los anticuerpos. Esta alternativa se reafirmaría teniendo en cuenta que para la preparación de los extractos de proteína se procedió a incubar o conservar los medios mas tiempo de lo necesario mientras se obtenía esporulación en las cepas tardías. Allí pudo haber existido degradación por las proteasas.

Finalmente, una tercera posibilidad es que los anticuerpos policlonales anti-proteína cristal de *Bt* subsp. *israelensis* pueden no ser específicos para proteínas tipo cristal sino que contienen anticuerpos anti-proteínas vegetativas y de la espora. Por consiguiente, los ratones vacunados con el extracto de proteínas desarrollaron anticuerpos no solamente contra las proteínas del cristal, sino contra otras de la misma bacteria. Esta afirmación sería válida solo para algunas pocas proteínas que habrían podido ser purificadas con los cristales por presentar propiedades físico-químicas similares a la proteína cristal.

Cualquiera que sea la razón de este fenómeno, podemos afirmar con certeza que la gran mayoría de proteínas que reaccionaron con los anticuerpos son de tipo cristal paraesporal de *Bt*. A fin de descartar dos de las hipótesis antes formuladas, se deberá hacer nuevas experiencias en las condiciones adecuadas.

La utilización de dos medios diferentes para cultivar las cepas antes de realizar la extracción de las proteínas, nos dio la posibilidad de comparar los resultados sobre geles SDS-PAGE y ciertamente sugerir algunas bandas como propias del cristal y otras como proteínas de la bacteria.

Dado que en medio HCO las bacterias no esporularon totalmente, la cantidad de cristales y esporas no fue del 100% y permanecieron formas vegetativas sin esporular, el resultado del Inmunoblotting nos permite pensar que las bandas reveladas corresponden a proteínas del cristal y en menor proporción de otro tipo. Mientras que el medio T3 aseguró una esporulación y producción de cristales del 100%, donde no permanecieron formas vegetativas, sino esporas y cristales en gran cantidad, lo que revelaría la presencia de bandas que pueden corresponder no sólo a proteínas del cristal, sino también de la espora.

En el medio HCO, las cepas endémicas SilEI.Bt 27 y 67, mostraron bandas a los 130 y 68 KDa; estas cepas también presentaron otras bandas que serían, factiblemente, el producto de la reacción de los anticuerpos con otras proteínas diferentes a las del cristal.

En la cepa SilEI.Bt 26 se observó una banda ubicada a los 70 KDa. Una banda de igual peso molecular se encontró en Bt *kurstaki*, y corresponde a una proteína Cry 2 del cristal que exhibe este peso molecular (Bravo et al., 1998).

Las bandas que revelan la presencia de proteínas tóxicas se observan también en las cepas *morrisoni*, *toumanoffi* y *darmstadiensis*.

En la cepa SilEI.Bt 88, se observó una sola banda, que se encuentra fuera del rango esperado para las proteínas Cry determinadas hasta ahora. Podemos explicar este resultado teniendo en cuenta que los anticuerpos policlonales pueden estar reconociendo una proteína Cry con regiones conservadas entre las diferentes proteínas de esta familia. Esta afirmación se refuerza con el resultado obtenido en la electroforesis, donde SilEI.Bt. 88 muestra un perfil de proteínas visiblemente diferente en relación con las demás cepas aisladas y los controles; es por lo tanto, una cepa notoriamente diferente de las demás aisladas y por ende de gran interés para futuros estudios. No descartamos que esta banda sea el resultado de la reacción de los anticuerpos con alguna proteína de la célula o espora.

En medio T3 se observó la presencia de una banda ubicada a 140 KDa, presente en todas las cepas, sin reacción antígeno-anticuerpo en medio HCO.

Con base en la idea de que los anticuerpos policlonales reconocen proteínas diferentes a las del cristal, i.e., proteínas de la forma vegetativa o de la espora, es

factible considerar que esta banda corresponda a proteínas de la espora. La ausencia de esta banda en el medio líquido tal vez sea debido a que en este medio la esporulación fue menor y el aislamiento permitió la lisis total de las esporas, mientras que en el sólido, la cantidad de esporas es mayor, producto de una esporulación del 100%, lo que no habría permitido la lisis total de esporas, permaneciendo algunas intactas al procedimiento dadas sus características físicas. Las proteínas presentes en la espora habrían absorbido gran cantidad de colorante y de allí la presencia de esta banda en todas las cepas control y en los aislados endémicos. Se observó la ausencia de esta banda en los controles negativos, *E. coli* y *B. subtilis*, lo cual reafirmaría esta hipótesis y sería otro argumento a favor de la confirmación de la identidad de los aislados endémicos. Finalmente, no se puede excluir que en los perfiles electroforéticos estén presentes otras proteínas del cristal diferentes a las de *Bt* subsp. *israelensis* que no fueron revelados por razones de especificidad de antígeno-anticuerpo.

5.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS

Todos los aislados fueron caracterizados inicialmente como *Bt* por la presencia de cristal paraesporal, las características morfológicas de la célula vegetativa y la forma y posición de la espora.

Se realizó una comparación bioquímica de los aislados SilEI.Bt 26, 27, 67 y 88 con las cepas tipo de *Bt*; se encontró una correspondencia del 100% en los resultados obtenidos en los aislados SilEI.Bt 26, 27 y 67 para las características descritas en el cuadro 10.

SilEI.Bt 88 mostró una disimilitud para la característica de crecimiento anaerobio en agar, dando un resultado negativo, lo que indica que su comportamiento bioquímico es de aerobio estricto.

A nivel de subespecie, la caracterización realizada fue de tipo complementaria, ya que como lo sostiene Díaz et al., 1993, no puede establecerse una clasificación de tipo bioquímico para determinar subespecie, sin correlación directa con las pruebas del antígeno flagelar.

Se encontró que el aislado SilEI.Bt 27 posee un 100% de similitud bioquímica en las características analizadas, con Bt subsp. *darmstadiensis*, sin embargo existe una notable diferencia en la forma del cristal de las dos colonias: SilEI.Bt 27 posee un cristal paraesporal bipiramidal y Bt subsp. *darmstadiensis* posee cristal paraesporal redondeado.

Los aislados SilEI.Bt 27 y 67 no degradan la sacarosa y difieren bioquímicamente el uno del otro, en que 27 no posee la propiedad de utilizar la esculina, mientras que 67 si puede hacerlo. La diferencia bioquímica entre SilEI.Bt 26 y 27 radica en que Bt 26 utiliza la sacarosa como fuente de carbono y energía, mientras que 27 no posee esta característica bioquímica.

Finalmente se realizó una comparación de los resultados bioquímicos obtenidos a los aislados SilEI.Bt, con las características bioquímicas citadas por Slepecky & Hemphill, 1992 para *Bacillus sphaericus* (Bsph) y *Bacillus popillidae* (Bp), pues estos géneros presentan inclusiones cristalinas de tipo proteico adyacentes a la espora y con Bc y Bs, por compartir características morfológicas, encontrando que tanto bioquímica como morfológicamente ninguno de los aislados SilEI.Bt puede clasificarse dentro de los géneros mencionados anteriormente.

5.4 BIOENSAYO

Durante el desarrollo del bioensayo se establecieron condiciones favorables para la captura, mantenimiento, e inoculación de las suspensiones de liofilizado bacteriano de los aislados SilEI.Bt y Bt subsp. *darmstadiensis* en larvas de *M. domestica*.

El lugar escogido para la captura de adultos de *M. domestica* brindó las condiciones para obtener entre 300 y 600 individuos por cada redada.

La crianza se realizó en los recipientes plásticos; éstos por su profundidad podían albergar hasta 500 larvas de *M. domestica* hasta su desarrollo pupal. Esto se dedujo porque inicialmente las larvas desarrolladas en las cajas de icopor se salían al piso de la jaula, al cambiar los recipientes por los de plástico que eran más grandes y profundos las larvas se mantenían todo el tiempo dentro de él.

Los recipientes de icopor son aptos para larvas de *M. domestica* en cantidades menores a 50 individuos. Con un número mayor se observa que las larvas migran al exterior del recipiente. Probablemente al crecer las larvas y abarcar más espacio, se reducen las condiciones nutricionales y se establece una competencia por el alimento, causando así la migración. Al terminar su desarrollo larval para pasar al estado de pupa, éstas buscan sitios más secos, por lo cual también se presenta una migración del recipiente.

A pesar de todos los cuidados para evitar la proliferación de otro tipo de insectos en los MOv; no se pudo mantener la población aislada el 100 % del tiempo. *Drosophila* sp. y otro tipo de dípteros lograron penetrar los pequeños poros de la

mallas y depositar sus huevos en los MOv destinados para la crianza de *M. domestica*. Estos MOv eran descartados o las larvas intrusas, reconocidas por su morfología, eran extraídas.

El rango de vida de un adulto nacido en cautiverio es de 30 a 45 días y la de los adultos capturados en el ambiente es de 12 a 18 días; debido al hecho de que ya se encuentran en estado de adultez al momento de la captura.

5.4.1 Desarrollo del EPT

Se determinó que el mejor medio para cultivo de células bacterianas para liofilización es el medio T3 sólido, por la cantidad de liofilizado obtenido, comparativamente con el medio T3 líquido y el agar LB. Además el medio T3 líquido sugerido por Orduz. S (Comunicación personal), resulta de difícil monitoreo y demora mucho tiempo para alcanzar la esporulación no llegando al 100 % en ninguno de los aislamientos SilEI.Bt o en la cepa Bt. subsp. *darmstadiensis*. Esto hace que la cantidad espora-cristal presente en el liofilizado sea menor y que el peso seco del liofilizado esté representado por un aporte considerable de estructuras vegetativas, las cuales al no poseer cristales no son significativas en la aplicación de las suspensiones bacterianas al MOv en el EPT.

5.4.2 Realización del Ensayo Preliminar de Toxicidad: EPT

La fase de adecuación del lugar para el EPT y la escogencia y cuidado de las larvas, debe ser cuidadosamente preparada; el MOv debe tener un buen grado de

fermentación que permita a las larvas desarrollarse satisfactoriamente; esto se comprueba por su olor y color. La humedad exacta es indispensable, pues en exceso las larvas escapan del recipiente o mueren y en ausencia, su desarrollo se retrasa notablemente. Es importante la aireación del MOv, por ello las tapas deben ser de malla o poseer orificios para el intercambio de gases. El mantenimiento de las jaulas debe darse en un sitio sombreado y cubierto, para evitar que otros insectos colonicen el MOv.

El sistema de inoculación de las diluciones asegura una escurritía de la solución (liofilizado de Bt) hacia el fondo del recipiente donde se mantienen enterradas las larvas.

Por el crecimiento larval posterior a las 24 horas de inoculada la suspensión de liofilizado bacteriano, se evidencia que éstas siguen su desarrollo larval normal, es decir, siguen alimentándose y se observa el incremento de tamaño.

Las cepas aisladas no son tóxicas para *Musca domestica*. Esto puede deberse a la ausencia de receptores de las δ - endotoxinas de estas cepas a nivel del intestino medio del insecto; el pH inadecuado en el intestino medio de *M. domestica*, el cual puede impedir la disolución de la protoxina a la forma toxica que es la forma activa de las δ - endotoxinas. (Realpe et al., 1998; Sarjeet et al., 1995).

No obstante la carencia de una cepa control con toxicidad para *M. domestica*, podemos afirmar que la metodología desarrollada en este Bioensayo permite probar de manera rápida liofilizados bacterianos de Bt en poblaciones estandarizadas de insectos, por lo cual es ideal para cepas nativas cuya actividad tóxica es desconocida. Cumpliéndose así el objetivo principal del EPT, descubrir el

efecto toxico de los aislados SilEI.Bt en las poblaciones larvales del insecto estudiado.

5.5 DETECCION DE LA PRESENCIA DE UN FAGO BACTERIANO

Los intentos de aislamiento del fago se realizaron en todos los casos a partir del cultivo que inicialmente mostró placas; del primer aislamiento se logró infectar Bt. subsp. *israelensis* 1884 (CIB) (Figura 28); este hallazgo nos permite predecir que de lograr aislar y estabilizar el fago, éste debe tener un amplio rango de huéspedes, el cual comprende varias subespecies de Bt.

La infección no pudo repetirse en otras líneas celulares ensayadas. Entre las razones probables están:

- El cultivo fue guardado a 4 C y algunos fagos a esta temperatura pueden perder su viabilidad (Guaracao, A. I. Comunicación personal).
- Otra razón puede estar en el escaso crecimiento de estas líneas celulares a infectar (*B. cereus*, *B. subtilis*, SilEI.Bt 27, 67 y 88) en los medios usados; esto induce a la reducción de la fase vegetativa y la expresión de los genes que llevan a la esporulación.
- Finalmente se cree que la resistencia a la infección pudo darse por la inexistencia de receptores específicos de reconocimiento para dicho fago, en la pared celular de estas bacterias.

A manera de conclusión general, podemos afirmar que con base en las pruebas realizadas a los aislados endémicos de la Mesa de los Santos, estos corresponden a *B. thuringiensis*. Las características macroscópicas, la presencia del cristal paraesporal, los resultados de las pruebas bioquímicas, la correspondencia con las bandas de los controles positivos en los geles de electroforesis y la presencia de bandas reveladas con anticuerpos de proteínas tóxicas de Bt subsp. *israelensis*, constituye evidencia suficiente para hacer esta afirmación.

A pesar de que se puede especular a qué subespecie pertenece cada aislado, de acuerdo al peso molecular de ciertas bandas en los geles SDS-PAGE e Inmunoblot, y la forma del cristal, estas pruebas no permiten concluir esto de manera definitiva. También existe la posibilidad de que los aislados endémicos correspondan a subespecies nuevas, que podrían ser caracterizadas con otras pruebas como la del antígeno flagelar.

Pueden realizarse bioensayos con otras especies de insectos que representen problemas ambientales o de salud, como *Aedes aegypti* y *Melanoloma viatrix*.

Sería conveniente la realización de otras pruebas como por ejemplo PCR, para determinar el tipo de genes *cry* presentes en los aislados y de esta manera encaminar los bioensayos de forma tal, que permitan aproximarse con mayor seguridad a la toxicidad de un aislado o al descubrimiento de una cepa con nuevas toxicidades, lo cual representaría un ahorro de tiempo y de dinero; perfil plasmídico para conocer el número y tamaño de los plásmidos portadores de los genes de las toxinas de Bt y aislamiento del posible fago presente en la cepa

SilEl.Bt 26 lo cual sería de gran utilidad para posteriores trabajos con estos aislados.

6. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la metodología para el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo en los laboratorios de la Universidad Industrial de Santander, dando inicio a esta línea de investigación y estableciendo las bases para posteriores trabajos en este tema. Para llevar a cabo esta labor, se adecuó el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología y los laboratorios de la Escuela de Bacteriología de la UIS.
- Se aislaron 125 cepas del genero *Bacillus* de la Mesa de los Santos, de ellas cuatro colonias endémicas fueron clasificadas como *Bacillus thuringiensis* teniendo en cuenta la morfología colonial y la presencia de inclusión cristalina paraesporal.
- Las pruebas bioquímicas comparativas al nivel de género, clasificaron los aislamientos SilEI.Bt como *Bacillus thuringiensis*. Estos resultados permiten encontrar similitudes entre las cepas aisladas y las cepas patrón caracterizadas al nivel de subespecie, pero no confirman esta clasificación; por ello deben necesariamente relacionarse con pruebas del antígeno flagelar.

- Mediante electroforesis de proteínas SDS-PAGE, se comprobó que las cepas aisladas presentan bandas que corresponden con los controles positivos usados.
- El Inmunoblotting determinó la presencia de bandas correspondientes a proteínas tipo cristal insecticida en los cuatro aislamientos endémicos, por lo tanto se comprobó que los aislamientos corresponden a cepas de Bt.
- Se establecieron las condiciones para la crianza y preparación de material entomológico para bioensayos con larvas de *M. domestica*; determinándose la duración de su ciclo de vida en cautiverio.
- El bioensayo preliminar de toxicidad fue realizado con los aislados SilEI.Bt 26, 27, 67 y 88, al igual que Bt. subsp. *darmstadiensis*, reportando toxicidad negativa en concentraciones de 0,5 mg / ml y 1 mg / ml de cultivo liofilizado (espora-cristal), bajo las condiciones usadas.

7. RECOMENDACIONES

- Estandarizar el método de aislamiento utilizando muestras de suelo provenientes de otras zonas geográficas de Colombia.
- Hacer un diseño de muestreo donde se realicen las tomas de las muestras asociadas a identificación de las características físico-químicas del suelo y la vegetación del lugar.
- Realizar la caracterización de los *Bacillus* spp. pertenecientes al cepario BACTUIS, para determinar la especie a la cual pertenecen y tener una idea más clara sobre la microbiota asociada a los aislamientos de Bt y que son resistentes a la concentración 0.25 M de acetato de sodio.
- Desarrollar las pruebas bioquímicas con ayuda del kit Oxi -Ferm y Entero Tube (Hoffman La Roche, Basilea, Suiza) de manera similar a la descrita por Logan and Berkeley (1984) en Ordúz et al., 1990; con el fin de obtener patrones comparativos estándar de caracterización, que puedan resultar benéficos en posteriores investigaciones con los aislados SilEI.Bt.

- Realizar la prueba del antígeno flagelar para determinar la subespecie a la que pertenecen los aislados SilEI.Bt o conocer si son subespecies nuevas.
- Realizar más experiencias en las cuales se utilice el medio HCO para el aislamiento de proteínas y electroforesis, con el fin de corroborar los niveles de producción de cristales en este medio y la cantidad y expresión de las proteínas de esta bacteria.
- Purificar los anticuerpos anti-proteínas tóxicas de Bt subsp. *israelensis*, o la proteína tóxica antes de vacunar con el fin de eliminar la posibilidad de reacciones cruzadas y falsos positivos.
- Realizar la cuantificación de las proteínas utilizadas para la electroforesis y Inmunoblotting, de tal manera que los resultados sean interpretados con igualdad y las pruebas puedan repetirse en las mismas condiciones.
- Utilizar un marcador de peso molecular de alto rango, que permita una identificación mas precisa del peso molecular de las bandas.
- Utilizar el sustrato BCIP para el revelado de la membrana, lo cual asegura una mayor fidelidad de los resultados.

- Utilizar estas bacterias para la realización de bioensayos con otros tipos de insectos problema de la región, como por ejemplo el mosquito *Aedes aegypti* o *Melanoloma viatrix*.
- Realizar el aislamiento de ADN plasmídico de las cepas endémicas aisladas, dado que ésta prueba sería de gran utilidad para conocer más información acerca de los genes que codifican las proteínas tóxicas y determinar si corresponden a proteínas potencialmente nuevas o ya reportadas.
- Realizar una prueba de PCR utilizando cebadores generales que permitan identificar el tipo de genes *cry* que portan las cepas nativas aisladas para de esta manera poder enfocar potencialmente la actividad bioinsecticida de los aislados y así disminuir el tiempo empleado y los recursos.
- Desarrollar procesos de intercambio de material biológico e información bibliográfica con otras instituciones, i.e., el Instituto Pasteur, el cual puede caracterizar los aislados endémicos SiIEI.Bt y determinar la subespecie.

BIBLIOTECA UIS

BIBLIOGRAFIA

- AREVALO, K. 1993. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. EN: GALAN, L. J. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. Iztacala, México.
- ARONSON, A. L. 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. Mol. Microbiol. 7: 489-496.
- ASCENCIO, P. R & N. TORIFIO. 1995. Caracterización de cepas aisladas de *Bacillus thuringiensis* provenientes de diversos suelos colombianos. Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia.
- Bacillus Genetics Laboratory. 1989. Methods Manual. University of Massachusetts. Second edition.
- BADII, M. H. 1993. Ecología del control microbiano de insectos. EN: GALAN, L. J. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. México.

- BARJAC, H. DE & E. FRACHON. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35: 233-240.
- BOURQUE, S. N., J. R. VALERO, J. MERCIER, M. C. LAVOIE and R. C. LEVESQUE. 1993. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection and Differentiation of the Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *App. Env. Microbiol.* 59: 523-527.
- BRAVO, A. 1995a. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis*. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- BRAVO, A. 1995b. Regulación de la transcripción de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- BRAVO, A., S. SARABIA, L. LOPEZ, H. ONTIVEROS, C. ABARCA, A. ORTIZ, M. ORTIZ, L. LINA, F.J. VILLALOBOS, G. PEÑA, M.E. NÚÑEZ-VALDEZ, M. SOBERON and R. QUINTERO. 1998. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *App. Env. Microbiol.* 64: 4965-4972.

- CAROZZI, N. B., V. C. KRAMER, G. W. WARREN, S. EVOLA and M. G. KOZIEL. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. App. Env. Microbiol. 57: 3057-3061.
- CERON, J., L. COVARRUBIAS, R. QUINTERO, A. ORTIZ, M. ORTIZ, E. ARANDA, L. LINA and A. BRAVO. 1994. PCR Análisis of the *cry I* Insecticidal Cristal Family Genes from *Bacillus thuringiensis*. App. Env. Microbiol. 60: 353-356.
- DE LA RIVA, G., D. PRIETO and R. VAZQUEZ. 1995. Expresión of *Bacillus thuringiensis* - endotoxin gene in transgenic plants. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- DIAZ, T., N. RESTREPO, S. ORDUZ and W. ROJAS. 1993. Distribución y aislamiento de *Bacillus thuringiensis* en Colombia. Rev. Col. Entomol. 19: 35-40.
- EBORA, R. V & M. B. STICKLEN. 1995. Past, Present and Future of the Development of Transgenic Plants with *Bacillus thuringiensis* Genes. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.

- FERNANDEZ, O. 1995. *Bacillus thuringiensis*: Su producción y aplicación en Cuba. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- FINEGOLD, S. M. & W. J. MARTIN. 1983. Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana. Buenos Aires.
- GALAN, L. J. 1993. Historia del descubrimiento de *Bacillus thuringiensis*. EN: GALAN, L. J. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. México.
- GALAN, L. J. & R. TAMEZ. 1993. Estado actual y perspectivas de los bioinsecticidas microbianos. EN: GALAN, L. J. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. México.
- GALAN, L. J., B. PEREYRA, R. TAMEZ y C. RODRÍGUEZ. 1995a. Espectro de acción de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995b, Bogotá, Colombia.
- GALAN, L. J., L. H. MORALES, P. TAMEZ y K. ARÉVALO. 1995c. Formulación de bioinsecticidas basados en *B. thuringiensis* a nivel internacional. 1st

colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.

- GALAN, L. J., H. A. LUNA y H. MEDRANO. 1995. Tendencias mundiales en el uso de biopesticidas. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- GLAZER, A. N & H. NIKAIIDO. 1995. Microbial Biotechnology. Fundamentals of applied microbiology. WH FREEMAN and company. NY.
- HOFTE, H. & H. R. WHITELEY. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53: 242-255.
- INDRASITH, L. S., K. OGIWARA, S. ASANO and H. HORI. 1992. Activated Insecticidal Crystal Proteins from *Bacillus thuringiensis* serovars killed adult house flies. Let in App. Microbiol. 14: 174-177.
- KABLIN, P., P. MOREL and F. GADANI. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). App. Env. Microbiol. 60: 19-25.
- KARP, G. 1996. Cell and Molecular Biology, concepts and experiments. John Wiley & Sons, INC. NY.

- MARTIN, P. A. W & R. S. TRAVERS. 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. App. Env. Microbiol. 55: 2437-2442.
- McGAUGHEY, W. H & M. E. WHALON. 1992. Managing Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. Science 258: 1451-1455.
- MILLER, J. H. 1992. A Short Course in Bacterial Genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. CSHL Press. NY.
- MIMS, C. A., J.H.L. PLAYFAIR, I. M. ROITT, D. WAKELIN and R. WILLIAMS. 1995. Microbiología Médica. Mosby. Doyma Libros, Madrid España. Sec 18.3 y 18.10.
- ORDUZ, S., W. ROJAS, M. CORREA, A. MONTOYA and H. DE BARJAC. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. Jour. Inv. Pathology. 59: 99-103.
- ORDUZ, S., I. THIERY, J. F. CHARLES and W. ROJAS. 1994. Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovar *medellin*. App. Microbiol. Biotechnol. 40: 794-799.

- ORDUZ, S., N. RESTREPO, M. M. PATIÑO and W. ROJAS. 1995. Transfer of Toxin Genes to Alternate Bacterial Hosts for Mosquito Control. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 90: 97-107.
- ORDUZ, S., N. RESTREPO and F. VALLEJO. 1997. Importancia del *Bacillus thuringiensis* en el control de insectos. Innovación y Ciencia. VI: 44-52.
- PALACIO, J. G. 1999. Criterios para prospectar la infraestructura eléctrica requerida para el desarrollo de la Mesa de los Santos en el siglo XXI. Electrificadora de Santander S.A. ESP. Bucaramanga.
- PEREYRA, A. B. 1993. Biosíntesis de la delta endotoxina en *Bacillus thuringiensis*. EN: GALAN, L. J. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. México.
- REALPE, M., D. MONTOYA and S. ORDUZ. 1998. Reseña Bibliográfica. *Bacillus thuringiensis*: Legado para el Siglo XXI. Rev. Colombiana de Biotecnología. 1: 11-27.
- REGUERO, M. T., J. CERON, D. URIBE, C. S. MORA and L. D. AMAYA. 1994. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra endotoxinas con actividad bioinsecticida CRY I, CRY III y CRY IV, asociadas al cristal de tres

cepas patrón de *Bacillus thuringiensis*. Rev. Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 22: 31-35.

- REYNOLDS, R. B., A. REDDY and C. B. THORNE. 1998. Five unique temperate phages from a polylysogenic strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Jour. General. Microbiol. 134: 1577-1585.
- SARJEET, S. G & P. V. PIETRANTONIO. 1995. Mechanism of Action of Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Endotoxins. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- SONENSHEIN, A.L., J. A. HOCH and R. LOSICK. 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington DC.
- SLEPECKY, R. A. & H. E. HEMPHILL. 1992. The Genus *Bacillus*- Nonmedical. IN: BALOWS, A., H. J. TRUPER, M. DWORKIN, W. HARTE and K. H. SCHLEIFER. 1992. The prokaryotes, hand book on the biology of the bacteria: ecophysiology, isolation identification, application. Vol. 2. Springer-Verlag Second edition. NY.

- STAHLY, D. P., R. E. ANDREWS and A. A. YOSTEN. 1992. The Genus *Bacillus*- Insects pathogens. IN: BALOWS, A., H. J. TRUPER, M. DWORKIN, W. HARTER and K. H. SCHLEIFER. 1992. The prokaryotes, hand book on the biology of the bacteria: ecophysiology, isolation identification, application. Vol. 2. Springeld – Verlag Second edition. NY.
- THIERY, A. DELECLUSE, M. C. TAMAYO and S. ORDUZ. 1997. Identification of a Gene for Cyt 1 A-Like Hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and Expression in a Crystal-Negative *B. thuringiensis* Strain. App. Env. Microbiol. 63: 468-473.
- THORNE, C. B. 1968. Transducing bacteriophage for *Bacillus cereus*. Jour. Virol. July. 657-662.
- THORNE, C. B. 1968. Transduction in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. Bac. Rew. 32: 358-361.
- THORNE, C. B. & J. B. KOWALSKI. 1976. Temperate Bacteriophages for *Bacillus lincheniformis*. Reprinted from Microbiol. Amer. Soc. 303-313.
- TOVAR, R. M., C. NÚÑEZ y R. MERCADO. 1993. Bioensayos. EN: GALAN, L. J. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. Mexico.

- TRAVERS, R. S., P. A. W. MARTIN and C. F. REICHELDERFER. 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. App. Env. Microbiol. 53: 1263-1266.
- VALLEJO, F., D. GUTIERREZ and S. ORDUZ. 1995. Ecology and Distribution of *Bacillus thuringiensis*. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- VAN RIE, J. 1995. Biochemical aspects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.
- VAN RIE, J. 1995. Methods to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. 1st Colombian International Workshop of *Bacillus thuringiensis*. August 22-September 1, 1995, Bogotá, Colombia.

CONSULTAS EN INTERNET

1. [http://ianrwww.uni.edu/ianr/entomol/history bug/gallery/house fly drawing.ht](http://ianrwww.uni.edu/ianr/entomol/history%20bug/gallery/house%20fly%20drawing.htm)
Fecha de consulta: octubre de 1999.
2. <http://res.agr.ca/ecorc/apss/fly/house>
Fecha de consulta: octubre de 1999.

3. <http://www.garmischaipartenkirchen.com/gesundheitsamt/seuchen/infektionskrankheiten>

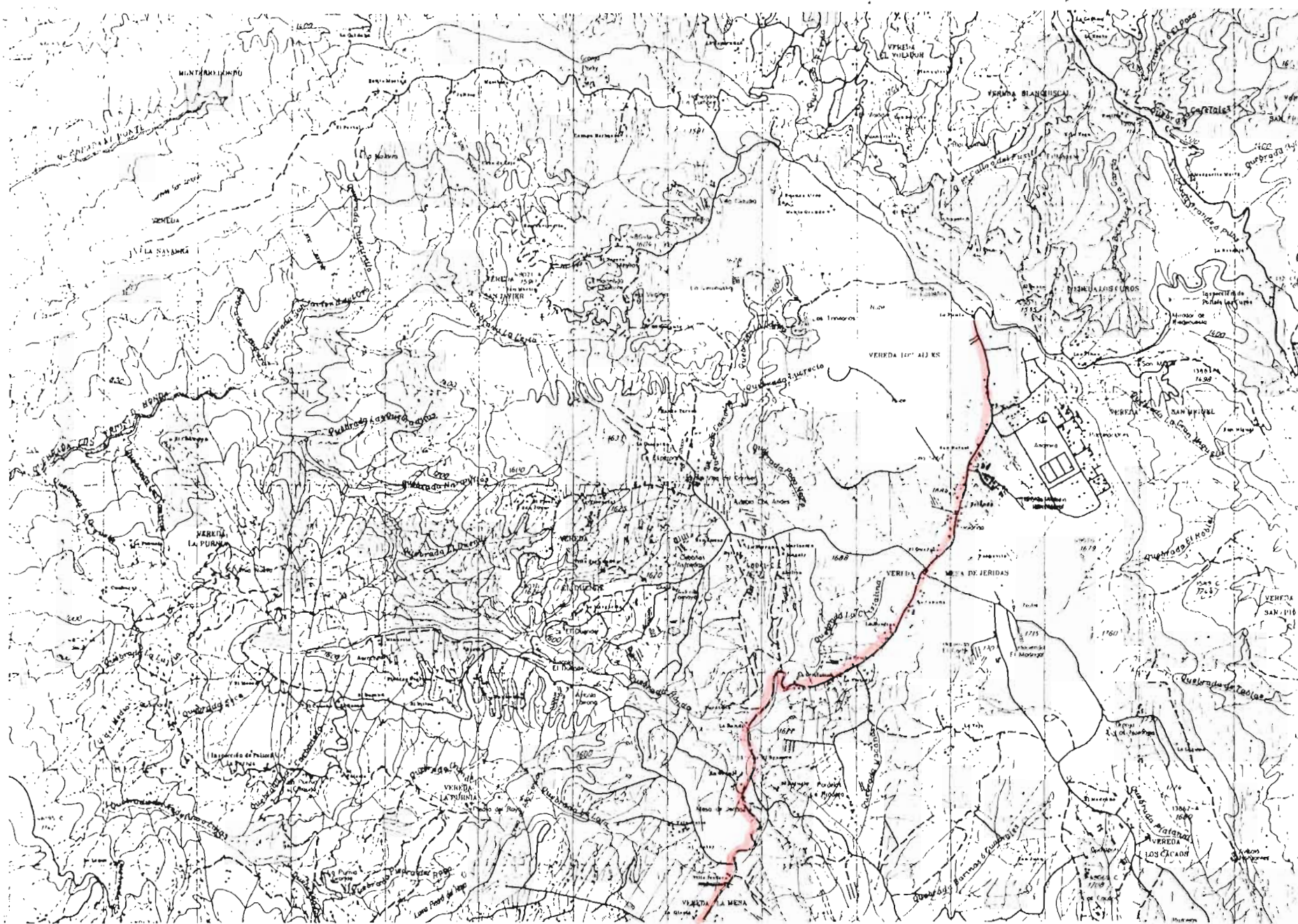
Fecha de consulta: Octubre de 1999.

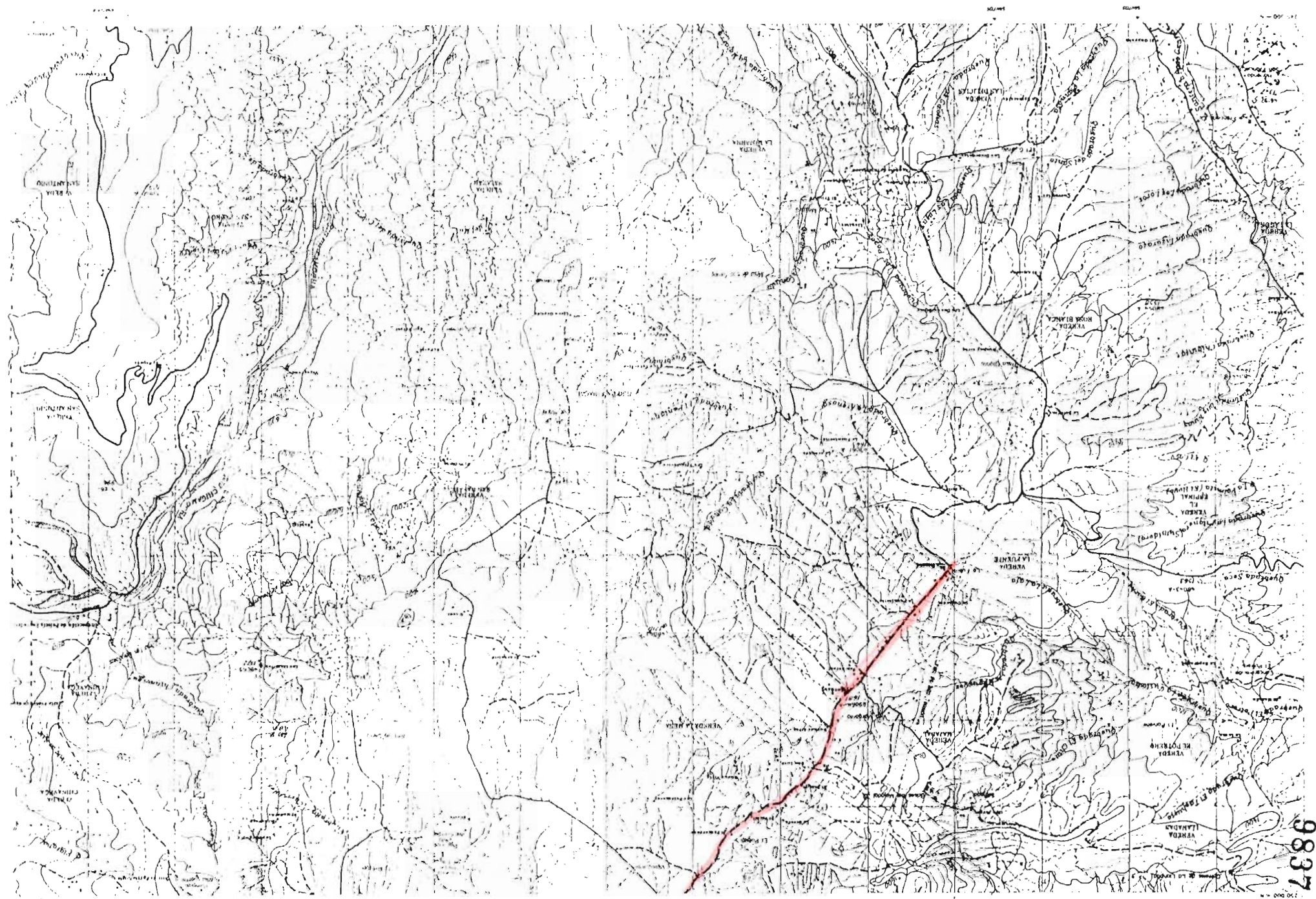
4. <http://parasitology.icb2.usp.br/marcelocp/Musca%20omestica.htm> <http://res.agr.ca/ecorc/apss/fly/house>

Fecha de consulta: Octubre de 1999.

ANEXO UNICO

MAPA DE LA MESA DE LOS SANTOS (S).





9837