

Aislamiento e identificación de *Bacillus Thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas

Isolation and identification of bacillus thuringiensis in plantain, for the production of bioinsecticidas

José Luis Romero Bozzetta¹, Estefany Estrella Canales Carrera¹,
Patricia Katherine Meneses Huacachi¹, Selene Fabiola Herbozo Rondán¹

RESUMEN

Objetivo: Aislar e identificar la presencia de *Bacillus thuringiensis* en suelos de cultivos de plátano. **Métodos:** Se colectaron muestras en suelo de cultivo de plátanos, en 3 puntos diferentes con un área de 400m², a profundidades de 5, 10 y 15 cm en cada punto de muestreo, siendo luego transportadas al laboratorio de Biología donde se realizó el proyecto de investigación. Las muestras se pulverizaron, tamizaron y diluyeron en series hasta 10⁻⁴ en caldo Lauril sulfato, pasteurizadas a 70 °C por 30 minutos, incubándose nuevamente a 30 °C por 18 h. Posteriormente se sembró en un medio nutritivo para bacterias en general (agar nutritivo) e incubados a 30 °C por 24 - 48 h, obteniendo colonias de *Bacillus sp.* Se prosiguió a realizar las siguientes pruebas para identificación de la bacteria: Caldo Nutritivo NaCl al 1% y 5%, además de pruebas bioquímicas como: prueba Catalasa, hidrolisis de almidón, hidrolisis de los tres azúcares, ureasa, hidrolisis de proteínas, hidrolisis de gelatina y fermentación de carbohidratos. Se aplicaron las tinciones con azul de metileno, Gram, Giemsa, Verde de malaquita. **Resultados:** En el aislamiento se encontró presencia de *Bacillus thuringiensis*, las pruebas bioquímicas que determinaron positivo fue agar almidón y agar proteína, con la tinción Gram se identificó como una bacteria Gram (+). **Conclusiones:** Los suelos de cultivo de plátano que fueron muestreados constituyen una fuente para el aislamiento de cepas de *Bacillus sp* dado su presencia mas no por su cuantificación. La presencia de *Bacillus thuringiensis* fue confirmada por sus características morfológicas, culturales y la aparición de cristales esporales característicos.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, aislamiento, rizosfera

ABSTRACT

Objective: To isolate and identify the presence of *Bacillus thuringiensis* in soils of plantain. **Methods:** Samples were collected from soil cultivation of bananas, in 3 different points with an area of 400m², at depths of 10, 15 and 20 cm at each sampling point, then being transported to the laboratory of Biology where the draft was held investigation. Samples were ground, sieved and diluted to 10⁻⁴ in series lauryl sulfate broth, pasteurized at 70 °C for 30 minutes and incubated again at 30 °C for 18 h. Subsequently it plated on nutrient agar and incubated at 30 °C for 24 - 48 hours, obtaining colonies of *Bacillus thuringiensis*. It was continued to perform the following tests for identification of the bacteria: Nutrient Broth NaCl 1% and 5% in addition to biochemical tests: catalase test, starch hydrolysis, hydrolysis of the three sugars, urease, hydrolysis of protein, hydrolysis of gelatin and carbohydrate fermentation. Staining with methylene blue, Gram, Giemsa, Malachite Green were applied. **Results:** In the presence of *Bacillus sp* isolation was found biochemical evidence was determined positive starch and agar agar protein with Gram staining was identified as a Gram (+) bacteria. **Conclusions:** banana growing soils were sampled to provide a source for the isolation of strains of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* presence was confirmed by morphological, cultural characteristics and the presence of characteristic esporales crystals.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, isolation, rhizosphere.

¹ Facultad de Ciencias. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Lima-Perú . Email: jrbozzetta@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los insecticidas químicos han demostrado ser tóxicos para el hombre y otros organismos, creando resistencia en los vectores (Soberón y Bravo, 2007), y provocado trastornos ecológicos irreversibles por su efecto acumulativo (Castro, Nongrados y Mariños, 1999; Cetinkaya, 2002), debido a su lenta degradación y falta de especificidad.

Desde el descubrimiento de *Bacillus thuringiensis* como agente bioinsecticida, la lucha contra los mosquitos vectores ha sido reconocida por la OMS en 1998 como la mejor medida de control de enfermedades metaxénicas. Asimismo se han realizado diversos estudios, tales como, bioensayos de toxicidad (Ochoa y Arrivillaga, 2009).

Bacillus thuringiensis, es una bacteria Gram positiva, aeróbica (Radnedge *et al.*, 2003), se caracteriza por la producción de una inclusión esporas de origen proteico o endotoxina durante la fase de esporulación, responsable del efecto insecticida que se produce cuando son ingeridas por larvas de insectos de diferentes órdenes, tales como Lepidóptera (polillas y mariposas), Díptera (moscas y mosquitos), Coleóptera (escarabajos) e Himenóptera (abejas y avispas), en menor medida son afectados los órdenes Homóptera (cigarras, pulgones y cochinillas) y Mallophaga (piojos) (Schnepf, *et al.*, 1998), incluso afecta otros invertebrados como Platyhelminthes, Sarcomastigophora, (Feitelson y Payne 1992) y Nematoda (Al-Banna y Khyami-Horani, 2004), mientras que en los mamíferos no se ha comprobado efecto alguno (Cerón *et al.*, 1995; Maduell *et al.*, 2007). La actividad tóxica, se extiende a protozoarios, trematodos, ácaros, colémbolos y lombrices de tierra, entre otros de interés agrícola (Velasco, 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de 100 g de suelo de cultivo de plátanos, en 3 puntos diferentes con un área de 400m², a profundidades de 10, 15 y 20 cm en cada punto de muestreo, siendo luego transportadas al laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias donde se realizó el proyecto de investigación. Las muestras se pulverizaron, tamizaron y diluyeron en series hasta 10⁻⁴ en caldo Lauril sulfato, pasteurizadas a 70 °C por 30 minutos, incubándose nuevamente a 30 °C por 18 h. Posteriormente se sembró en agar nutritivo e incubados a 30 °C por 24-48 h.

Se prosiguió a realizar pruebas culturales para identificación de la bacteria tales como: Caldo Nutritivo NaCl al 1% y 5%, además de las pruebas bioquímicas tales como: prueba de la Catalasa, hidrolisis de almidón, hidrolisis de los tres azúcares, ureasa, hidrolisis de proteínas, hidrolisis de gelatina y fermentación de carbohidratos. Se aplicaron las tinciones con azul de metileno, Gram, Giemsa, Verde de malaquita.

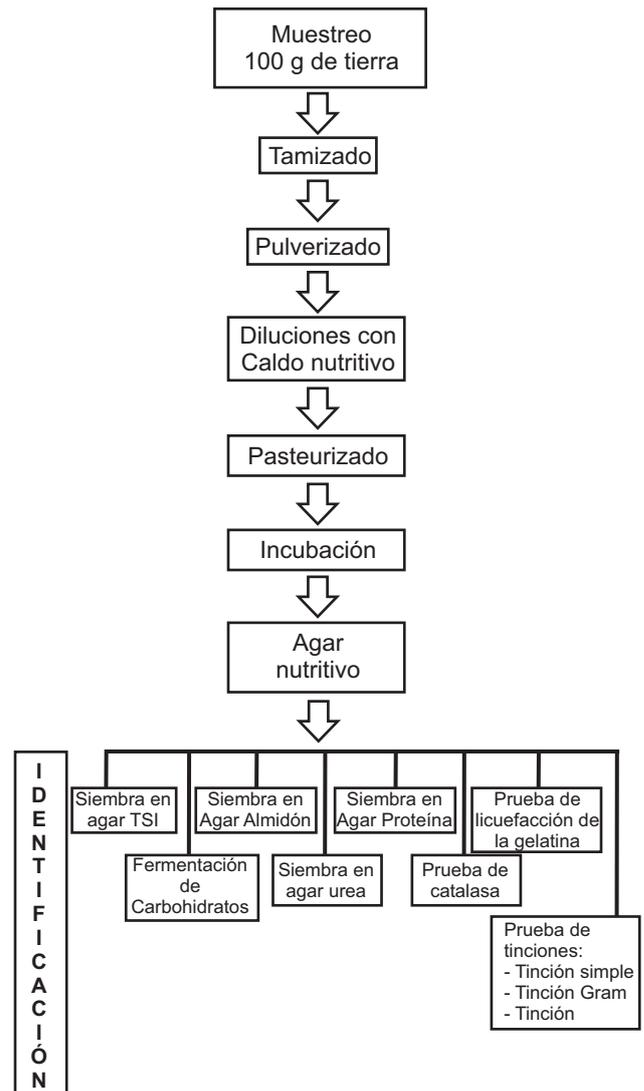


Figura 1: Diagrama de flujo de aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis*.

RESULTADOS

De las muestras recolectadas se aisló y encontró la presencia de *Bacillus thuringiensis*.

Se muestra a continuación las pruebas realizadas para la identificación de *Bacillus thuringiensis* en la tabla 1 y tabla 2.

Tabla 1: Pruebas culturales

Muestra	Profundidad de las muestras (cms)	Resultados
1	10	(+)
	15	
	20	
2	10	(+)
	15	
	20	
3	10	(+)
	15	
	20	

Tabla 2: Pruebas Bioquímicas para la determinación de la *Bacillus Thuringiensis*.

Ensayo	<i>Bacillus Thuringiensis</i> Resultados	Observaciones
Prueba con agar urea	(-)	La bacteria no genera el viraje de color
Prueba con agar almidón	(+)	Formación de un halo claro alrededor del disco
Prueba de catalasa	(+)	Burbujeo debido a la liberación de oxígeno
Prueba con agar proteína	(+)	Formación de halo alrededor del papel filtro lo que indica la capacidad de producir enzimas proteasas
Prueba de fermentación de carbohidratos	(-)	No hay viraje de color
Prueba con agar gelatina	(+)	Se solidifica la gelatina que indica que no se generó la digestión de la gelatina
Siembra en agar TSI	(+)	Se observó pico rojo (alcalino) y fondo amarillo (acidez); esto se debe a que la bacteria es fermentador de glucosa.
Tinción Gram	(+)	Bacteria Gram Positiva por presencia de una coloración violeta
Tinción Verde de Malaquita	(+)	Bacterias bacilares de color verde con endosporas cristalinas
Tinción Giemsa	(+)	Endosporas de color violeta
Tinción Simple (Azul de Metileno)	(+)	Bacterias bacilares, teñidas de azul

DISCUSIÓN

Flores, Egúsquiza., Alcarraz, Woolcott, Benavides, Godoy, Huerta, Jesús y Patiño (2011), plantea en cuanto a la identificación, la presencia de cristales o esporas, los cuales fueron observados en nuestro estudio, a través de la tinción con verde de malaquita. También hace referencia en su estudio que *Bacillus thuringiensis* crece apropiadamente en caldo nutritivo con 1 y 5% de NaCl, que en cuanto a nuestras observaciones también se presenta debido a la turbidez de los caldos mencionados.

Bacillus thuringiensis puede ser capaz de hidrolizar el almidón y fermentar la glucosa y fructosa, pero no puede fermentar la galactosa ni lactosa (Keshavarzi, 2008). En los resultados obtenidos para *Bacillus thuringiensis* se obtuvo que efectivamente hidroliza

almidón, mostrando la formación de un halo alrededor del disco inoculado con *B. thuringiensis*, así como también que fermentan glucosa (ácido/pico alcalino).

Según Tapia & Moreno (2012), nos indica que *Bacillus thuringiensis* posee proteasas capaces de degradar las proteínas de la leche, lo cual se evidenció en nuestra prueba de degradación de proteínas, siendo positiva, luego de formar un halo alrededor del disco con *Bacillus thuringiensis*.

CONCLUSIONES

Los suelos de cultivo de plátano que fueron muestreados constituyen una fuente para el aislamiento de cepas de *Bacillus sp* dado su presencia mas no por su cuantificación.

La presencia de *Bacillus thuringiensis* fue confirmada por sus características morfológicas, culturales y la aparición de cristales esporales característicos.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la alumna Alieska Salazar Cabrera, quien nos brindó su apoyo en la toma y lectura de muestras; así como también al Sr. José Laguna Cauzo, personal administrativo de la Escuela de Biología por su colaboración desinteresada en bienestar de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Banna & Khyami-Horani. (2004). Nematicidal Activity of two Jordanian strains of *Bacillus thuringiensis* on root-knot nematodes. *Nematol. Medit.* 32, 41-45.
- Castro, I., Nongrados, D. & Mariños. C. (1996). Evaluación del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de mosquitos en Loreto, Perú. *Rev. Per. Ent.* 41, 91-95.
- Çetinkaya F. 2002. Master of Science Thesis. Isolation of *Bacillus thuringiensis* and Investigation of Its Crystal Protein Genes. İzmir Institute of Technology.
- Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R, Guereca, L. & Bravo, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11), 826–3831.
- Feitelson, J., Payne, J. & Kim. L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology.* 10, 271–275.
- Flores, A., Egúsquiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, H., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D., Jesus. M. & Patiño, A. (2011). Biodiversidad De *Bacillus thuringiensis* Aislados De Agroecosistemas Peruanos Y Evaluación Del Potencial Bioinsecticida. *Centro de investigación.* 14(1)30–35.
- Keshavarzi, M. (2008). Isolation, Identification and Differentiation of Local *B. thuringiensis* Strains. *Agric. Sci. Technol.* Vol. 10, 493-499.
- Maduell P. 2007. Estudio de la Ecología de *Bacillus thuringiensis* en la hoja. Memoria presentada para obtener grado de Doctor. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología
- Ochoa, G. & Arrivillaga, J. (2009). *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Bol. Mal. Salud Amb.* XLIX(2), Agosto- Diciembre.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J. & Dean, D. H. (1996). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews,* 62(3), 775-806.
- Soberón, M. & A. Bravo. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En: López-Munguía, A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25° aniversario, capítulo 27. Mexico, D.F. UNAM. Pp303-314.
- Tapia f & Moreno P. (2012). Formulación de medios de cultivo y producción de *Bacillus thuringiensis* var. Kurtasi a nivel de laboratorio. Lima, Perú.
- Velasco F. (2010). Estudio de los niveles de expresión temporal del cry 1 en aislados nativos mexicanos de *Bacillus thuringiensis*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.