

BIODIVERSIDAD DE *Bacillus thuringiensis* AISLADOS DE AGROECOSISTEMAS PERUANOS Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOINSECTICIDA

Biodiversity of *Bacillus thuringiensis* isolated from peruvian agroecosystem and evaluation of bioinsecticidal potential

Abad Flores P¹, Rosa M Egúsqüiza Ch¹, Mario Alcarraz C², Juan C Woolcott H¹, Elena Benavides R³, Juan Godoy A³, Doris Huerta C¹, Yisella Jesus M¹, Alejandro Patiño G¹

¹Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Laboratorio de Bioprocesos Industriales, Facultad de Ciencias Biológicas. ³Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

El control de plagas en la agricultura peruana se ha caracterizado por el uso intensivo de plaguicidas químicos; sin embargo, las pérdidas en el rendimiento y la aparición de resistencia en las plagas han llevado a los productores a incrementar el uso de plaguicidas. Este uso indiscriminado genera problemas de contaminación ambiental, muerte de la fauna benéfica, presencia de residuos químicos en los frutos, riesgo de intoxicaciones agudas y crónicas; además, incremento en los costos de producción. Los objetivos propuestos fueron aislar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* de interés biotecnológico de suelos agrícolas peruanos, y evaluar su potencial entomotóxico frente a *Spodoptera frugiperda*. Se aislaron 54 cepas de *Bacillus thuringiensis* de 385 muestras de suelo agrícola de diferentes partes del país. Las observaciones microscópicas mostraron la presencia de cristales parasporales característicos. Las cepas aisladas fueron evaluadas y confirmadas en sus características culturales y bioquímicas. Los bioensayos realizados sobre *Spodoptera frugiperda*, mostraron que la cepa Bt-UNMSM-42 posee una toxicidad superior al resto de las cepas con una media de mortalidad de 39,73% con 50 µg/mL y de 71,93% para 250 µg/mL, con una desviación estándar de 11,30 y 9,98; respectivamente

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, aislamiento, *Spodoptera frugiperda*, toxicidad, entomotóxico.

SUMMARY

The biological control of pests & mites on peruvian agriculture was characterized by the intensive use of chemical pesticides. However, the decrease on yield and the emergence of resistance to pesticides have obligated to farmers to increase chemical pesticide use for plague control. This has caused environmental pollution, beneficial insects death, persistence chemicals residues on fruits, acute and chronic toxicity risks, moreover an increase on production costs. The objectives of this research were to isolate and to characterize *B. thuringiensis* native strains, and) to evaluate entomotoxic potential against *Spodoptera frugiperda*. Were isolated 54 natives strains of *Bacillus thuringiensis* from peruvian agricultural soils. Microscopic morphology showed parasporal crystals characteristic of *B. thuringiensis* diversity. The strains were evaluated and confirmed with biochemistry and growing characteristic. The bioassays performed on *Spodoptera frugiperda* showed the strain BT-UNMSM-42 had the most efficient toxicity with 39,73% mortality to 50 µg/mL and 71,93% mortality to 250 µg/mL, with standard deviation 11,30 and 9,98; respectively.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, isolation, toxicity, *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUCCIÓN

El control biológico mediante el uso de microorganismos causantes de enfermedades en los insectos, normalmente: bacterias, virus, protozoos u hongos, denominados como entomopatógenos, representa una alternativa en el manejo integrado de plagas de importancia económica en agricultura. Este tipo de control tiene un menor impacto ecológico que el uso de plaguicidas químicos. *Bacillus thuringiensis* es considerado como el principal agente promisorio de control biológico de dípteros, lepidópteros y coleópteros; presenta algunas ventajas en relación a los agentes de control químico, es un patógeno de invertebrados muy versátil, infecta protozoos, nemátodos, ácaros e insectos que son plagas fitopatógenas o peligrosas para la salud humana y animal ⁽¹⁾.

Las δ -endotoxinas liberadas por estas bacterias durante su desarrollo son altamente específicas para algunas de las principales plagas agrícolas (acción

entomopatógena) y no tienen efecto sobre otros insectos benéficos, plantas o animales domésticos. Estas proteínas entomopatógenas son producidas como protoxinas que pueden ser solubilizadas y activadas por la acción de proteasas alcalinas durante la esporulación ⁽²⁾.

Los objetivos del presente estudio fueron aislar y caracterizar fenotípica y molecularmente cepas de *B. thuringiensis* de interés biotecnológico en suelos agrícolas peruanos y evaluar su potencial entomotóxico para la producción de insecticidas biológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

Secoleccionaron 375 muestras de 100 g de rizósfera y material vegetal de regiones agrícolas del centro del Perú. Las muestras fueron pulverizadas, tamizadas y diluidas seriadamente hasta 10^{-3} en solución salina peptonada, pasteurizadas a 70 °C por 15 minutos y sometidas a shock térmico. Se

sometieron a un tratamiento térmico a 70 °C por 20 minutos, incubándose nuevamente a 30 °C por 18 h ⁽³⁾. Los cultivos positivos fueron sembrados en agar nutricio e incubados a 30 °C por 24 - 48 h observándose colonias aplanadas, blanco mate, de bordes irregulares, característicos de *Bacillus* spp.

Identificación de *Bacillus thuringiensis*

La identificación de las cepas aisladas se efectuó por observación en microscopía de contraste de fases a 1000X, lo que permitió confirmar la presencia de cristales parasporales (δ -endotoxina) típicos de *B. thuringiensis*. Simultáneamente se prepararon extensiones de los cultivos sobre laminas portaobjetos, secados a 100 °C por 10 minutos y sumergidos en naftaleno negro (1,5 g naftaleno 12B en una mezcla de ácido acético:agua 35:65 v/v) por dos minutos y coloreados con Giemsa R 664.

La confirmación de *B. thuringiensis* se realizó de acuerdo a las características microscópicas culturales y pruebas bioquímicas diferenciales ⁽⁵⁾.

Producción del complejo espора- cristal

Para la producción del complejo espора- cristal ⁽⁶⁾, se utilizaron 12 cepas nativas de *B. thuringiensis* del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, tres cepas referenciales de *B. thuringiensis* HD-11, *B. thuringiensis* var Kustaki HD-342 y *B. thuringiensis* aizawai NRRL-HD-130.

Tabla 1. Características morfológicas microscópicas de cepas de *B. thuringiensis* aislados de diferentes áreas geográficas del Perú.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Coloración		Morfología microscópica	Posición de la espора
	Gram	Giemsa		
BT-UNMSM-1, 15	+	+	Bacilos con extremos romos	Subterminal
BT-UNMSM-5, 6, 19,33,35	+	+	Bacilos con extremos romos	Terminal
BT-UNMSM- 2, 3,4,7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14,16 al 18, 20 al 32, 34, 36 al 54	+	+	Bacilos con extremos circulares	Subterminal

Tabla 2. Tipos de cristales de cepas de *B. thuringiensis* aislados de diferentes tipos de suelos de áreas geográficas del Perú.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Tipo de suelo	Tipo de cristal	Patotipo
BT-UNMSM- 1, 38	Arcilloso	Esférico	II
BT-UNMSM- 2, 6, 7, 34, 35, 36, 37, 43, 44	Arcilloso	Polimórfico	III
BT-UNMSM- 5, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 22, 24, 25, 31, 32, 39, 40, 41, 42, 45, 49, 46, 47, 48, 50, 51	Arcilloso, húmico	Bipiramidal	I
BT-UNMSM- 9, 21, 23, 33	Arcillosos, húmico	Polimórfico	III
BT-UNMSM- 16	Arenoso	Polimórfico	II
BT-UNMSM- 3, 4, 19	Arcilloso	Amorfo	IV
BT-UNMSM-14, 18, 20, 26, 27, 28, 29, 30, 52, 53 y 54	Arenoso	Bipiramidal	I
BT-UNMSM-17	Arenoso	Esférico	II

Las cepas se cultivaron en caldo de leche peptonizada (leche peptonizada 10 g, dextrosa 10 g, extracto de levadura 2 g, MgSO₄·7H₂O 0,3 g, FeSO₄·7H₂O 20 mg, ZnSO₄·7H₂O 20 mg y MnSO₄ 20 mg, completando el volumen a un litro con agua, pH 7,2-7,5) a 28 °C con agitación de 300 rpm por 72 h hasta alcanzar la etapa de autólisis con liberación de cristales y esporas. La suspensión se lavó tres veces por centrifugación con NaCl 1,5 M. Posteriormente, el complejo espора- cristal se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos, el precipitado fue congelado y liofilizado.

Perfil proteico de cristales parasporales

El análisis de proteínas de los cristales parasporales fue realizado por electroforesis en gel de poliacrilamida-

Tabla 3. Características culturales de cepas de *B. thuringiensis* aisladas de diferentes áreas geográficas del Perú.

<i>Bacillus thuringiensis</i>	A. PEMBA	C.N. NaCl 1%	C.N. NaCl 5%	Catalasa	Lecitinasas	Manitol	Glu
BT-UNMSM - 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12 al 54	+	+	+	+	+	-	+
BT-UNMSM - 4, 7, 10	+	+	-	+	+	-	+

Tabla 4. Características bioquímicas de cepas de *B. thuringiensis* aislados de diferentes áreas geográficas del Perú.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Características Bioquímicas						
	Hidrólisis gelatina	Hidrólisis caseína	Arginina DH	Indol	V-P	Rx-NO ₃	Ureasa
BT-UNMSM-1, BT- UNMSM-7	+	+	-	-	+	+	+
BT-UNMSM-2, BT- UNMSM-4, BT- UNMSM- 5 BT-UNMSM-8	+	+	-	-	+	+	-
BT-UNMSM-3, 9,11,12,16 al 21,23 al 25, 29, 31 al 49, 51, 53, 54	+	+	+	-	+	+	-
BT-UNMSM-10, BT-UNMSM-13	+	+	-	-	+	+	+
BT-UNMSM-6	+	+	+	-	+	+	+
BT-UNMSM-14, 22,26 al 28, 30, 50, 52	+	+	+	+	+	+	-
BT-UNMSM-15	+	+	+	+	+	+	+

dodecil sulfato de sodio ⁽⁷⁾. Se utilizó acrilamida al 4 y 10%) para la preparación de los geles de concentración y separación. Las muestras se prepararon a partir de los liofilizados del complejo espora-cristal de las cepas seleccionadas. Se preparó una suspensión de 0,5 mg/mL de liofilizado; de esta se tomó una muestra que se mezcló (1:1) con buffer de carga 2X (Tris-HCl 25 mM, pH 6,8, β-mercaptoetanol 1,28 M, azul de bromofenol 2,89 M, SDS 0,138 M, glicerol 2,17 M). Posteriormente las muestras fueron calentadas por 10 minutos para desnaturalizar las proteínas, se centrifugaron a 12000 rpm/1 min para precipitar las esporas. De estas muestras se utilizó de 1-2 µg para ser cargados en el gel; como marcador de peso molecular y control positivo se utilizó una muestra de la cepa *B. thuringiensis* HD-1, la cual contiene proteínas con propiedades insecticidas de peso molecular 65 y 130 KDa.

La electroforesis se realizó utilizando un potencial de 50 V/ 30 min, y posteriormente a 100 V/1 hora y 30 minutos, usando una solución buffer de corrida a base de Tris-glicina 0,38 M SDS 0,1%, pH 8,8. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R al 0,1% en etanol al 45%, en ac. acético 9%, con un tiempo de tinción de 30 min.

Los geles se destiñeron con etanol al 5% y ac. acético al 7,5%, se secaron para su preservación colocándose entre pliegues de papel celofán a una temperatura de 37 °C por 24 h.

Crianza de las plagas agrícolas

Spodoptera frugiperda Smith (Lepidóptero: Noctuidae) fue propagada en los laboratorios de SENASA – Ministerio de Agricultura.

Selección de cultivo y transporte

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* se recolectaron de cultivos de *Capsicum annuum* Linneo, pimiento y de *Ipomoea batatas*, camote; se buscó en las zonas foliares dañadas de los campos de cultivo, donde se observó su presencia, y se colocaron en envases de plástico para su transporte a los laboratorios de Control Biológico-SENASA del Ministerio de Agricultura. Las larvas colectadas se lavaron con una solución de cloro al 0,02% y se dejaron secar en papel toalla, una vez secas se colocaron individualmente en



Figura 1. Coloración de *B. thuringiensis* con Giemsa R 66.

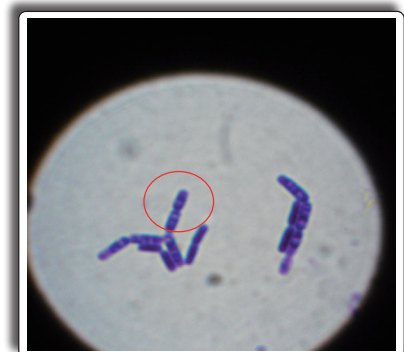


Figura 2. Coloración Gram *B. thuringiensis*.

envases de una onza con dieta artificial constituida por: maíz y frijol de soja molidos, factores de crecimiento y antimicóticos, a fin de facilitar la propagación de las plagas de estudio y determinar su ciclo biológico ⁽⁸⁾.

Las pupas se colocaron en bolsas de papel hasta la emergencia de los adultos. Luego de la oviposición, los huevecillos se colectaron de estas bolsas y se colocaron sobre placas Petri que contenían dieta artificial, hasta su posterior eclosión e individualización.

Evaluación del efecto entomotóxico

Los bioensayos preliminares se llevaron a cabo en 12 cepas seleccionadas del patotipo I: Bt-10, Bt-12, Bt-13, Bt-14, Bt-15, Bt-36, Bt-37, Bt-38, Bt-39, Bt-40, Bt-41 y Bt- 42, y tres cepas referenciales: *B. thuringiensis* var. kurstaki NRRL-HD-342, *B. thuringiensis* var. kurstaki NRRL HD 11 y *B. thuringiensis* var. aizawai NRRL HD 130. Las suspensiones de esporas y cristales se obtuvieron a partir del crecimiento realizado con suspensiones de cultivos de 48-72 h en caldo tripticasa soya, aplicándose

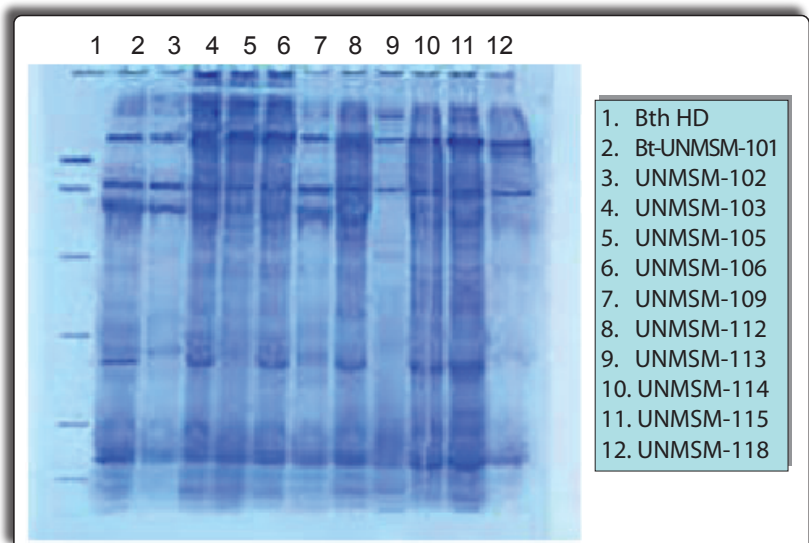


Figura 3. Perfil de proteínas cry electroforesis Sds-page.

Tabla 5. Evaluación del efecto tóxico de cepas de *B. thuringiensis* frente a *Spodoptera frugiperda* Smith, 1^{er} estadio.

Cepas	% Mortalidad M.E	Peso de Larvas (mg)
<i>B. thuringiensis</i> kurstaki NRRL HD-11	92	0,18
<i>B. thuringiensis</i> kurstaki NRRL HD-342	87	0,24
<i>B. thuringiensis</i> aizawai NRRL HD-130	76	0,26
BT-UNMSM-10	12	4,95
BT-UNMSM-12	42	4,24
BT-UNMSM-13	35	3,82
BT-UNMSM-14	38	3,65
BT-UNMSM-15	48	3,25
BT-UNMSM-36	30	3,05
BT-UNMSM-37	56	2,98
BT-UNMSM-38	25	2,88
BT-UNMSM-39	75	2,72
BT-UNMSM-40	51	2,52
BT-UNMSM-41	45	0,48
BT-UNMSM-42*	82	0,36

% M = Porcentaje de mortalidad
M.E = Medias estadísticamente diferentes según Test de Tukey ($p \leq 0,051$)

Tabla 6. Bioensayos preliminares de cepas de *B. thuringiensis* nativas con actividad entomopatogena frente a *Spodoptera frugiperda*.

Cepas	Dosis $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje de Mortalidad	
		x	δ
<i>B. thuringiensis</i> kurstaki HD-1	50	59,2	
	250	86,5	3,42
<i>B. thuringiensis</i> kurstaki HD 342	50	64,2	
	250	82,5	3,62
<i>B. thuringiensis</i> aizawai	50	69,2	
	250	84,5	3,82
BT-UNMSM-10	50	5,08	5,17
	250	8,56	5,92
BT-UNMSM-12	50	15,44	4,74
	250	28,06	6,07
BT-UNMSM-13	50	10,26	4,88
	250	19,30	3,04
BT-UNMSM-14	50	8,51	7,70
	250	24,56	3,04
BT-UNMSM-15	50	12,19	6,23
	250	28,08	6,07
BT-UNMSM-36	50	10,53	5,27
	250	18,04	3,08
BT-UNMSM-37	50	20,79	5,66
	250	29,98	8,04
BT-UNMSM-38	50	5,17	5,26
	250	8,77	3,04
BT-UNMSM-39	50	17,10	1,44
	250	30,08	3,04
BT-UNMSM-40	50	18,42	10,37
	250	29,82	6,07
BT-UNMSM-41	50	17,19	10,81
	250	28,07	3,03
BT-UNMSM-42*	50	39,73	11,30
	250	71,93	9,98

% M = Porcentaje de mortalidad; δ = Desviación estándar; * = Cepa seleccionada

alícuotas de diluciones 10^7 y 10^8 sobre dietas artificiales donde se criaban larvas del primer estadio de *Spodoptera frugiperda*. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se hizo un análisis cualitativo en base al mayor porcentaje de mortalidad en el menor tiempo y a la menor concentración. Las cepas seleccionadas como promisorias, en base a este criterio, se utilizaron para continuar con la investigación.

El efecto entomotóxico de las δ -endotoxinas de las cepas seleccionadas fue evaluado siguiendo las pautas indicadas en las referencias 9 y 10. Se utilizaron larvas del patotipo I y II de *Spodoptera frugiperda* de tamaño y peso uniforme, criadas durante 48-72 h con dieta artificial. Cada muestra liofilizada se resuspendió en agua destilada con Tween 20 al 0,02%, incorporándose 50-250 $\mu\text{g/mL}$ del complejo espora-cristal de cada muestra, al tratamiento seleccionado en la dieta artificial; se consideraron 15 cepas de *B. thuringiensis*. Se utilizaron 20 larvas por tratamiento con tres repeticiones independientes. El testigo negativo contenía agua destilada estéril y Tween 20 al 0,02%. Los bioensayos se incubaron bajo condiciones de insectario por siete días, antes de cuantificar la mortalidad, la cual fue registrada hasta el séptimo día después del tratamiento. La relación dosis-mortalidad se estimó aplicando el análisis Probit ⁽¹¹⁾.

Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. thuringiensis ha sido aislado del suelo, filósfera, insectos muertos, productos almacenados, excreta de animales vegetarianos etc, hallándose que aproximadamente del 30 al 100% de bacterias esporuladas de la filósfera correspondía a *B. thuringiensis* ⁽¹²⁾. Otra especie del mismo género, *B. sphaericus*, ha sido aislado del suelo, aguas estancadas e insectos muertos ⁽¹³⁾.

La descripción de colonias, morfología microscópica y cristales enmascarados reportados en el presente trabajo, concuerdan con las observaciones de Chatterjee *et al* ⁽¹⁴⁾.

Se ha observado que la mayor parte de especies de Lepidoptera, Díptera y Coleóptera pueden ser controladas por una variedad de serotipos de *B. thuringiensis*, que han sido aislados y caracterizados fenotípica y molecularmente. Algunos de estos ya han sido comercializados directamente como formas nativas o indirectamente como microorganismos o plantas transgénicas ⁽¹⁵⁾.

En el Perú no se ha reportado ningún trabajo relacionado con el aislamiento y caracterización de *Bacillus thuringiensis*, por lo que nuestro trabajo representa la primera contribución respecto a la biodiversidad de *B. thuringiensis* en suelos agrícolas nacionales.

Las tablas 1 y 2 muestran las características morfológicas y microscópicas de cepas de *B. thuringiensis* aisladas de diferentes áreas geográficas del Perú y los tipos de cristales parasporales asociados a un determinado patotipo. Se aprecia el aislamiento de tres patotipos en

base a la morfología de los cristales parasporales; la forma predominante correspondió al patotipo I, con cristales bipiramidales en 32 cepas, seguido del patotipo III con 12 aislamientos, 7 cepas del patotipo II y tres del patotipo IV. Se ha observado por microscopía de contraste de fases la presencia de cristales enmascarados dentro del exosporio de las cepas Bt-3, Bt-4 y Bt-9⁽¹⁶⁾.

Las características culturales y bioquímicas de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas se muestran en las tablas 3 y 4, correspondiendo la mayoría de sus colonias a formas circulares de 6 - 8 mm de diámetro, aplanadas, opacas y de color blanco mate, bordes ondulados o rizoides; la morfología microscópica corresponde a bacilos rectos, de extremos redondos o romos, Gram (+), con esporas ovales subcentrales o terminales.

Los diferentes patotipos de *B. thuringiensis* aislados de suelos agrícolas peruanos se muestran en la tabla 4; se aprecia el aislamiento de cuatro patotipos en base a la morfología de los cristales parasporales; la forma predominante correspondió al patotipo I con cristales bipiramidales (34 cepas), siguiendo el patotipo III con 14 aislamientos y cuatro cepas del patotipo II y dos del patotipo V. Se ha observado por microscopía de contraste de fases la presencia de cristales enmascarados dentro del exosporio de las cepas: Bt-UNMSM-3, Bt-UNMSM-4 y Bt-UNMSM-19, acorde con las observaciones de Roberts *et al.*⁽¹⁶⁾.

En relación con el comportamiento cultural sobre agar PEMBA (Fig. 1 y 2), la mayoría de las cepas aisladas mostraron el comportamiento característico del género *Bacillus*, desarrollándose como colonias grandes de 6-8 mm de diámetro, no fermentan manitol y producen lecitinasa, todas son catalasa positiva, fermentan glucosa, crecen apropiadamente en caldo nutricio con 1 y 5% de NaCl, no desarrollan en caldo nutricio con 8% de NaCl y no crecen anaeróticamente. Dan reacción Voges-Proskauer positiva, un 80% da reacción negativa al indol, todas reducen nitratos a nitritos, son arginina dehidrolasa variables y ureasa variables. Todas las cepas mostraron una reacción positiva a la gelatinasa e hidrólisis de caseína, característica deseable en el proceso de producción para substratos ricos en hidrolizados de caseína (Fig. 3). La producción de esporas que no deforman el soma bacteriano, la producción de cuerpos parasporales, la positividad para catalasa, reducción de nitratos a nitritos y la reacción Voges Proskauer confirman que los microorganismos pertenecen al grupo I de *Bacillus* sp, entre los cuales se ubica *B. thuringiensis*⁽¹⁷⁾.

Evaluación de efecto entomotóxico

Los resultados de los bioensayos preliminares se muestran en las tablas 5 y 6. La cepa Bt-42 presentó un grado de entomotoxicidad a las 120 horas en relación las cepas referenciales de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki NRRL-HD 342, *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki NRRL-

HD 11 y *Bacillus thuringiensis* var. aizawai NRRL-HD 130, con las que se realizó el análisis comparativo y que mostraron actividad entomocida con una concentración de 1×10^8 esporas/mL a las 96 horas.

Se encontró que la cepa Bt-42 fue la mejor con una media de porcentajes de mortalidad corregidos de 39,73% para 50 µg/mL y 71,93% para 250 µg/mL, con una desviación estándar de 11,30 y 9,98, respectivamente, contra *Spodoptera frugiperda*. El resto de las cepas presentaron un porcentaje de mortalidad menor al 50% en ambas concentraciones. La toxicidad en porcentaje de mortalidad contra el insecto-blanco fue baja en la mayoría de las cepas.

La cepa Bt-UNMSM-42 presentó mayor toxicidad contra el insecto blanco *S. frugiperda*. Por esta razón en base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares (tabla 6), se seleccionó esta cepa, luego se procedió con el mismo extracto a determinar la DL₅₀.

Para los bioensayos con *S. frugiperda* se seleccionó como dosis menor 50 µg/mL y mayor 250 µg/mL. El criterio que se utilizó para determinar estas dosis fue el porcentaje de mortalidad en los ensayos preliminares.

La toxicidad, en porcentaje de mortalidad contra los dos insectos-blanco, fue muy baja en la mayoría de las cepas; la cepa Bt-UNMSM-12 presentó la mayor toxicidad contra el insecto blanco *S. frugiperda*. Por esta razón, en base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se seleccionó la cepa Bt-UNMSM-12 que demostró toxicidad superior al resto. Una vez seleccionada la cepa se procedió con el mismo extracto a determinar la DL₅₀. Para los bioensayos con *S. frugiperda* se seleccionó como dosis menor 30 µg/mL y mayor 500 µg/mL.

CONCLUSIONES

- Los suelos agrícolas nacionales muestreados constituyen una excelente fuente para el aislamiento de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.
- La presencia de *Bacillus thuringiensis* fue confirmada por sus características morfológicas, culturales y la presencia de cristales parasporales característicos.
- El patotipo predominante de cristal parasporal fue el bipiramidal correspondiente al patotipo del gen *Cry I*.
- La cepa Bt-UNMSM-42 mostró la mejor actividad entomotóxica sobre *Spodoptera frugiperda*, con una media de mortalidad de 39,73% para 50 µg/mL y 71,93% para 250 µg/mL, convirtiéndola en una candidata potencial para el diseño de procesos de producción de bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* nativos, con potencial entomocida frente a *S. frugiperda* y lepidópteros asociados a plagas agrícolas.

Agradecimientos.- A CONCYTEC y CSI-UNMSM por el financiamiento al proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferré J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *Syst Appl Microbiol* 1999; 22: 179-85.
2. Martin PAW, Travers RS. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55(10): 2437-42.
3. Aronson A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(3): 417-25.
4. Del Rincon-Castro MC, Mendez Lozano J, Ibarra J. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del Maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Folia Entomol Mex* 2006; 45 (2): 157-64
5. Pérez E, Piedra F, Blanco E. Manejo integrado de *Spodoptera frugiperda*. *Boletín Técnico* 2,1-68, INISAV. La Habana, 1997.
6. Ramos F, Carmona A, Beres M, Mendez N. Evaluación de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxico a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioagro* 2004; 16(3): 183-88.
7. Finney DJ. Probit analysis. 3th ed. S. Chand & Company. Ram Nagar, New Delhi, 1981. p. 333.
8. Thiery I, Frachon E. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In: *Manual of techniques in insect pathology*. Lacey LA. Acad. Press, USA, NY, 1997. p. 409.
9. Attathom T, Chanpaisang J, Chongrattanamateekul W, Siriyan R. Morphological diversity and toxicity of delta-endotoxin produced by various strains of *Bacillus thuringiensis*. *Bull Entomol Res* 1995; 85:167-73.
10. Rampersad J, Ammons GA. *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol* 2005; 5: 52.
11. Chatterjee SN, Bhattacharya T, Dangar TK, Chandra G. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6 (13): 1587-91.
12. Ceron J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L, Bravo A. Specific PCR primers directed to identify *cry I* and *cry III* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3826-31.
13. Chak KF, Chao DC, Tseng MY, Kao SS, Tuan SJ, Feng TY. Determination and Distribution of *cry*-Type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2415-20.
14. Chatterjee TW y col. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution δ -endotoxin diversity and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bull Entomol Res* 1998; 88(3): 335-42.
15. Chilcott CN, Wigley PJ. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 1993; 61(3): 244-7.
16. Roberts GM, Pauli S, Rodgers P, Burges HD. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization and activity against insect pest. *J Invertebr Pathol* 1997; 70(1): 59-68.
17. Johnson C, Bishop AH. A technique for the effective enrichment and isolation of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* 1996; 142(2-3): 173-77.

Manuscrito recibido el: 16/05/2011

Aceptado para su publicación el: 09/06/2011

Correspondencia:

Nombre: Abad Flores Paucarima

Dirección: Jr. Puno 1002 – Lima 01 - Perú

e-mail: serbiotecsa@hotmail.com