

# Aislamiento de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en Boyacá

JEIMY M. POVEDA\*  
JOHN WILSON MARTÍNEZ O.\*\*

---

\* Bióloga - Joven Investigadora, 2008 - 2009  
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia  
Grupo Manejo Biológico de Cultivos - GMBC  
Correo: jeimypo@yahoo.com

\*\* Ingeniero Agrónomo - Tutor  
Correo: john.martinez@uptc.edu.co

## INTRODUCCIÓN

Ha transcurrido más de medio siglo desde el inicio de la era de los plaguicidas de síntesis química, que han representado la principal alternativa para el control de numerosos insectos plaga, especialmente en el sector agrícola; el uso de estos se ha incrementado paulatinamente, debido a su eficacia, sin tenerse en cuenta el grave daño que ocasionan al medioambiente y a los seres vivos. Pero desde principios del siglo pasado han existido alternativas a los insecticidas químicos, como el denominado “Control biológico”, al cual se le habían desconocido sus ventajas comparativas respecto a los químicos, en cuanto a seguridad, eficacia y, sobre todo, menor impacto ambiental.

La nueva orientación ecológica y sustentable de la agricultura ha reconocido el uso de enemigos naturales, y de sus productos para reducir las poblaciones de insectos, como una herramienta valiosa dentro de los programas de manejo integrado de plagas (MIP) en diferentes cultivos; se evidencia así su compatibilidad y complementariedad ecológica con otras estrategias alternas de control de plagas, como el control cultural, genético y etológico, entre otras [1, 2].

Las bacterias constituyen uno de los grupos más estudiados como agentes de control de plagas en el ámbito mundial. De ellas, la familia Bacillaceae ha sido la más estudiada, dado que incluye todas las bacterias patógenas obligadas y la mayoría de las facultativas; las especies de esta familia son altamente virulentas y tienen gran capacidad invasiva y de producción de toxinas [3]. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es, sin duda, la bacteria más representativa, por sus características de alta especificidad en el control biológico [4] de insectos plaga pertenecientes a diferentes órdenes taxonómicos, en cultivos como algodón, arroz, maíz, papa, forestales, etc., e igualmente hacia insectos vectores de enfermedades.

El mercado de productos insecticidas biológicos reposa en gran medida en el uso y comercialización de *Bacillus thuringiensis* [5], en forma de polvos, granulados, aerosol y líquidos concentrados emulsionables [6]. Las ventas de productos formulados con estas cepas han aumentado en un 20% en los últimos años [7], y en la actualidad, tales productos representan el 2% del mercado total de insecticidas en el mundo [8]. Los formulados de Bt han sido usados durante más de dos décadas como insecticidas biológicos para el control de insectos, especialmente lepidópteros [9], en cultivos agrícolas y contra vectores de enfermedades humanas [10].

Dadas las características de *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico, y debido a su presencia cosmopolita, se ha intensificado la búsqueda y el establecimiento de colecciones de *Bt* en el mundo, en virtud de que sus productos actualmente son los insecticidas de origen biológico de mayor importancia en la agricultura [11].

El desarrollo de un producto para el control biológico de plagas a partir de una cepa entomopatógena de *Bt* requiere varias etapas; la primera de ellas es la identificación y caracterización de los aislados existentes en la región y su conservación. Durante las últimas décadas se han llevado a cabo un gran número de programas de aislamientos de bacterias, principalmente de *Bt*, en todo el mundo; lo que ha conducido al establecimiento de colecciones que suman alrededor de 40.000 aislados, muchos de los cuales pertenecen a empresas privadas y multinacionales [12]. Los programas de aislamiento tienen como finalidad, además de la identificación de nuevas cepas, encontrar genes nuevos que codifiquen proteínas más tóxicas que los productos conocidos comercialmente, o que confieran una actividad frente a especies que no son sensibles a las proteínas Cry conocidas. Esta búsqueda de nuevos genes Cry suele estar orientada al desarrollo de nuevos productos con rangos de acción más amplios o a la generación de organismos genéticamente modificados (OMG), principalmente plantas transgénicas, es decir, portadoras de un gen ajeno o exógeno que se denomina transgén, buscando minimizar los riesgos de ataque y la selección de poblaciones de insectos resistentes [13, 14].

La implementación de *Bt* en programas MIP involucra grandes esfuerzos de investigación básica y aplicada para identificar cepas o proteínas potencialmente útiles; esto ha hecho que en Colombia algunos grupos de investigación incursionen en este campo y poco a poco se logren obtener resultados sobre la utilidad de cepas nativas de *Bt* en el control de plagas en nuestro país. Por esta razón, el Grupo Manejo Biológico de Cultivos, de la Uptc, ha abordado esta temática, con el fin de generar reportes sobre la diversidad de este microorganismo en Boyacá.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pertenece a la familia Bacillaceae y se ubica dentro del grupo I del género *Bacillus*; forma parte del complejo *Bacillus cereus*, que incluye a *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. mycooides*; con los dos primeros se encuentra

estrechamente relacionado, al punto de que no se distingue por completo de ellos, ya que no existen suficientes diferencias en sus características morfológicas y bioquímicas (tabla 1); por ello su designación ha estado sometida a discusión [8, 9]. A pesar de esto, se reconoce la individualidad de estas especies, basándose en la presencia de la inclusión o cristal paraesporal (ICP´s) y de sus propiedades insecticidas [4].

De acuerdo con lo anterior, *Bt* es una bacteria aeróbica, nativa del suelo, ampliamente distribuida en el ambiente, Gram positiva, de flagelación peritrica; mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y desarrolla esporas elipsoidales de resistencia que no distienden el esporangio (figura 1). Se caracteriza por que en la fase de esporulación produce una inclusión paraesporal ICP´s [9, 15], formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica y tóxicos para distintos invertebrados, especialmente para larvas de insectos [9], que pueden presentar distintas morfologías [15, 16]. Estas proteínas, llamadas delta-endotoxinas, son codificadas por los genes *Cry* [9] y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial [4, 11]; hasta el momento, hay más de 30 tipos de proteínas *Cry* descritas, y se han clonado y secuenciado alrededor de 166 genes [17]. Una colonia de *Bt* aislada en una caja de petri muestra una morfología circular, de color café claro, con aspecto harinoso y textura cerosa (figura 2).

## AISLAMIENTO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

El uso de *B. thuringiensis* como controlador biológico de plagas, al parecer, se remonta al antiguo Egipto [18]. El interés por los insecticidas microbianos data de mediados del siglo XIX, con las investigaciones efectuadas por Pasteur, en 1849, de la enfermedad del gusano de seda *Bombix mori*, las cuales enfocaron la atención de los bacteriólogos en los insectos plagas y en el descubrimiento de un sinnúmero de enfermedades microbianas de insectos. Sin embargo, el descubrimiento de *B. thuringiensis* se acredita al científico japonés Shigetane Ishiwata (1901), quien aisló una bacteria aeróbica formadora de spora a partir de una larva muerta del gusano de seda *Bómbix mori* y la bautizó *Bacillus soto*; su identificación como agente entomopatógeno y su denominación se deben a su redescubrimiento en 1911 por Berliner, en el distrito de Thuringia (Alemania), a partir de larvas muertas de la palomilla de la harina, *Ephestia kuhniella sep*; Berliner identifica el “microbio” aislado como una especie nueva y propone el nombre de *Bacillus thuringiensis* [19].

La cepa empleada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales es por excelencia *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* (HD1), aislada en

1970, originalmente por Dulmage, quien fue la responsable de que los productos a base de esta bacteria pudieran competir con los insecticidas químicos en términos de eficiencia y eficacia, constituyéndose en la piedra angular en la historia de *B. thuringiensis* [4].

En 1938 se introdujo en el mercado el primer producto comercial bajo el nombre de Sporoin, cuyo principio activo eran las esporas de Bt [20]; desde allí hasta hoy existe un interés creciente en buscar e identificar nuevos aislados para desarrollar productos más avanzados.

Específicamente en Colombia, el Departamento de Investigaciones Agropecuarias, el Programa de Entomología del Instituto Colombiano agropecuario (ICA), junto con otras entidades del sector, tales como el Instituto de Fomento Algodonero (IFA) y la Federación de Fomento Algodonero, constituyeron los polos de desarrollo de la entomología económica y del control biológico [21]. Es así como en 1963 se inicia en Colombia la investigación sobre el efecto de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de plagas Lepidópteras en cultivos de maíz bajo condiciones de laboratorio, que resultó efectivo contra larvas de tierreros y trozadores del maíz [22]. En el año 1964, Juan Raigosa, entomólogo del IFA, presenta un informe detallado sobre el resultado de las aplicaciones de *Bt* y su efectividad para combatir *Heliothis sp* en cultivos algodoneiros del Valle del Cauca [21]. Actualmente, Corpoica cuenta con un Banco de Cepas Nativas de *B. thuringiensis*, compuesto por más de 3.000 aislamientos procedentes de diversos ecosistemas o regiones geográficas, que constituye una muestra bastante representativa y un recurso genético importante de la variabilidad existente de este microorganismo en nuestro país [23].

En la misma vía de conocer nuestra diversidad, la Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), de Medellín, ha descrito, caracterizado y estudiado una subespecie de Bt denominada *Medellin*, e igualmente ha desarrollado trabajos con subespecies de *B. thuringiensis* tóxicas contra mosquitos [24-26]. El grupo de biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional sede Bogotá (IBUN) cuenta, igualmente, con una colección de *Bt* con más de 400 aislados; este grupo también ha estandarizado técnicas de identificación molecular de dichas colecciones, basadas en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), usando “primers” generales y específicos para diferenciar los grupos *Cry* [27, 28] y métodos de bioensayo para establecer la toxicidad en diferentes plagas de importancia agrícola, como *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* [27], *Premnotrypes vorax* y *Tecia solanivora* [30, 31]; del mismo modo, ellos han trabajado en la obtención de formulados tales como

polvos, granulados, polvos mojables y microencapsulados elaborados a base de *Bt* [1, 27-30, 32, 33].

Un efecto de la investigación en control biológico con *Bt* en Colombia fue la propuesta de creación de la Red Nacional de *Bacillus thuringiensis*, conformada por instituciones como la Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Corpoica, Vecol, Instituto de Inmunología y el IBUN [1]; sin embargo, esta iniciativa no fue continuada.

La investigación dirigida al uso de entomopatógenos ha sido llevada a cabo, además de las instituciones mencionadas anteriormente, por universidades como la de los Andes, Javeriana, de Cundinamarca, Jorge Tadeo Lozano y, más recientemente, la Pedagógica y Tecnológica de Colombia; así mismo, por el Instituto de Biotecnología Mariano Ospina Pérez, Coltabaco, Cenipalma, Cenicafe y empresas de agrobiológicos con representaciones en Colombia como Laverlam y Valent, entre otras.

Aunque la mayoría de estudios han explorado el uso de *Bt* en plagas de los órdenes lepidóptera y díptera, en los últimos años, gracias a la continua investigación, se han desarrollado y diseñado trabajos con cepas y proteínas tóxicas para otros grupos taxonómicos [17], lo cual ha ampliado las perspectivas de investigación y explotación comercial de esta bacteria. Los cultivos en los que más se ha trabajado son café, hortalizas, leguminosas, cereales, papa y pastos.

## INVESTIGACIÓN SOBRE *BACILLUS THURINGIENSIS* EN BOYACÁ

Boyacá es un departamento predominantemente agrícola, que surte de alimentos a buena parte de las regiones central y norte de Colombia. Con el objetivo de lograr cultivos sanos y cosechas abundantes, que proporcionen el máximo beneficio económico, los agricultores utilizan diversos productos químicos para controlar las plagas y enfermedades que se presentan en sus lotes de producción. El empleo de estos productos en forma indiscriminada ha generado desequilibrios graves y de difícil manejo en estos agroecosistemas, requiriéndose incrementar cada día el uso de estos insumos de síntesis química, lo que favorece la contaminación ambiental, la resistencia en los insectos-plaga, el descontrol en las cadenas tróficas y, en muchos casos, un efecto directo contra la salud de los consumidores.

La apertura de mercados y la tendencia hacia la globalización, así como la concientización y las mayores exigencias de los consumidores respecto de la calidad de los alimentos de origen agrícola, incrementan día tras día las restricciones a la

presencia de residuos químicos en estos. En un mercado internacional, donde la competencia adquiere mayor importancia, la agricultura colombiana y boyacense debe mantener, además de la calidad, unos bajos costos de producción; para lograrlo se requiere generar alternativas de solución a las problemáticas de manejo fitosanitario en los cultivos, acordes con las condiciones climáticas, sociales, culturales y geográficas de sus respectivas regiones. Las alternativas de control biológico, que empleen nuestra propia diversidad, pueden constituirse en herramientas valiosas que contribuyan a lograr dichos objetivos [34].

De acuerdo con lo anterior, el Grupo Manejo Biológico de Cultivos (GMBC), de la Uptc, dentro de la línea de investigación “Manejo biológico de insectos plaga”, adelanta una estrategia de búsqueda y establecimiento de una colección de agentes para el control microbiológico de plagas agrícolas, enfocada inicialmente a cepas nativas de *B. thuringiensis*. Un proyecto desarrollado en el 2006, en colaboración con el grupo de biopesticidas de la Universidad Nacional de Colombia, permitió obtener cerca de 120 aislamientos, dando así inicio a la caracterización de la diversidad de *Bacillus thuringiensis* en Boyacá; este proyecto fue nominado al premio “Francisco Luis Gallego”, al ser presentado en el XXXIII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, por ser pionero en el desarrollo de trabajos sistemáticos sobre caracterización de la diversidad de *Bacillus thuringiensis* en el departamento; en dicho proyecto se recolectaron 71 muestras de suelo provenientes de zonas con bosques naturales y zonas agrícolas en ocho municipios de la Provincia Centro del departamento de Boyacá (Chíquiza, Samacá, Motavita, Oicatá, Soracá, Siachoque, Tunja y Tuta); la colección obtenida se caracterizó en términos microbiológicos y bioquímicos, iniciando de esta manera un censo biótico de Bt que servirá de apoyo para cumplir con las metas de manejo biológico de insectos plaga en la región, constituyendo la base para la creación de la “Colección de microorganismos entomopatógenos nativos de Boyacá”.

Con el fin de complementar la caracterización del material conservado, en términos de su actividad biológica, en el 2007 se continuó el proceso iniciado, con un segundo proyecto que pretendió la caracterización de la colección en términos biológicos y moleculares, a través de una alianza entre grupos del programa de Ingeniería Agronómica (GMBC) y de la Escuela de Biología (Grupo de Estudios en Genética y Biología Molecular, GEBIMOL). Dentro de este estudio se evaluó, mediante ensayos biológicos con *T. solanivora*, la actividad tóxica de 30 aislamientos nativos de *B. thuringiensis* presentes en la colección del laboratorio de control biológico y se están realizando los análisis moleculares respectivos.

A partir de esta colección se pretende realizar estudios relacionados con la determinación de la actividad tóxica de las cepas hacia insectos plaga de interés agrícola en la región, lo cual puede dar pie a desarrollos posteriores.

## RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DEL GMBC CON AISLADOS NATIVOS DE *Bt*

Dentro de los resultados más relevantes se tiene que entre las 120 cepas de *Bt* obtenidas de suelos boyacenses, el 77,6% provenían de zonas de ecosistemas agrícolas y el 22,4% restante, de zonas de bosque natural. La mayoría de los aislamientos obtenidos en suelos de bosques naturales y de cultivo de cereales presentaron cristales muy visibles de forma bipiramidal; sin embargo, se observó una cepa con inclusiones de tipo triangular, cuadrado y redondo (figura 3), característica poco común, según datos semejantes registrados en la literatura [2]. En general, más del 50% de las cepas obtenidas a partir de ecosistemas agrícolas mostraron un perfil electroforético definido entre 60 y 130 kilodalton (kDa).

En el área de entomología del GMBC se estableció una colonia de *T. solanivora* (polilla guatemalteca de la papa) en todos sus estadios biológicos, la cual puede contribuir en posteriores estudios (figura 4); se seleccionó este insecto como modelo para los bioensayos con *Bt* porque genera grandes pérdidas en el cultivo de la papa en Boyacá [35], ya que sus larvas penetran el tubérculo y forman galerías a medida que se alimentan y se desarrollan, con lo que demeritan su aspecto y la calidad para consumo [36]. Se realizó seguimiento a los diferentes estados de desarrollo de los insectos, seleccionando el material requerido para los bioensayos y para el mantenimiento de las colonias. Se establecieron pruebas biológicas preliminares con 30 cepas nativas de *Bt* pertenecientes a la colección del GMBC. Se empleó la técnica de prismas de papa parca pastusa impregnados con una suspensión de esporas y cristales de cada una de las cepas por evaluar [29], que fueron luego infestados con larvas de *T. Solanivora* de primer instar. Las cepas evaluadas se multiplicaron e incubaron en medio LB a 30 °C. La concentración de esporas de cada una de las cepas fue determinada en cámara de Neubauer y microscopio óptico. Aquellas cepas que presentaron mortalidades en *T. solanivora* superiores al 70% se seleccionaron para evaluar, posteriormente, su concentración letal media ( $CL_{50}$ ), mediante bioensayos, y la caracterización molecular de sus genes *Cry1*, mediante la técnica de PCR. En los bioensayos se evaluaron de manera independiente aquellas cepas que mostraron mayor efectividad en el ensayo preseleectivo.

Partiendo de una suspensión inicial de la biomasa de la bacteria obtenida de una caja de petri se efectuaron diluciones seriadas. En cada dilución se determinó la



concentración de esporas en cámara de Neubauer y se realizó el bioensayo respectivo empleando el método de impregnación de primas. Se usaron placas de poliestireno de 24 pozos con 2 réplicas por dilución para un total de 240 larvas por cepa y un testigo con agua destilada estéril. El porcentaje de mortalidad de larvas en cada bioensayo se ajustó mediante fórmula de Abbott [37]. La relación dosis-mortalidad se estimó mediante análisis Probit [38], usando el programa computacional Polo-PC (LeOraSoftware, 1987). Adicionalmente se determinó un perfil de proteínas paraesporales (ICP's) en geles de poliacrilamida (datos no mostrados), siguiendo los protocolos de SDS-PAGE al 9% en condiciones denaturantes [39, 40]. El 50% de las cepas evaluadas presentaron mortalidad cercana al 50%, lo que indica un potencial para encontrar aislamientos para el manejo de otros Lepidópteros plaga en nuestra región.

En la actualidad se está realizando la estandarización del protocolo para la extracción de DNA y las condiciones de la técnica de PCR para la identificación de genes *cry1* en las cepas nativas seleccionadas por su mayor actividad tóxica sobre *T. solanivora*.

## CONCLUSIONES

Los estudios realizados sobre *B. thuringiensis* han demostrado que existen variedades ya establecidas en las distintas localidades y con potencial de control de varias plagas de importancia agrícola; este aspecto es muy importante para seleccionar cepas patógenas promisorias adaptadas al medio agroecológico, para lograr el éxito en el control de una plaga en particular.

Existe un número limitado de bioplaguicidas registrados ante el ICA, aunque en el mercado es creciente la oferta de bioplaguicidas no registrados, que en la mayoría de los casos no cumplen con los requisitos de control de calidad exigidos y cuya actividad biológica no está respaldada por resultados experimentales serios y representativos. Por lo anterior, es necesario continuar las investigaciones que aporten conocimiento sobre la diversidad de entomopatógenos de nuestros ecosistemas y que puedan soportar desarrollos tecnológicos de impacto en nuestra región.

Es necesario que el gobierno y las instituciones dedicadas al crecimiento y fortalecimiento de la investigación en el sector agrícola establezcan incentivos para quienes desarrollen bioplaguicidas de óptima calidad; así mismo, para quienes han iniciado la caracterización de nuestra biodiversidad con el fin de generar productos que suplan las necesidades del sector agrícola colombiano.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor Jorge Orlando Blanco, de la Escuela de Biología de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, por la revisión y sugerencias al presente escrito.

## REFERENCIAS

- [1] Cerón J., Uribe, D., Grosso V., Martínez W. Biotecnología - investigación aplicada. Alternativas de control biológico. En: 75 maneras de generar conocimiento en Colombia. Casos seleccionados por los programas nacionales de ciencia, tecnología e innovación. Colciencias. Pp. 34-35. 2006.
- [2] Yara E., Cerón J., Uribe D. Caracterización de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* provenientes de bosque natural y zonas de cultivos colombianos. *Revista Colombiana de Entomología*. 25(3-4): 185-190. 1999.
- [3] Benintende G., Márquez A. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Capítulo 4. Bacterias entomopatógenas. Buenos Aires, Argentina. pp.. 61-72. ISBN 950-43-6937-5, 1996.
- [4] Sauka D.H., Benintende G.B. *Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos Lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 124-140. 2008.
- [5] Cardona M. C. Entomología económica y manejo de plagas. Palmira. Universidad Nacional de Colombia. 1998.
- [6] Glare T., O'Callaghan M. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. John wiley & sons, chichester, UK. 2000.
- [7] Adams L.F., Liu C.L., Macintosh S, Stamen R.L: Diversity and biological activity of *Bacillus thuringiensis*. En: Crop protection agents from nature. Natural products and analogues. Coppin e. L. Editor. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. Reino Unido. Pp. 360-386. 1996.
- [8] Bravo A., Cerón J.: *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Ed. Buena Semilla. Bogotá, Colombia. 2004.
- [9] Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 775-806. 1998.

- [10] Díaz T., Restrepo N., Orduz S., Rojas W. Distribución y aislamiento de *Bacillus thuringiensis* en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 19(2): 35-40. 1993.
- [11] Kalmikova G., Burtseva L., Lysenko A. Identification and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains by molecular methods. En: 38 the annual meeting society for invertebrate pathology program and abstracts. August 7-11. Alaska. 2005.
- [12] Lambert B., Peferoen M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* 42(2): 112-121. 1992.
- [13] González C.J. Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P., Ferré J., editores. Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas, pp. 169-187. 2001.
- [14] Fujimoto H., Itoh K., Yamamoto M., Kyojuka J. K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/technology* 11:1151-1155. 1993.
- [15] Hofte H., Whiteley R. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53:242-255. 1989.
- [16] Rodríguez M.M., De la Torre M.M., Urquijo N.E.U. *Bacillus thuringiensis*: Características biológicas y perspectivas de producción. *Rev Lat Amer Microbiol*. 33: 279-292. 1991.
- [17] Rosas-García M.N. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Colombiana de Biotecnología* 10(1): 43-63. 2008.
- [18] Nester E, Thomashow L.S., Metz M., Gordon M. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. Disponible en: <http://www.Asmusa.Org>. 2002.
- [19] Berliner E: Ueber die schalaffsucht der mehlmotenraupe (*Ephestia kuhniella* zell.) und ihren erreger *Bacillus thuringiensis* n. Sp. *Z. Angeww. Entomol.* 2:29-56. 1915.
- [20] Nester E, Thomashow LS, Metz M, Gordon M: 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. Disponible en: <http://www.Asmusa.Org>. 2002.
- [21] Rodríguez D. Uso de entomopatógenos en Colombia. Seminario. Sociedad Colombiana de Entomología. Comité Regional de Cundinamarca. Bogotá, D.C. Octubre 12. pp 3-9. 2001.
- [22] Revelo M. Efecto del *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre algunas plagas de lepidópteros del maíz, bajo condiciones tropicales. Bogotá (Colombia). *Revista agricultura tropical*. 21: 393-395. 1965.

- [23] Hernández J. Caracterización microscópica, bioquímica y molecular de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* en Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Departamento de Postgrado en Biología. Santafé de Bogotá. Tesis de postgrado. 188 p, 1997.
- [24] Orduz S., Díaz T., Thiery I., Rojas W. Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovar medellin. *Appl. Microbiology biotechnology*. 40: 794-799. 1994.
- [25] Restrepo N, Patiño M, Díaz T, Tamayo MC, Orduz S: Características bioquímicas, inmunológicas y toxicológicas de las proteínas el cristal de *Bacillus thuringiensis* subsp. Medellín. *Revista Colombiana de Entomología*. 22(1): 69-75. 1996.
- [26] Gutiérrez P., Alzate O., Orduz S. A theoretical model of the tridimensional structure of *Bacillus thuringiensis* subsp. Medellín cry 11bb toxin deduced by homology modelling. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96: 357-364. 2001.
- [27] Cerón J., Covarrubias L., Quintero R., Ortiz A., Ortiz M., Aranda E., Lina L., Bravo A. PCR, analysis of the cryII insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 60: 353-356. 1994.
- [28] Cerón J., Ortiz A., Quintero R., Guereca L., Bravo A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3826-3831. 1995.
- [29] Martínez W. Evaluación de la unión de delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en vesículas de las microvellosidades del intestino del gusano blanco de la papa. Trabajo de tesis de maestría en entomología. Facultad de agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 53 p., 2000.
- [30] Martínez W., Uribe D., Cerón J. Efecto tóxico de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología* 2003; 29: 89-93.
- [31] Castelblanco A. Diseño de una metodología para evaluar la actividad bioplaguicida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas de primer instar de *Tecia solanivora* Povolny en laboratorio. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 63 p. 2000.
- [32] Martínez W. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. Capítulo 9. En: Bravo, Alejandra; Cerón, Jairo. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Ed. Buena Semilla Bogotá, Colombia. pp. 207-232. 2004.
- [33] Uribe D., Martínez W., Cerón J. Distribution and diversity of genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 119-127. 2003.

- [34] Poveda J., Martínez W., Grosso V., Cerón J. Diversidad de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* provenientes de suelos boyacenses. Sociedad Colombiana de Entomología. Resúmenes del XXXIII Congreso. Manizales, julio 26, 27 y 28. P. 52. 2006.
- [35] López-Ávila A. Insectos plaga del cultivo de la papa en Colombia y su manejo. Capítulo V - MIP en el cultivo de la papa. En: Papas colombianas 2000, con el mejor entorno ambiental. 25 años FEDEPAPA. Ventana al Campo Andino 3 (1-2): 152-159. 2000.
- [36] Niño L. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. Suplemento *Revista Latinoamericana de la Papa*. 4-21. 2004.
- [37] Ciba-Geigy. Manual de ensayos de campo. Cómo realizar un bioensayo. Bogotá. Pp. 14-18. 1978.
- [38] Finney D. J. Probit analysis, 3a. edición. Cambridge. University Press. London. 333 p, 1971.
- [39] Laenmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 1970.
- [40] Schagger H., Von J. G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kda. *Anal Biochem* 166: 368-379. 1987.
- [41] Bravo A., Sarabia S., López L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., Ortiz M., Lina L., Villalobos F. J., Peña G., Núñez-Valdez M. E., Soberon M., Quintero R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4965-4972. 1998.
- [42] M. He WA, Kaderbhai M.A. A simple single-step procedure for small scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Research* 18: 1660. 1990.
- [43] Crickmore. N.: The diversity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. En: Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application (Ed. J. F. Charles, A. Delécluse y C. Nielsse-Leroux), Kluwer academic publishers, Dordrecht., pp. 41-64. 2000.

Tabla 1. Principales pruebas bioquímicas utilizadas para distinguir los distintos miembros del complejo *Bacillus*.

PRUEBAS	<i>B. Cereus</i>	<i>B. Anthracis</i>	<i>B. Mycoides</i>	<i>B. Thuringiensis</i>
Diámetro de la célula vegetativa	> 1 $\mu$ M	> 1 $\mu$ M	> 1 $\mu$ M	> 1 $\mu$ M
Cristal paraesporal	-	-	-	+
Anaerobiosis	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	+
Lecitina de huevo	+	+	+	+
Crecimiento en lisozima	+	+	+	+
Ácidos a partir de D-glucosa	+	+	+	+
Ácidos a partir de L-arabinosa	-	-	-	-
Ácidos a partir de D-xylosa	-	-	-	-
Ácidos a partir de D-manitol	-	-	-	-
Hidrólisis del almidón	+	+	+	+
Hidrólisis de la caseína	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+
Catálisis de la Tirosina	X	+	*	*
Catálisis del citrato	X	+	X	+
Catálisis del propionato	*	*	*	*

\*: No determinado.

X: Variación significativa entre los distintos aislados.

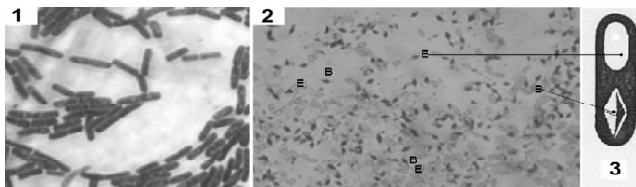


Figura 1. Microfotografía de la célula vegetativa, esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* con tinción cristal violeta a un aumento de 100X. 1) Forma vegetativa de *Bacillus thuringiensis*. 2) Formación de inclusiones de cuerpos paraesporales (ICP's). E=esporas; B=Cristales de forma bipiramidal. 3) Espora elipsoidal posición subterminal. Fuente: [www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/)

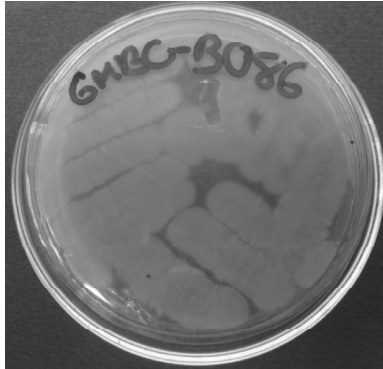


Figura 2. Aspecto típico de un aislamiento nativo de *Bacillus thuringiensis* crecido en medio de cultivo LB. Fuente: Autores.

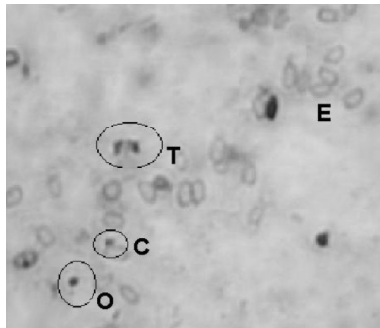


Figura 3. Visualización microscópica de la cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* GMBC-B003 que presenta tres tipos diferentes de cristal paraesporal: Triangular (T), Cuadrado (C), Redondo (O). Igualmente se observan grupos de esporas (E). Fuente: Autores

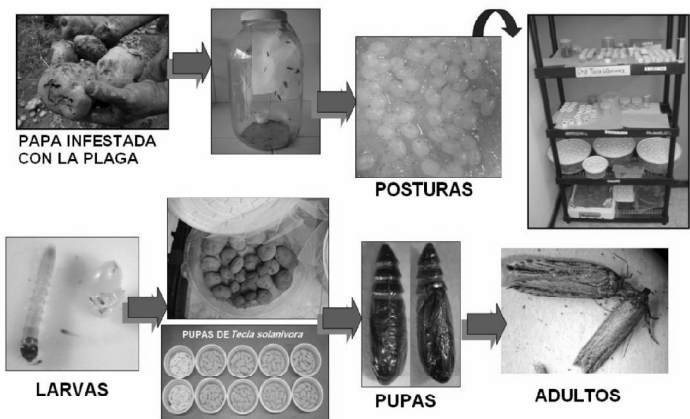


Figura 4. Esquema que muestra la metodología de establecimiento y mantenimiento de la Colonia de *Tectia solanivora* Povolny en condiciones controladas en el área de entomología del laboratorio de control biológico del GMBC (UPTC). Fuente: Autores.