

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“DETECCIÓN DE  $\beta$ -EXOTOXINA EN CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*  
MEDIANTE BIOENSAYOS CON LARVAS DE *Musca domestica*”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**BACH. FANY PATRICIA RAMOS CCOÑISLLA**

**ASESORES:**

**Dra. ROSA BERTHA ALTAMIRANO DÍAZ**

**Dr. JUAN CARLOS TANTALEÁN VÁSQUEZ**

**ICA – PERÚ**

**2019**

El presente trabajo está dedicado a Dios, por ser fuente de inspiración en mi vida, por las fuerzas que me da día a día para cumplir mis metas. A mis padres que siempre me brindan su amor, comprensión y apoyo, a mis hermanos, profesores, gracias a ellos he logrado llegar hasta aquí.

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por estar presente no solo en esta etapa importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona, gracias a él que esta meta está cumplida.

A mi familia, a mis padres Policaria Ccoñislla Mariño y Modesto Celestino Ramos Tito, por los valores y principios que me han inculcado, por sus consejos y confianza brindada. A mis hermanos Kiara y Walter por siempre apoyarme. A mis padrinos Rosa y Armando por todos sus consejos brindados.

A la Dra. Rosa Bertha Altamirano Díaz y al Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez, por brindarme su amistad, confianza, por haberme asesorado con empeño y paciencia durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Diego Sauka del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola INTA, Argentina, por remitir gentilmente la cepa *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2.

A mis docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Biología de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga, por haberme transmitido conocimientos y experiencias a lo largo de mi carrera profesional.

Al Laboratorio BIOSLAB, por facilitarme materiales y equipos para la realización de la presente tesis.

## ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	5
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	9
3.1. Material biológico:.....	9
3.1.1. Cepas bacterianas.....	9
3.2. Métodos:.....	9
3.2.1. Producción de filtrados extracelulares de cepas de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> .....	9
3.2.1.1. Reactivación de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	9
3.2.1.2. Activación de genes productores de toxinas.....	10
3.2.1.3. Producción y conservación de filtrado extracelular....	11
3.2.2. Determinación cualitativa de la actividad nociva de $\beta$ -exotoxina de <i>B. thuringiensis</i> mediante bioensayos con larvas de <i>M.</i> <i>domestica</i> . ....	11

3.2.2.1. Captura de adultos de <i>M. domestica</i> .....	11
3.2.2.2. Obtención de huevos y larvas de <i>M. domestica</i> .....	12
3.2.2.3. Obtención de pupas y adultos de <i>M. domestica</i> .....	13
3.2.2.4. Determinación cualitativa de la producción de $\beta$ - exotoxinas de <i>B. thuringiensis</i> .....	14
3.2.2.4.1. Método para ensayos múltiples.....	15
3.2.2.4.2. Método estándar.....	15
3.2.3. Extracción de ADN de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	16
3.2.4. Detección del gen <i>thuE</i> .....	18
3.2.4.1. Amplificación mediante PCR del gen <i>thuE</i> .....	18
3.2.4.2. Electroforesis de ADN y visualización de productos de PCR.....	19
IV. RESULTADOS.....	20
V. DISCUSIÓN .....	26
VI. CONCLUSIONES.....	30
VII. RECOMENDACIONES .....	31
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
IX. ANEXOS .....	46

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es un microorganismo que se utiliza en el control biológico de distintas plagas, debido a que sintetiza un cristal proteico con acción insecticida muy específica. Sin embargo, esta bacteria también produce una  $\beta$ -exotoxina llamada “thuringiensina”, la cual es un potente insecticida contra larvas de distintos órdenes de insectos y tóxica para humanos y animales; por lo que se tiene que detectar si se quiere utilizar en el sector agrícola. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de  $\beta$ -exotoxina en cepas de *B. thuringiensis*, mediante bioensayos con larvas de *Musca domestica*.

Se emplearon 14 cepas nativas de *B. thuringiensis* aisladas de larvas de *Copitarsia incommoda* y larvas de tercer estadio de *M. domestica*. Para la detección del efecto toxigénico se utilizaron métodos de ensayos múltiples y estándar. Mediante el uso de partidores específicos y la técnica de PCR se investigó la presencia del gen *thuE*, que participa en la síntesis de la toxina turingiensina.

Ninguna de las cepas evaluadas mostró actividad toxigénica contra larvas de *M. domestica*, tampoco se logró amplificar el gen *thuE*. Se concluye que todas las cepas evaluadas no producen la  $\beta$ -exotoxina.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -exotoxina, *thuE*, PCR, Bioensay

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* is a microorganism that is used in the biological control of different pests, because it synthesizes a protein crystal with very specific insecticidal action. However, this bacterium also produces a  $\beta$ -exotoxin called "thuringiensin", which is a potent insecticide against larvae of different orders of insects and toxic to humans and animals; so you have to detect if you want to use in the agricultural sector. The objective of the present work was to detect the presence of  $\beta$ -exotoxin in strains of *B. thuringiensis*, by bioassays with larvae of *Musca domestica*.

We used 14 native strains of *B. thuringiensis* isolated from *Copitarsia incommoda* larvae and larvae of third stage of *M. domestica*. Multiple and standard assay methods were used to detect the toxigenic effect. Through the use of specific primers and the PCR technique, the presence of the *thuE* gene, which is involved in the synthesis of the turingiensin toxin, was investigated.

None of the tested strains showed toxigenic activity against larvae of *M. domestica*, nor was it possible to amplify the *thuE* gene. It is concluded that all strains evaluated do not produce  $\beta$ -exotoxin.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -exotoxin, *thuE*, PCR, Bioassay

## I. INTRODUCCIÓN

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria que posee actividad entomopatógena y por lo tanto es importante y tiene una alta demanda en los sectores agrícolas. Debido a que coloniza el intestino de las larvas del insecto susceptible, *B. thuringiensis* se utiliza a menudo en la agricultura<sup>16</sup>, silvicultura<sup>66</sup> y los programas de salud pública como un agente de control biológico<sup>18, 32</sup>.

*B. thuringiensis* es una bacteria cosmopolita debido a su capacidad de vivir en diferentes ecosistemas terrestres como zonas de alta montaña, estepas, bosques tropicales, desiertos, etc<sup>7, 52, 64</sup>. Otros nichos ecológicos donde se puede encontrar *B. thuringiensis* son el filoplano de plantas, residuos de molienda de granos o polvo de silos, insectos sanos, enfermos o muertos, telarañas, aguas estancadas y los fondos de lugares anegados donde se desarrollan larvas de mosquitos<sup>27, 38, 46, 53, 55, 57, 59, 65</sup>. Esta especie tiene forma bacilar, es Gram positiva, aerobia facultativa, esporulada, cuyo tamaño oscila entre 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  de ancho y de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo<sup>60</sup>. Pertenece al reino Eubacteria, a la familia Bacillaceae y al género Bacillus junto con *B. cereus* y *B. anthracis*. Sus células vegetativas presentan flagelos peritricos y mediante su crecimiento celular y su proceso de esporulación sintetizan factores de virulencia insecticida, como las exotoxinas y endotoxinas. Estas últimas son consideradas como el principal responsable del efecto insecticida, como inclusiones cristalinas parasporales<sup>56</sup>. Después de la lisis celular éstos cristales proteicos son liberados al medio con diferente rango de acción biocida<sup>31, 33, 51</sup>.

Entre las exotoxinas de *B. thuringiensis* la más importante es la beta seguida en importancia por la alfa y la gamma, éstas son una fosfolipasa C y lecitinasa, respectivamente<sup>22</sup>. Existen dos tipos de  $\beta$  exotoxinas (Tipo I y II)<sup>34</sup>, la  $\beta$ -exotoxina Tipo I, es llamada thuringiensina (Thu), es un metabolito secundario con actividad insecticida para una amplia gama de especies de insectos<sup>6, 15, 20, 34</sup>.

La  $\beta$ -exotoxina tipo I es un análogo de nucleótido de adenina, de bajo peso molecular (701 Da), la estructura de la  $\beta$ -exotoxina tipo I está compuesta de cuatro precursores: adenosina, glucosa, un grupo fosfato y diácido glucónico, en una relación molecular de 1:1:1:1, es termoestable y conserva su bioactividad a 121 °C durante 15 minutos<sup>17, 35, 61</sup>. La toxicidad de esta  $\beta$ -exotoxina, probablemente se deba a la inhibición de la síntesis de ARN por competencia con el ATP<sup>35, 61</sup>.

La  $\beta$ -exotoxina de tipo II fue descubierta en *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* serotipo 8ab, purificada y parcialmente caracterizada y es muy activa contra el escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, es un análoga al uracilo (UTP) y presenta una mayor toxicidad que el tipo I, principalmente a los coleópteros<sup>34, 47, 48</sup>. Las cepas que producen thuringiensina tipo II no albergan el gen *thuE* en sus plásmidos y, por lo tanto, estas exotoxinas están codificadas por otros genes<sup>58</sup>.

Sin embargo, debido al bajo número de estudios sobre este tipo de toxina, la estructura sigue siendo desconocida<sup>29, 43</sup>.

La  $\beta$ -exotoxina es tóxica contra dípteros, coleópteros y lepidópteros<sup>25</sup>, su toxicidad afecta la muda y la pupación; a dosis subletales, causan efectos

teratológicos<sup>8</sup>. También afecta a mamíferos y es persistente en el medio ambiente<sup>3, 29, 37</sup>. Además se ha descrito que tiene una acción mitogénica<sup>63</sup>, aunque existe controversia sobre este punto<sup>13, 42</sup>.

Las cepas de *B. thuringiensis* que producen exotoxinas no deben usarse para el control de orugas, escarabajos, mosquitos o larvas de mosca negra, o al menos sus productos comerciales finales deberían estar claramente libres de  $\beta$ -exotoxina<sup>45</sup>. Sin embargo, las preparaciones de  $\beta$ -exotoxina se han utilizado con eficacia para controlar las larvas de la mosca en porquerizas, aseos letrinas y el compost, cuando los insectos son resistentes a los productos químicos y en dosis insecticidas que no afectan a los vertebrados<sup>11, 12</sup>.

Se han descrito varios métodos para la detección de  $\beta$ -exotoxina<sup>26</sup>, los tradicionales son la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y los bioensayos de toxicidad con larvas de nematodo de *Caenorhabditis elegans*<sup>54</sup>, *Musca domestica* y otros insectos<sup>19, 28, 34, 36, 58</sup>. Aunque el límite de detección del método RP-HPLC es bueno y es relativamente un procedimiento rápido<sup>26</sup>, RP-HPLC no evalúa la toxicidad directamente y existe el riesgo de obtener falsos negativos<sup>28</sup>. El bioensayo de toxicidad es el método tradicional para detectar la  $\beta$ -exotoxina<sup>26, 28</sup>. Aunque se podrían usar otros sistemas de bioensayo de insectos. Los bioensayos con *M. domestica* suelen ser más sensibles para la detección de actividad de  $\beta$ -exotoxina<sup>5, 9, 34, 36, 41, 44</sup>. Sauka<sup>(58)</sup> propone un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la rápida predicción de la producción de thuringiensina de tipo I por detección del gen *thuE*, fuertemente asociado con la síntesis de este tipo de exotoxina.

En el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología se dispone de cepas de *B. thuringiensis* aisladas a partir de larvas *Copitarsia incommoda*, colectadas de diferentes campos de cultivo de espárragos en nuestra Región<sup>24</sup>. En estudios previos se han detectado genes que expresan delta endotoxinas como el *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*<sup>1</sup>; *cry2*<sup>4</sup> y *vip3*<sup>50</sup>. Sin embargo, aún no se conoce cuáles de estas cepas expresan  $\beta$ -exotoxina para poder realizar ensayos de aplicación en cultivos de la región.

En el presente trabajo se planteó realizar la detección de la  $\beta$ -exotoxina tipo I mediante la realización de bioensayos con larvas de *M. domestica*.

Para ello se tuvo como objetivos: producir filtrados extracelulares de cepas de *B. thuringiensis*, determinar cualitativamente y cuantitativamente la actividad nociva de la  $\beta$ -exotoxina de cepas de *B. thuringiensis*, mediante bioensayos con larvas de *M. domestica* y detectar el gen *thuE* que participa en la síntesis de la  $\beta$ -exotoxina, mediante amplificación por PCR.

## II. ANTECEDENTES

A nivel internacional se han documentado los siguientes estudios:

**Levinson y col. (1990)** en Estados Unidos, desarrollaron una separación mejorada de cromatografía líquida de alto rendimiento para detectar y cuantificar la producción de beta-exotoxina en sobrenadantes de cultivo de *B. thuringiensis*. Las producciones de exotoxina le asignaron a un plásmido presente en cinco cepas, de tres subespecies (*B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* serotipo 1, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* serotipo 9, y *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* serotipo 10). Descubrieron una nueva exotoxina, llamada beta-exotoxina de tipo II en *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* serotipo 8ab; ésta fue purificada y parcialmente caracterizada. Este material es más específico que la beta-exotoxina tipo I y es muy activo contra el escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*.

**Hernández y col. (2001)** en Francia, demostraron el uso de bioensayos para determinar la presencia de actividad de beta-exotoxina, comparando resultados de HPLC y bioensayos con *Ephestia kuhniella* (Lepidoptera Pyralidae). La exotoxina beta de tipo I solo se detectó en cepas de tipo que representan los serotipos H1, H9 y H10a, 10b. Se encontraron discrepancias entre la HPLC y los bioensayos en H8a, 8b y algunas cepas insecticidas, lo

que sugiere la aparición de otra toxina soluble diferente de la exotoxina tipo I, posiblemente la beta-exotoxina tipo II. Sin embargo, la HPLC es una técnica rápida y sensible si solo se debe determinar la exotoxina tipo I.

**Hernández y col. (2003)** en España, reportaron la posible relación entre los serovares de *B. thuringiensis* y la producción de  $\beta$ -exotoxina. Utilizaron un ensayo específico de HPLC para la  $\beta$ -exotoxina de tipo I, para detectar esta exotoxina en sobrenadantes de cultivos de 100 cepas pertenecientes a cuatro serovares de *B. thuringiensis*: *thuringiensis*, *kurstaki*, *aizawai* y *morrisoni*. Para cada serovar, se analizaron 25 cepas seleccionadas aleatoriamente de dos colecciones españolas. La frecuencia de la producción de  $\beta$ -exotoxina fue mayor en *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis*, mientras que sólo dos cepas de serovar *kurstaki* mostraron una producción de  $\beta$ -exotoxina. Reportaron que de las 25 cepas pertenecientes a serovars *aizawai* y *morrisoni* ninguna produjo este compuesto.

**Obeidat y col. (2012)** en Jordania, examinaron cepas de *B. thuringiensis* para detectar la presencia de endotoxinas libres de  $\beta$ -exotoxinas no hemolíticas. De ellos, 45 cepas de *B. thuringiensis* produjeron endotoxinas con actividad insecticida específica contra *Drosophila melanogaster* y/o larvas de *Ephestia kuhniella*. La  $\beta$ -exotoxina termoestable se observó solo en 15 cepas de *B. thuringiensis* y pareció mostrar una actividad insecticida no específica dual contra las larvas de *D. melanogaster* y *E. kuhniella* y mostró

hemólisis in vitro para eritrocitos humanos. Se encontró que la  $\beta$ -exotoxina fue producida por cepas de *B. thuringiensis* que pertenecen a cinco serovars (*israelensis*, *kenyae*, *kurstaki*, *pakistani* y *tohokuensis*) y dos cepas no serotipables. Este resultado sugiere que la producción de  $\beta$ -exotoxina es una propiedad específica de la cepa en lugar de una propiedad específica de serovar. Por lo que sabemos, este es el primer estudio que demuestra la asociación de la producción de  $\beta$ -exotoxinas con cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes a serovars *israelensis*, *pakistani* y *tohokuensis*.

**Sauka y col. (2014)** en Argentina, evaluaron dos métodos basados en PCR para predecir la producción de  $\beta$ -exotoxina de tipo I, en cepas de *B. thuringiensis* y aislados nativos. Los resultados fueron validados correlacionando con bioensayos de *M. domestica*. Determinaron una prueba rápida que pueda detectar el gen clave involucrado en la producción de la  $\beta$ -exotoxina y consideraron que el gen *thuE*, es uno de los ORFs que está involucrado en la biosíntesis de  $\beta$ -exotoxina de tipo I.

**Sánchez y col. (2015)** en México, realizaron un bioensayo cualitativo y rápido usando el nematodo *C. elegans* para detectar en forma indirecta la producción de  $\beta$ -exotoxina en diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Mostraron que este ensayo es útil para detectar la  $\beta$ -exotoxina en *B. thuringiensis* con alta fiabilidad, ayudando a discriminar las cepas que no podrían ser utilizadas como bioinsecticidas debido a su posible riesgo para los seres humanos. Los

datos muestran que el bioensayo cualitativo con nematodos es una alternativa potencial para los bioensayos de larvas de mosca y correlacionado con la determinación de  $\beta$ -exotoxina por HPLC.

A nivel nacional y local no existen estudios relacionados con la detección de la  $\beta$ -exotoxina de *B. thuringiensis*.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico:

##### 3.1.1. Cepas bacterianas.

Cepas de *B. thuringiensis* en estudio, asignadas con los códigos: C-9, C-12, C-22, C-50, C-62, C-81, C-92, C-245, C-246, C-257, G-171, G-181, G-189, G-203, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, aisladas de larvas de *Copitarsia*<sup>24</sup>. Ver Anexo (Fig.5).

Como controles se utilizaron las siguientes cepas:

Control positivo: *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2. (Cepa donada por el Dr. Diego Sauka del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola INTA, Argentina).

Control negativo: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (DIPEL).

#### 3.2. Métodos:

##### 3.2.1. Producción de filtrados extracelulares de cepas de *B. thuringiensis*.

##### 3.2.1.1. Reactivación de las cepas de *B. thuringiensis*

Las cepas de *B. thuringiensis* conservadas fueron sembradas en 300 µl de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Estos cultivos se sembraron por estría y agotamiento en placas de agar LB y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Luego se adicionó una porción de colonia de cada cepa a 1 ml de caldo LB contenido en tubos Eppendorf. Estos se incubaron a 37 °C por 24 horas. Los cultivos se utilizaron luego en el estudio<sup>23</sup>. Ver Anexo (Fig.6).

#### **3.2.1.2. Activación de genes productores de toxinas**

Se colectaron larvas de tercer y cuarto estadio de *C. incommoda* para preparar un caldo larva. Estas se lavaron con solución salina fisiológica (SSF) estéril, luego se colocaron 2 larvas en tubos con 2 ml de agua peptonada al 0,1 %, se trituraron con una bagueta y luego se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos, a esta preparación se le llamó caldo larva. A cada una de las cepas de *B. thuringiensis* conservadas en caldo LB se les adicionó 500 µl del caldo larva y se incubaron a 37 °C por 24 horas. De cada tubo se tomó una asada y se sembró por estría y agotamiento en placas con agar LB y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Las colonias se repicaron en tubos con agar LB e incubaron a 37 °C por 24 horas. Los cultivos se conservaron en refrigeración a 4 °C<sup>14</sup>. Ver Anexo (Fig.7).

### **3.2.1.3. Producción y conservación de filtrado extracelular**

De cada cepa activada se tomó una asada y se colocó en tubos Eppendorf con 500 µl de caldo LB los cuales se incubaron a 37 °C por 24 horas. De cada cepa se tomó 100 µl y se transfirió a tubos Falcon con 5 ml de Caldo LB para la producción de la β-exotoxina. Los tubos Falcon se incubaron a 37 °C por 48 horas.

El cultivo se centrifugó a 6000 rpm por 30 minutos para separar el sobrenadante del paquete celular. El sobrenadante recuperado se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y se filtró a través de filtro de membrana de 0.45 µm de poro. Los filtrados que se obtuvieron se conservaron en congelación a -20 °C en alícuotas de 1 mL. Ver Anexo (Fig.8).

## **3.2.2. Determinación cualitativa de la actividad nociva de β-exotoxina de *B. thuringiensis* mediante bioensayos con larvas de *M. domestica***

### **3.2.2.1. Captura de adultos de *M. domestica***

Para capturar adultos de *M. domestica* se utilizó una jaula como trampa de 30 x 30 x 30 cm, en la cual se colocó en su interior un cebo de carne atractivo para las moscas. La jaula poseía una tapa plegable que se mantuvo abierta por 20 minutos y se cerró una vez que se vieron suficientes moscas en el interior de la jaula, seguidamente se seleccionó los adultos de la especie de *M. domestica*. Ver Anexo (Fig.9).

Las moscas se colocaron dentro de la jaula junto con placas Petri conteniendo salvado de trigo y leche entera en polvo bien mezclados con agua para que ovipositen.

Además, se colocó una placa Petri con granos de azúcar y en otra placa pequeños pedazos de algodón sobresaturado con agua. Todas las placas se reemplazaron diariamente por otras recién preparadas.

#### **3.2.2.2. Obtención de huevos y larvas de *M. domestica***

Se obtuvieron los huevos de *M. domestica* después de 24 h de su captura. Los huevos son blancos de forma alargada y ovalados, de 1 mm de longitud y eclosionan en un lapso de 8-24 h a temperatura de 20 °C a 25 °C<sup>40</sup>. Ver Anexo (Fig. 11-A)

Se observó larvas de *M. domestica* las cuales pasaron por tres estadios larvarios; en el primero, la larva mide de 1-3 mm de longitud, en el segundo de 3-5 mm y en el tercero alcanza de 5-13 mm, lo cual lo realizan en 5 a 6 días. Ver Anexo (Fig. 11-B). Las larvas de *M. domestica* se caracterizaron por ser de color blanco-amarillento con mucha movilidad, la cabeza presenta un par de ganchos oscuros como mandíbulas<sup>21</sup>. Posteriormente estas se usaron para la realización del bioensayo.

### **3.2.2.3. Obtención de pupas y adultos de *M. domestica***

Siguiendo el ciclo biológico de *M. domestica* la larva se contrae dentro de su propio tegumento, de modo que éste se convierte en un pupario cilíndrico de aproximadamente 6,3 mm de longitud. El color de la pupa pasa de color amarillento a color marrón rojizo y luego a color marrón oscuro o negro en el transcurso de la fase de pupa. Las pupas completan su desarrollo en 2-6 días a temperaturas superiores a 26 °C, pero requieren de 17 a 27 días a 14 °C<sup>30</sup>.

Los adultos hembra de *M. domestica*, ponen cerca de 150 huevos en cada oviposición, alcanzando a poner alrededor de 1,000 huevos en todo su ciclo<sup>39</sup>. La hembra suele ser más grande que el macho y se distingue de él,

por el espacio relativamente amplio entre los ojos, ya que en los machos los ojos casi se tocan<sup>10, 30</sup>. Ver Anexo (Fig.10).

**Tabla 1.** Ciclo biológico de *M. domestica*

Etapas /Días			
Huevo	Larva	Pupa	Adulto
0.3 - 1	5 - 6	2 - 6	14 - 21

#### **3.2.2.4. Determinación cualitativa de la producción de $\beta$ -exotoxinas de *B. thuringiensis***

Con el fin de detectar cualitativamente la presencia de  $\beta$ -exotoxina en las cepas en estudio, se realizaron bioensayos con larvas de *M. domestica* siguiendo el “método para ensayos múltiples”<sup>49</sup>. Se utilizó esta clase de insectos ya que la  $\beta$ -exotoxina genera efectos teratogénicos sobre las pupas de las moscas, impidiendo la emergencia de los adultos. Aquellas cepas que evidenciaron presencia de  $\beta$ -exotoxina en esta etapa fueron evaluadas a través de bioensayos siguiendo el “método estándar” a modo confirmatorio.

**3.2.2.4.1. Método para ensayos múltiples:** Ver Anexo (Fig.12).

Se prepararon tubos plásticos de 50 ml con 12 ml de agar nutritivo (Difco) en pico de flauta. Las cepas a evaluar se sembraron uniformemente en toda la superficie del agar y por triplicado. Los tubos fueron incubados a 29 °C durante 72 h o hasta autólisis. En cada tubo se colocaron 10 larvas de tercer estadio de *M. domestica* y se tapó utilizando una malla fina. Se incubaron a 29 °C durante 8 días, en total oscuridad. Se cuantificó la cantidad de moscas emergidas. Con emergencias mayores al 80 % se considera que la cepa probada no es productora de  $\beta$ -exotoxina.

Como control positivo se utilizó la cepa *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 y como control negativo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Ver Tabla 4.

**3.2.2.4.2. Método estándar:** Ver Anexo (Fig.13).

Se humedeció un papel filtro Whatman en una placa Petri, con 1 ml de sobrenadante filtrado y autoclavado y 1 ml de agua destilada

estéril. Se agregaron 10 larvas de tercer estadio de *M. domestica*. Las placas Petri se sellaron con cinta parafilm y se incubaron a 28 °C durante 8 días. Se realizaron por triplicado en cada cepa. Se cuantificó la cantidad de moscas emergidas. Con emergencias mayores al 80 % se considera que la cepa probada no es productora de  $\beta$ -exotoxina.

Como control positivo se utilizó la cepa *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 y como control negativo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Ver Tabla 5.

### **3.2.3. Extracción de ADN de las cepas de *B. thuringiensis***

Para la obtención de células se sembró una alícuota de cada cepa en 1 mL de caldo LB y agitó a 140 rpm. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) con el siguiente procedimiento:

El cultivo contenido en tubo eppendorf se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 480  $\mu$ l de EDTA 50 mM. Luego se agitó en

vórtex por 1-2 min, se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 480  $\mu$ l de EDTA 50 mM, luego se adicionó 120  $\mu$ l de la enzima lítica lisozima (10 mg/mL). La muestra se incubó a 37 °C por 60 min; posteriormente se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó 600  $\mu$ l de solución de lisis nucleica y se homogenizó suavemente hasta que las células quedaron resuspendidas. Luego se incubó a 80 °C por 5 min para lisar las células y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Al lisado celular se le adicionó 3  $\mu$ l de solución RNAsa. Se mezcló invirtiendo el tubo cinco veces. Luego se incubó a 37 °C por 60 min, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 200  $\mu$ l de solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con RNAsa y se agitó vigorosamente en un vórtex a alta velocidad por 20 seg. La muestra se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min, luego se transfirió el sobrenadante conteniendo el ADN a un tubo de microcentrifuga limpio conteniendo 600  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible. Luego se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se decantó el sobrenadante. Se adicionó 600  $\mu$ l de etanol al 70 %, a temperatura ambiente y se invirtió el tubo suavemente, luego se centrifugó a 16,000 rpm durante 2 min, se aspiró cuidadosamente el etanol y se descartó el sobrenadante.

El tubo se drenó sobre un papel absorbente limpio y se dejó secar el “pellet” por 15 min. Se agregó a cada tubo 100 µl de solución de rehidratación de ADN, luego se incubó a 65 °C por 1 hora y se mezcló periódicamente la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, se rehidrató el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente a 4 ° C. Finalmente, el ADN se almacenó a -20 °C.

### **3.2.4. Detección del gen *thuE***

#### **3.2.4.1. Amplificación mediante PCR del gen *thuE***

Los partidores que se utilizaron para la detección específica del gen *thuE* fueron diseñados por Sauka<sup>(58)</sup> y las secuencias de los oligonucleótidos son las siguientes:

BEF: 5'-GCGGCAGCCGTTTATTCAAA-3'

BER: 5'-CCCCTTCCCATGGAGAAACA-3'

Estos fueron adquiridos de Biosearch Technologies, Inc. y amplifican un fragmento de 406 pb de *thuE* entre los nucleótidos 373 y 778.

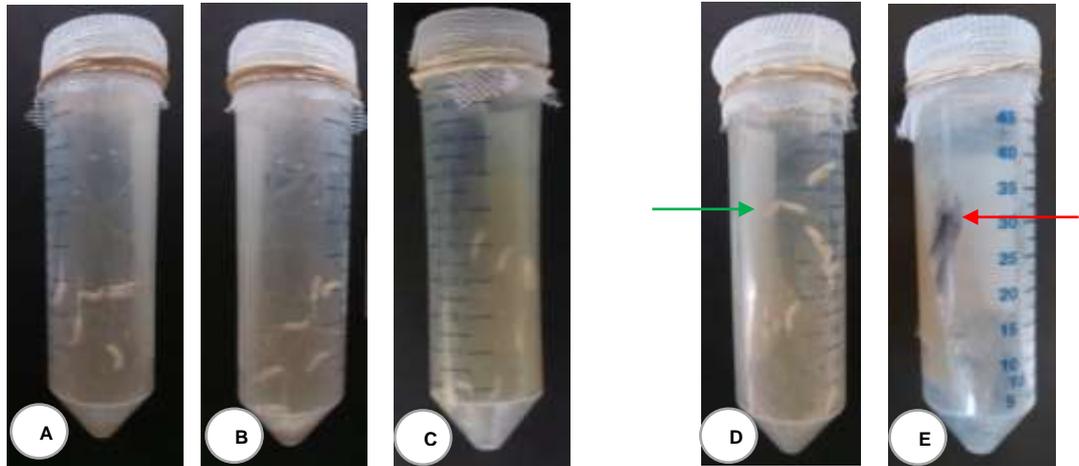
Se usó ADN molde de cada cepa, obtenido según el procedimiento descrito en Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®). Las reacciones de PCR se realizaron en 20 µl de volumen final, con los siguientes

componentes: agua calidad molecular, 8.5  $\mu$ l, Master Mix (2X) de Thermo Scientific, 10  $\mu$ l; partidador directo *thuEF* (20 pmol), 0.5  $\mu$ l; partidador reverso *thuEF* (20 pmol), 0.5  $\mu$ l; ADN molde (100 ng/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l. Después de mezclar suavemente se adicionó 25  $\mu$ l de aceite mineral y centrifugó a 12000 rpm por pocos segundos. La reacción de PCR se realizó utilizando un termociclador JM Research PTC100, según el programa propuesto por Sauka<sup>(58)</sup> y fue el siguiente: desnaturalización inicial del ADN a 94 °C por 2 min; seguido por 25 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación de partidores a 54 °C por 1 min y elongación de 72 °C por 1 min) y elongación final a 72 °C por 5 min.

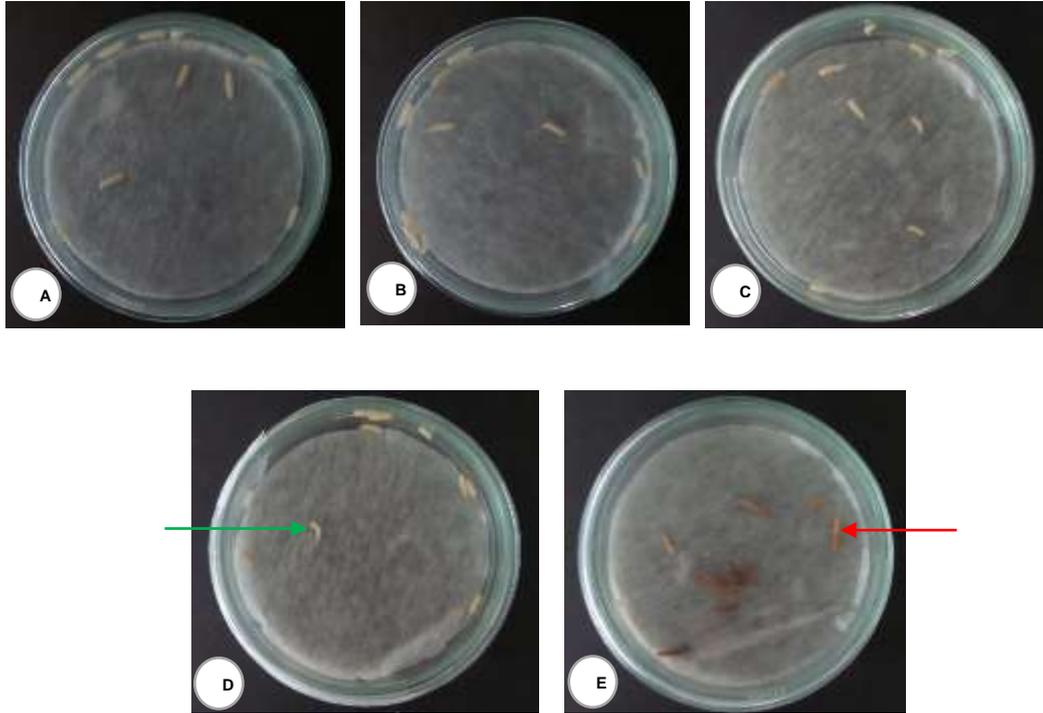
#### **3.2.4.2. Electroforesis de ADN y visualización de productos de PCR**

El ADN genómico (5  $\mu$ l) y los productos de PCR (7.5  $\mu$ l) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE. Estos se visualizaron en un transiluminador Biotop (320 nm), después de la tinción con bromuro de etidio (0.1  $\mu$ g/mL) durante 3 min y lavado con agua destilada durante 30 min<sup>2</sup>.

## IV. RESULTADOS



**Fig. 1. Actividad bioinsecticida de la  $\beta$  -exotoxina de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* – Método para ensayos múltiples. A) Cepa C-92, B) Cepa C-246, C) Cepa G-189, D) Flecha verde: larva viva-control negativo, E) Flecha roja: larva muerta-control positivo**



**Fig. 2. Actividad bioinsecticida de la  $\beta$  -exotoxina de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* – Método estándar. A) Cepa C-92, B) Cepa C-246, C) Cepa G-189, D) Flecha verde: larva viva-control negativo, E) Flecha roja: larva muerta-control positivo**

**Tabla 2.** Actividad de la  $\beta$ -exotoxina de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* – Método para ensayos múltiples

Cepa	Vivas		Muertas	
	N°	%	N°	%
<b>C-9</b>	10	100	0	0
<b>C-12</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>C-22</b>	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-50</b>	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-62</b>	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-81</b>	10	100	0	0
<b>C-92</b>	9	90	1	10
<b>C-245</b>	7.67	76.67	2.33	23.33
<b>C-246</b>	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-257</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>G-171</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>G-181</b>	10	100	0	0
<b>G-189</b>	8.33	83.33	1.67	16.67
<b>G-203</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>HD-1</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>HD-2</b>	0	0	10	100

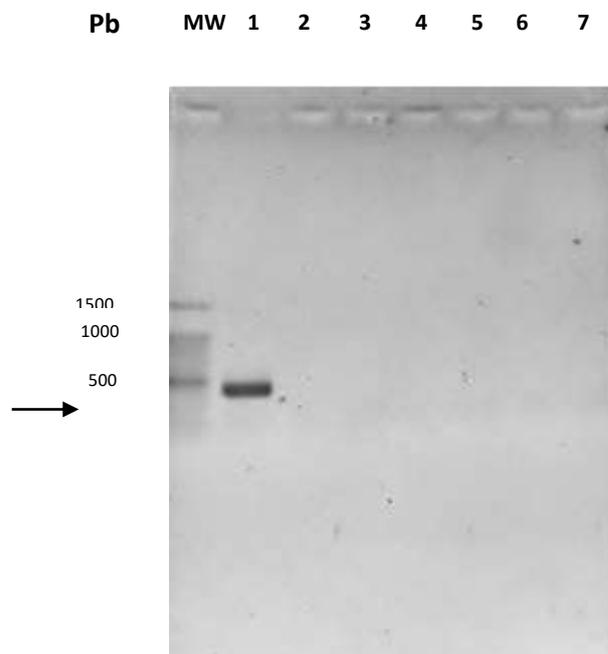
Cepas **C**: Cachiche, **G**: Guadalupe, **HD-1**: Control negativo, **HD-2**: Control positivo

**Tabla 3.** Actividad de la  $\beta$ -exotoxina de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* – Método estándar

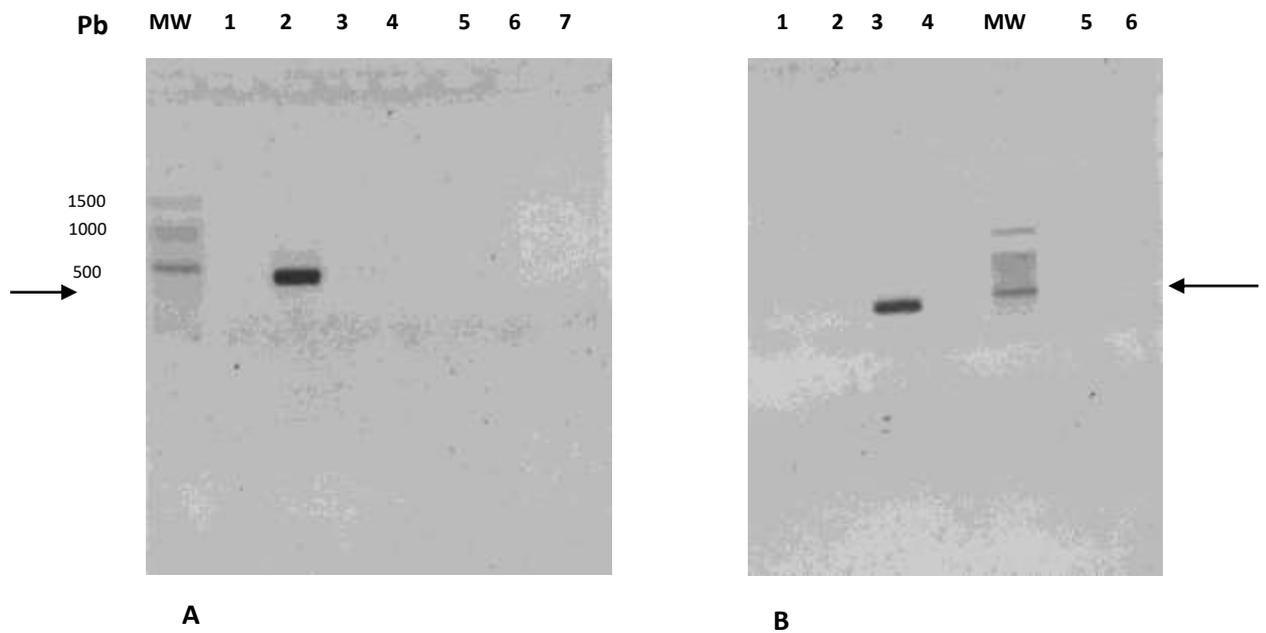
Cepa	Vivas		Muertas	
	Nº	%	Nº	%
<b>C-9</b>	10	100	0	0
<b>C-12</b>	10	100	0	0
<b>C-22</b>	9	90	1	10
<b>C-50</b>	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-62</b>	9	90	1	10
<b>C-81</b>	10	100	0	0
<b>C-92</b>	9	90	1	10
<b>C-245</b>	8.33	83.33	1.67	16.67
<b>C-246</b>	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-257</b>	10	100	0	0
<b>G-171</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>G-181</b>	10	100	0	0
<b>G-189</b>	8.33	83.33	1.67	16.67
<b>G-203</b>	10	100	0	0
<b>HD-1</b>	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>HD-2</b>	0	0	10	100

Cepas **C**: Cachiche, **G**: Guadalupe, **HD-1**: Control negativo, **HD-2**: Control positivo

La detección de genes *thuE* es una evaluación previa al uso posterior de cepas de *B. thuringiensis* como biocontroladores de insectos plaga. Las cepas evaluadas en el presente estudio no presentan el gen *thuE*, como se muestra en los productos de amplificación mediante PCR (Figuras 3 y 4). Se visualiza el amplificado de tamaño esperado (406 pb), usando control positivo la cepa *B. thuringiensis* HD-2 y la ausencia de amplificados en el control negativo *B. thuringiensis* HD-1.



**Fig. 3.** Amplificación mediante PCR de genes *thuE* de aislados de *B. thuringiensis*. Carriles: 1, HD-2; 2, HD-1; 3, C-9; 4, C-12; 5, C-22; 6, C-50; 7, C-62. MW, estándar (100 pb, Promega). La flecha indica el amplificado de 406 pb.



**Fig. 4.** Amplificación mediante PCR de genes *thuE* de aislados de *B. thuringiensis*. **A)** carriles: 1, HD-1; 2, HD-2; 3, C-81; 4, C-92; 5, C-245; 6, C-246; 7, C-257. **B)** carriles: 1, G-171; 2, G-181; 3, HD2; 4, HD1; 5, G-189; 6, G203., MW, estándar (100 pb, Promega). La flecha indica el amplificado de 406 pb.

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluaron 14 cepas de *B. thuringiensis* aisladas de larvas de *C. incommoda*, colectadas de campos de cultivo de *A. officinalis* “espárrago” de la Provincia de Ica, con potencial de uso en el control de este insecto plaga. La utilización de cepas nativas de *B. thuringiensis* en el área agrícola está condicionada a que si éstas presentan o no  $\beta$ -exotoxina, la cual es tóxica para mamíferos inclusive para el hombre; por lo que se debió determinar si algunas de ellas la producen.

Se ha documentado que algunas cepas de *B. thuringiensis* pueden producir  $\beta$ -exotoxinas solubles<sup>35</sup>. Sin embargo, son de interés y tienen potencial aplicación en campo aquellas que no producen  $\beta$ -exotoxina, debido a que las autoridades reguladoras prohíben el uso de cepas que producen este metabolito, como base de las formulaciones bioinsecticidas<sup>35, 45, 54</sup>.

Los bioensayos se realizaron por triplicado con 10 larvas de *M. domestica* y se cuantificó la cantidad de moscas emergidas. En este sentido, cuando existieron emergencias mayores al 80%, se consideró que las cepas no son productoras de  $\beta$ -exotoxina<sup>49</sup>.

La detección de la  $\beta$ -exotoxina en las cepas de *B. thuringiensis* se realizó mediante el método para ensayos múltiples que permite observar el efecto insecticida sobre larvas de *M. domestica*. En la Fig. 1 se observa en los casos A, B, C y D, que las larvas no mueren y generan una emergencia mayor al 80 % lo que indica que no hubo efecto insecticida en comparación con el control

positivo, cuyo efecto se muestra por la muerte de las larvas que aparece de color marrón, que se indica en la Fig.1-E.

En el método estándar la evaluación se realizó en placas donde se evaluó también el efecto insecticida sobre las larvas de *M. domestica*. En la Fig. 2, en los casos A, B, C y D las larvas presentan una mayor emergencia. En el control positivo de la misma manera se evaluó el efecto tóxico de la  $\beta$ -exotoxina en la cual se observó mayor muerte de las larvas como se indica en la Fig. 2-E. La cepa control positivo produce la exotoxina que daña a las larvas provocándole inmovilidad por lo que dejan de alimentarse y mueren.

Para definir si las cepas son productoras de  $\beta$ -exotoxina se hizo un recuento cuantitativo de la emergencia, se evaluaron mediante los métodos antes mencionados como se muestran en la Tabla N°2 y N°3 en las cuales se observa que mediante el método para ensayos múltiples las cepas C-9, C-81 y G-181 presentan una emergencia del 100 % en comparación con la cepa C-245, en la cual se obtuvo una emergencia al 76.67 %. En este caso para confirmar la presencia o ausencia de la  $\beta$ -exotoxina se realizó el bioensayo mediante el método estándar. El resultado mostró una emergencia de 83.33 % indicando que esta cepa no es productora de  $\beta$ -exotoxina. En el caso de los controles, con la cepa HD-1 se determinó una emergencia de 96.67 % y con la cepa HD-2 se determinó una mortalidad del 100% con ambos métodos. Esto confirma que todas las cepas evaluadas no producen thurigiensina.

Una posible explicación es que la presencia de  $\beta$ -exotoxina está asociada con más frecuencia a cepas entomopatógenas para coleópteros y menos

frecuente en especies de dípteros, lo cual fue corroborado en estudios de 100 cepas nativas y 24 cepas exóticas; donde, 4 y 3 de ellas fueron tóxicas para la especie *A. grandis*, ensayos confirmatorios con *M. domestica*<sup>49</sup>. Se observaron efectos teratógenicos sobre las pupas que impidieron que los adultos emerjan. En concordancia con lo expuesto por otros autores<sup>19</sup>, estos resultados sugieren una fuerte asociación entre la toxicidad para *A. grandis* de una cepa particular de *B. thuringiensis* y la producción de  $\beta$ -exotoxina por parte de la misma. Este metabolito también ha sido reportado como tóxico para otras especies de coleópteros (*Lasioderma serricone*, *Leptinotarsa decemlineata* y *Diabrotica undecimpunctata*)<sup>8, 34, 62</sup>.

En este estudio se aplicó un método rápido para detectar el gen *thuE* involucrado en la síntesis de la  $\beta$ -exotoxina, mediante PCR. Los resultados de PCR refuerzan lo obtenido mediante bioensayo.

Ninguna de las 14 cepas de *B. thuringiensis* evaluadas en este estudio presentaron el gen *thuE*, a juzgar por la ausencia de amplificado de PCR, utilizando partidores específicos para el citado gen, esto fue contrastado con un control positivo *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 y uno negativo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

Esta es la primera vez que se reporta estudios de detección del gen *thuE* en cepas provenientes de larvas de *C. incommoda*, por lo que, al parecer, el efecto de selección por este insecto plaga no exige una presión por la existencia de la turingiensina. La determinación de la presencia de  $\beta$ -exotoxina de tipo I, mediante la detección del gen *thuE*, es una forma acertada

y rápida debido a que su formación depende de los genes *thu* involucrados de forma específica. En el caso de las toxinas del tipo II, ellas son codificadas por otro tipo de genes<sup>58</sup>.

La ausencia del gen *thuE* en las cepas en estudio se sustenta además en que, durante su caracterización por pruebas bioquímicas, la mayoría correspondieron a *B. thuringiensis subsp. kurstaki*<sup>24</sup>.

En el presente trabajo no se detectó la presencia de la  $\beta$ -exotoxina tipo I mediante la realización de bioensayos con larvas de *M. domestica*, la cual es tóxica para los seres vivos.

## VI. CONCLUSIONES

Al término del presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Las 14 cepas de *B. thuringiensis* evaluadas no producen  $\beta$ -exotoxina a juzgar por los bioensayos realizados con larvas de *M. domestica*.
2. No se detectó el gen *thuE* en las 14 cepas de *B. thuringiensis* evaluadas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1.** Realizar bioensayos en laboratorio frente a larvas plaga de interés para determinar la cepa con mejor efecto insecticida.
- 2.** Realizar pruebas en invernadero para determinar el potencial de uso agrícola de las cepas evaluadas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Altamirano, R. y Tantaleán J.C. (2012).** Detección de genes *cry* de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de *Copitarsia incommoda* de la Región Ica. Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias. Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica.
2. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K. (2003).** *Current Protocols in Molecular Biology*. Estados Unidos: Editorial Board
3. **Beebee, T., Korner, A., y Bond, R. (1972).** Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei. *Biochemical Journal*, 127, 619-634. doi: 10.1042/bj1270619
4. **Bendezú, C. (2013).** Detección e identificación de genes *cry2* en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en la provincia de Ica. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad San Luis Gonzaga de Ica.

5. **Bishop, A. H., y Robinson, C. V. (2014).** *Bacillus thuringiensis* HD-1 Cry-: development of a safe, non-insecticidal simulant for *Bacillus anthracis*, *Journal of Applied Microbiology*, 117: 654-662. doi: 10.1111/jam.12560
  
6. **Bond, R. P. M., Boyce, C. B. C., y French, S. J. (1969).** A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Biochemical Journal*, 114, 477-488. doi: 10.1042/bj1140477
  
7. **Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Peña, G., Nuñez-Valdez, M.E., Soberón, M., y Quintero, R. (1998).** Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12): 4965-4972.
  
8. **Burgerjon, A., Biache, G., y Cals, Ph. (1969).** Teratology of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14, 274-278.
  
9. **Cantwell, G. E., Heimpel, A. M., y Thompson, M. J. (1964).** The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *Journal of Invertebrate Pathology*, 6, 466-480.

10. **Capinera, J. (2008).** House Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) Encyclopedia of Entomology, Springer Science+Business Media B.V.
11. **Carlberg, G., Kihamia C. M., y Minjas, J. (1985).** Microbial control of flies in latrines in Dar es Salaam with *Bacillus thuringiensis*. *MIRCEN Journal of Applied Microbiological and Biotechnology* 1, 33-44.
12. **Carlberg, G. (1986).** *Bacillus thuringiensis* y control microbiano de las moscas. *MIRCEN Journal of Applied Microbiological and Biotechnology* 2, 267-274.
13. **Carlberg, G., Tikkanen, L., y Abdel-Hameed, A. A. (1995).** Pruebas de seguridad de preparaciones de *Bacillus thuringiensis*, incluida Turingiensina, utilizando el ensayo de Salmonella. *Journal of Invertebrate Pathology* 66,68-71.
14. **Carmona, A. (2002).** Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioagro*, 14(1), 3-10.
15. **De Barjac, H., y Dedonder, R. (1965).** Isolation of an identifiable nucleotide from the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. *C R Acad Sci Paris*, 260(26), 7050-7053.

16. Deista, B. R., Rausch, M. A., Fernandez-Luna, M. T., Adang, M. J., y Bonning, B. C. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins*, 6(10), 3005-3027. doi: 10.3390/toxins6103005
17. De Rijk, T. C., Van Dam, R. C., Zomer, P., Boers, E. A., De Waard, P., y Mol, H. G. (2013). Development and validation of a confirmative LC-MS/MS method for the determination of  $\beta$ -exotoxin thuringiensin in plant protection products and selected greenhouse crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (5), 1631-1639. doi: 10.1007/s00216-012-6591-5
18. De Scriver, A., De Clercq, P., De Maagd, R.A., y Van Frankenhuyzen, K. (2015). Relevance of *Bacillus thuringiensis* toxin interaction studies for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Plant Biotechnology Journal*, 13(9), 1221-1223 .doi: 10.1111/pbi.12406
19. Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D., y Sanchis, V. (2003). Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 47(6), 501-507. doi: 10.1007/s00284-003-4097-2
20. Farkas, J, Sebesta, K., Horska, K., Samek, Z., Dolejs, L., y Sorm, F. (1969). The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. gelechia. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 34(3), 1118-1120. doi: 10.1135/cccc19691118

- 21. Faz, L., y Meneses, P. (2007).** Monitoreo de la mosca doméstica, *Musca domestica* en Zootecnia y evaluación del control de roedores en la unidad de aves en Zamorano, Honduras. Tesis de Licenciatura Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras.
- 22. Fernández, O., y Vega, L. (2002).** Tecnología de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas*, 64, 110-115.
- 23. Gallegos, G., y Sánchez, A. (1992).** Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* para control de insectos plaga lepidópteros. *Southwestern Entomologist*, 17, 63-66.
- 24. García, E., y Quispe, F. (2005).** Aislamiento y caracterización parcial de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas de *Copitarsia incomoda* colectadas en campo de *Asparagus officinalis* ("ESPARRAGO") de la provincia de Ica. Tesis para obtener el Título de Biólogo. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
- 25. Gevrey, J., y Euzéby, J. (1966).** Pouvoir inhibiteur de  $\beta$ -exotoxin de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *thuringiensis* à l'encontre des formes pré-imaginales des strangles digestifs-etude in vitro. *Scientific society of veterinary medicine*, 68, 111-119.

- 26. Gohar, M., y Perchat, S. (2001).** Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 298(1), 112-117. doi: 10.1006/abio.2001.5373
- 27. Haloi, K., Kalita, M. K., Nath, R., y Devi, D. (2016).** Characterization and pathogenicity assessment of gut-associated microbes of muga silkworm *Antheraea assamensis* Helfer (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 73-85. doi: 10.1016/j.jip.2016.06.006
- 28. Hernández, C. S., Ferré, J., y Larget-Thiéry, I. (2001).** Update on the detection of beta exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 643-647.
- 29. Hernández, C. S., Martínez, C., Porcar, M., Caballero, P., y Ferré, J. (2003).** Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I  $\beta$ -exotoxin production. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(1), 57-62.
- 30. Hewitt, C. (2011).** The House-Fly: *Musca domestica* Linn. New York (USA), Cambridge University Press.
- 31. Ibarra, J. (1993).** Variabilidad de las cepas nativas de *B. thuringiensis* en México. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato. México.

- 32. Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., y Bulla, L. A. (2010).** *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31-50. doi: 10.4161/bbug.1.1.10519
- 33. Laura, L., Aranda, E., Bravo, A., Ortiz, M., y Ortiz, A. (1992).** Evaluación de proteínas tóxicas producidas por cepas naturales de *B. thuringiensis*. *Instituto de Biotecnología UNAM. México*, 2(3), 1-44.
- 34. Levinson, B. L., Kasyan, K. J., Chiu, S.S., Currier, T.C., y González, J. M. (1990).** Identification of  $\beta$ -exotoxin production, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *Journal of Bacteriology*, 172(6), 3172-3179.
- 35. Liu, X., Ruan, L., Peng, D., Li, L., Sun, M., y Yu, Z. (2014).** Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus thuringiensis* with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects. *Toxins*.6(8), 2229-2238. doi: 10.3390/toxins6082229
- 36. Mac Innes, T. C., y Bouwer, G. (2009).** An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 137-139. doi: 10.1016/j.jip.2009.03.007

- 37. Mackedonski, V. V., Nikolaev, N., Sebesta, K., y Hadjiolov, A. A. (1972).**  
Inhibition of ribonucleic acid biosynthesis in mice liver by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 272(1), 56-66. doi: 10.1016/0005-2787(72)90033-0
- 38. Maduell, P., Callejas, R., Cabrera, K. R., Armengol, G., y Orduz, S. (2002).**  
Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of Piper (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microbial Ecology*, 44(2), 144-153. doi: 10.1007/s00248-002-1018-z
- 39. Marquéz, D. (2003).** Nuevas tendencias para el control de los parásitos de bovinos en Colombia. Una estrategia sostenible para el siglo XXI. CORPOICA. Colombia. Pp. 167.
- 40. Marshall, S. (2012).** Flies: The natural history and diversity of Diptera. Buffalo, New York: Firefly Books. Pp. 616.
- 41. Mechals B. J., y Beyer, O. (1963).** Production and assay of extracellular toxins by *Bacillus thuringiensis*. *Developments in industrial microbiology*, 4, 142-147.

- 42. Meretoja, T., y Carlberg, G. (1977).** Los efectos de *Bacillus thuringiensis* y de los sobrenadantes libres de células de algunas bacterias sobre la actividad mitótica de los linfocitos humanos. *FEMS Microbiology*, 2, 109-111.
- 43. Obeidat, M., Khyami-Horani, H., y Al-Momani, F. (2012).** Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -exotoxins and  $\delta$ -endotoxins to *Drosophila melanogaster*, *Ephestia kuhniella* and human erythrocytes. *African Journal of Biotechnology*, 11(46), 10504-10512.
- 44. Ohba, M., Tantichodok, A., y Aizawa, K. (1981).** Production of heat-stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38, 26-32.
- 45. OMS. (1999).** Especificación de la guía para larvicidas bacterianos para uso de salud pública. Informe de la Consulta Informal de la OMS.28-30 de abril de 1999. WHO / CDS / CPC / WHOPES / 99.2.
- 46. Onco, M., Sauka, D., Pérez, M., y Benintende, G. (2015).** Larvas de *Cydia pomonella* como fuente de aislamiento de *Bacillus thuringiensis*. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.

- 47. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., y Caballero, P. (2014).** *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325. doi: 10.3390/toxins6123296
- 48. Perchat, S., Buisson, C., Chaufaux, J., Sanchis, V., Lereclus, D., y Gohar, M. (2005).** *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2), 131-133. doi: 10.1016/j.jip.2005.08.002
- 49. Pérez, M. (2016).** Factores de virulencia de *Bacillus thuringiensis* y su utilización para el control de coleópteros de alto impacto en el sector agropecuario. Tesis para obtener el Título de Doctor. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- 50. Pineda, Y. (2013).** Detección de genes *vip3* en *Bacillus thuringiensis* aislados en la provincia de Ica. Tesis para obtener el Título de Biólogo. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
- 51. Puerta, F. (1992).** Importancia de *Bacillus thuringiensis* en los programas de Control Integrado. ABBOTT Laboratorios. Santafé. Bogotá. Colombia. Pp 01-10.

- 52. Quesada-Moraga, E., Garcia-Tovar, E., Valverde-Garcia, P., y Santiago-Alvarez, C. (2004).** Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soil in Spain. *Microbiological Research*, 159(1), 59-71.
- 53. Ruiz de Escudero, I., Ibáñez, I., Padilla, M. A., Carnero, A., y Caballero, P. (2004).** Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. *Patología. Bol. San. Veg. Plagas*, 30, 703-712.
- 54. Sánchez-Soto, A. I., Saavedra-González, G. I., Ibarra, J. E., Salcedo-Hernández, R., Barboza-Corona, J. E., y Del Rincón-Castro, M. C. (2015).** Detection of  $\beta$ -exotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* using an easy bioassay with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Applied Microbiology*, 61(6), 562-567. doi: 10.1111/lam.12493
- 55. Sauka, D. H. (2007).** Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. Tesis doctoral. UBA.
- 56. Sauka, D. H., y Benintende, G. B. (2008).** *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.

- 57. Sauka, D. H., Basurto-Ríos, R. E., Ibarra, J. E., y Benintende, G. B. (2010).** Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotropical Entomology*, 39(5), 767-773. doi: 10.1590/S1519-566X2010000500016
- 58. Sauka, D. H., Pérez, M.P., López, N. N., Onco, M. I., Berretta, M. F., y Benintende, G. B. (2014).** PCR-based prediction of type I  $\beta$ -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122, 28-31. doi: 10.1016/j.jip.2014.08.001
- 59. Sauka, D. H., y Benintende, G. B. (2017).** Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 273-281. doi: 10.1016/j.ram.2017.02.003.
- 60. Schnepf, E, Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., y Dean, D. H. (1998).** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular*, 62(3), 775-806.

- 61. Sebesta, K., y Horska, K. (1970).** Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 209(2), 357-376. doi: 10.1016/0005-2787(70)90734-3
- 62. Tailor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L., y Ely, S. (1992).** Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* (*kurstaki*) delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Molecular Microbiology*, 6(9), 1211-1217.
- 63. Truffa-Bachi, P., Motta, I., De Barjac, H., y Laurent, P. (1977).** Mise en évidence d'un pouvoir mitogène chez l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis*. *Academy of Science Paris*, 285(4), 455-457.
- 64. Uribe, D., Martinez, W., y Cerón, J. (2003).** Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtain from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(2), 119-127.
- 65. Wang, J., Boets, A., Van Rie, J., y Ren, G. (2003).** Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(1), 63-71.

- 66. Zhang, Y., Zhang, J., Lan, J., Wang, J., Liu, J., y Yang, M. (2016).** Temporal and spatial changes in Bt toxin expression in Bt-transgenic poplar and insect resistance in field tests. *Journal of Forestry Research*, 27(6), 1249-1256. doi: 10.1007/s11676-016-0254-x

## **IX. ANEXOS**

**Tabla 4.** Actividad de la  $\beta$  –exotoxina de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* – Método para ensayos múltiples

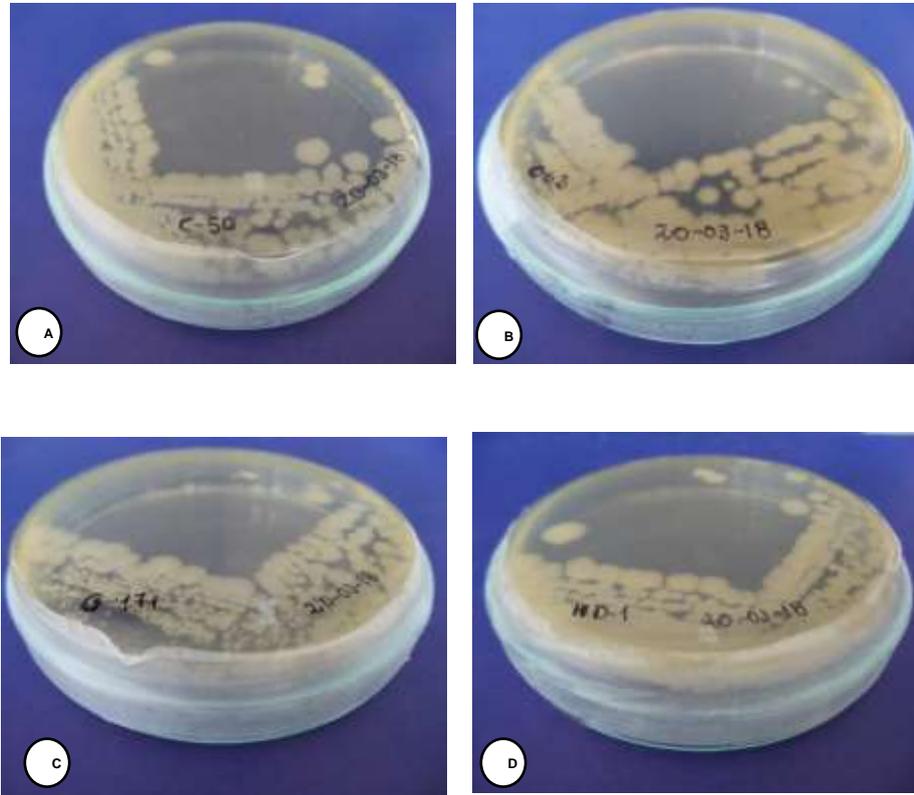
CEPA	TUBO 1		TUBO 2		TUBO 3		Vivas		Muertas	
	Vivas (N°)	Muertas (N°)	Vivas (N°)	Muertas (N°)	Vivas (N°)	Muertas (N°)	N°	%	N°	%
<b>C-9</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>C-12</b>	9	1	10	0	10	0	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>C-22</b>	9	1	9	1	8	2	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-50</b>	9	1	8	2	9	1	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-62</b>	8	2	8	2	10	0	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-81</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>C-92</b>	9	1	10	0	8	2	9	90	1	10
<b>C-245</b>	7	3	8	2	8	2	7.67	76.67	2.33	23.33
<b>C-246</b>	8	2	8	2	10	0	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-257</b>	9	1	10	0	10	0	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>G-171</b>	10	0	9	1	10	0	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>G-181</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>G-189</b>	8	2	9	1	8	2	8.33	83.33	1.67	16.67
<b>G-203</b>	10	0	9	1	10	0	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>HD-1</b>	10	0	10	0	9	1	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>HD-2</b>	0	10	0	10	0	10	0	0	10	100

Cepas **C**: Cachiche, **G**: Guadalupe, **HD-1**: Control negativo, **HD-2**: Control positivo

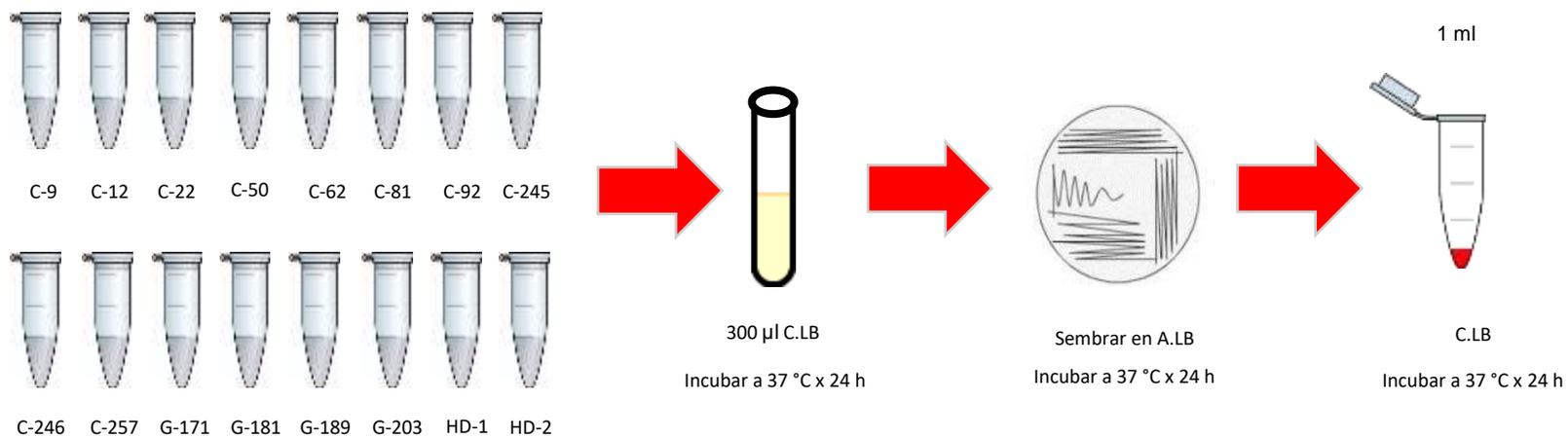
**Tabla 5.** Actividad de la  $\beta$  –exotoxina de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* – Método estándar

CEPA	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3		Vivas		Muertas	
	Vivas (N°)	Muertas (N°)	Vivas (N°)	Muertas (N°)	Vivas (N°)	Muertas (N°)	N°	%	N°	%
<b>C-9</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>C-12</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>C-22</b>	10	0	9	1	8	2	9	90	1	10
<b>C-50</b>	8	2	9	1	9	1	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-62</b>	8	2	9	1	10	0	9	90	1	10
<b>C-81</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>C-92</b>	9	1	9	1	9	1	9	90	1	10
<b>C-245</b>	9	1	8	2	8	2	8.33	83.33	1.67	16.67
<b>C-246</b>	9	1	8	2	9	1	8.67	86.67	1.33	13.33
<b>C-257</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>G-171</b>	10	0	9	1	10	0	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>G-181</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>G-189</b>	8	2	7	3	10	0	8.33	83.33	1.67	16.67
<b>G-203</b>	10	0	10	0	10	0	10	100	0	0
<b>HD-1</b>	10	0	10	0	9	1	9.67	96.67	0.33	3.33
<b>HD-2</b>	0	10	0	10	0	10	0	0	10	100

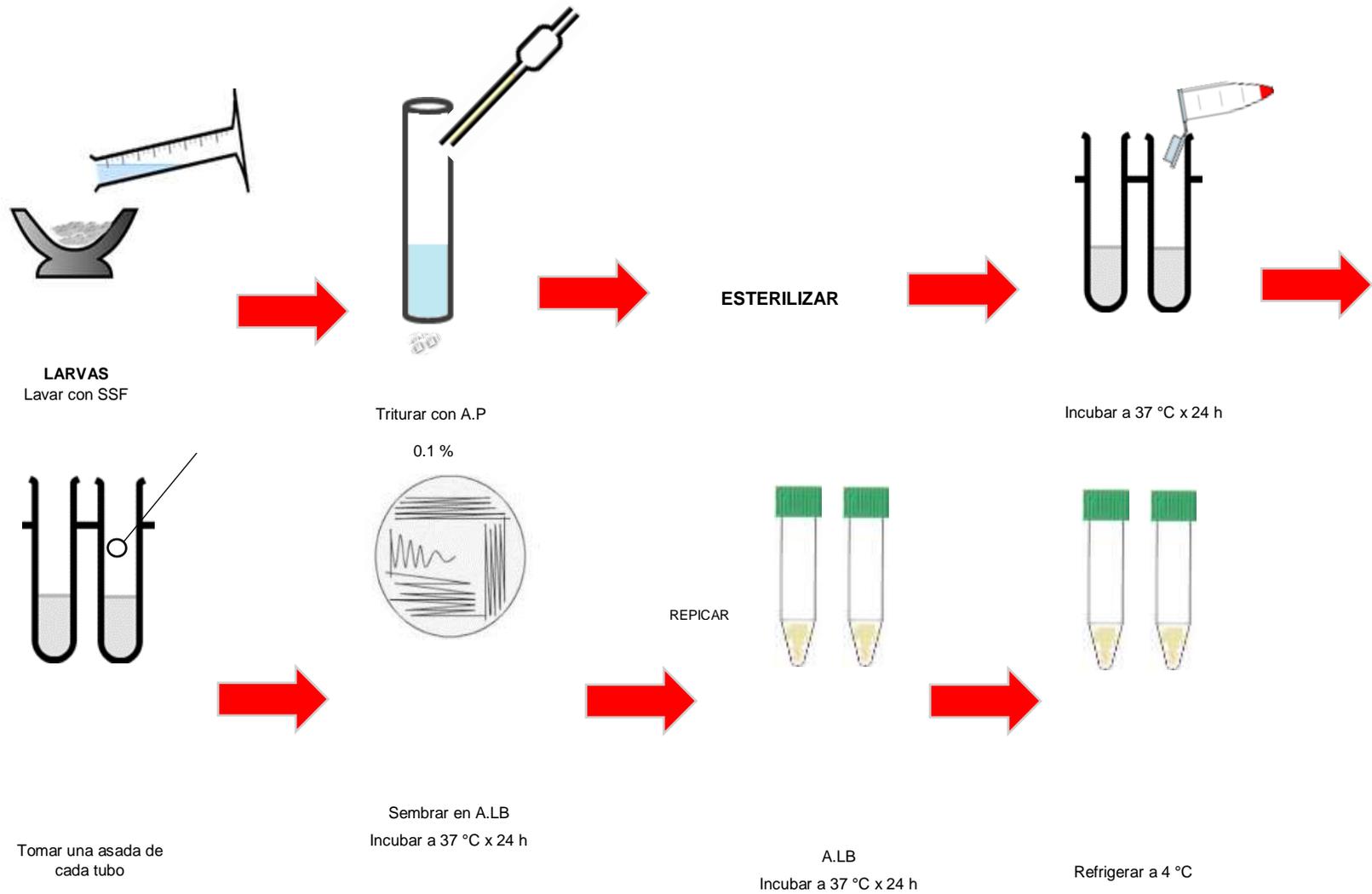
Cepas **C**: Cachiche, **G**: Guadalupe, **HD-1**: Control negativo, **HD-2**: Control positivo



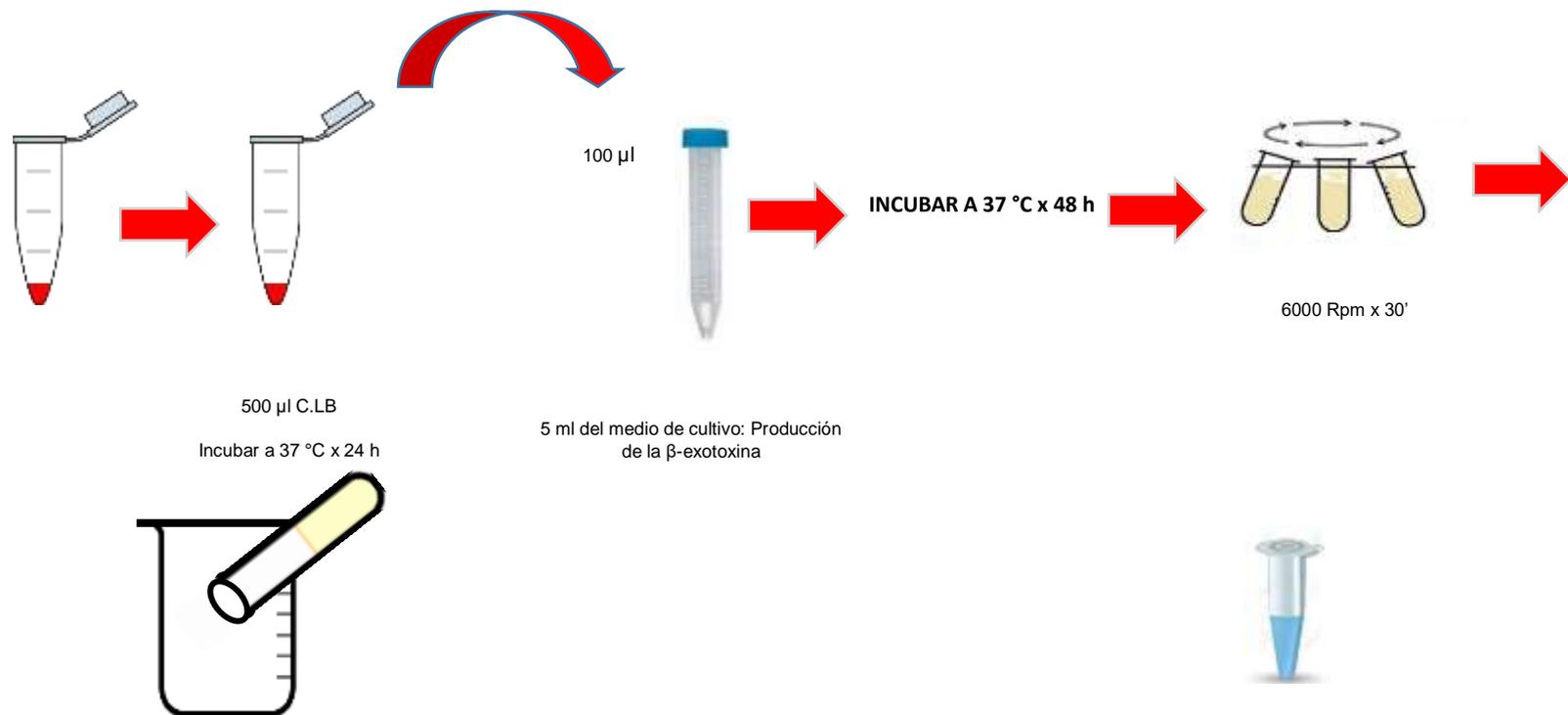
**Fig. 5. Cultivos reactivados de *B. thuringiensis*. A) Cepa C-50, B) Cepa C-62, C) Cepa G-171, D) Control negativo HD-1**

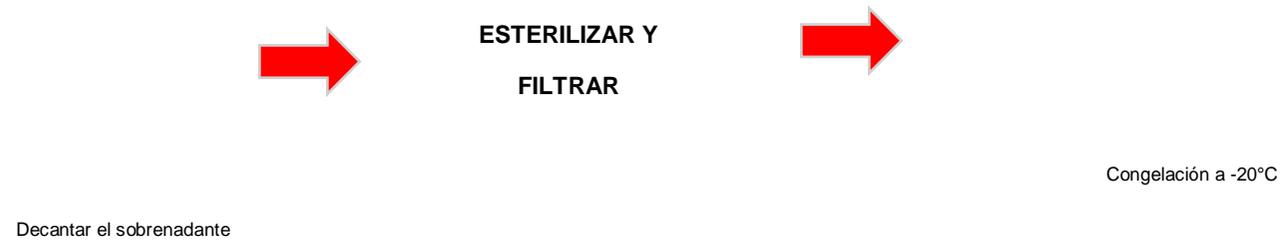


**Fig. 6.** Reactivación de cepas de *B. thuringiensis*

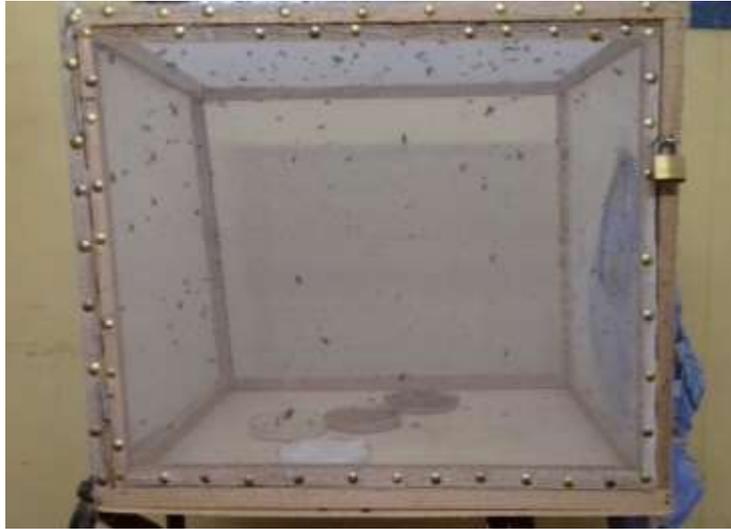


**Fig. 7.** Activación de la producción de toxinas

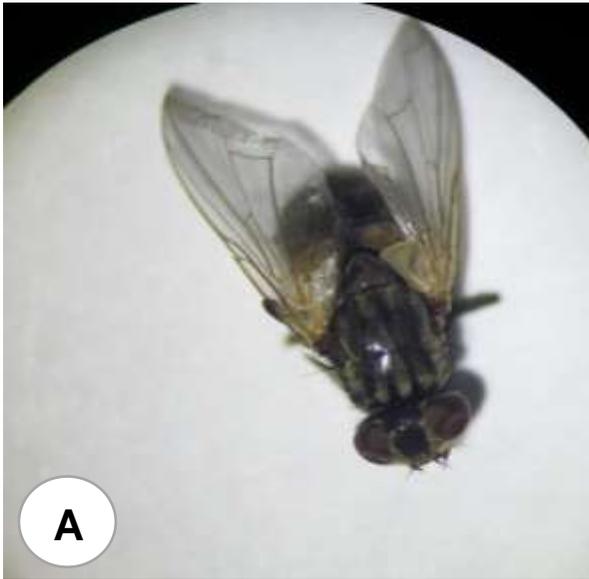




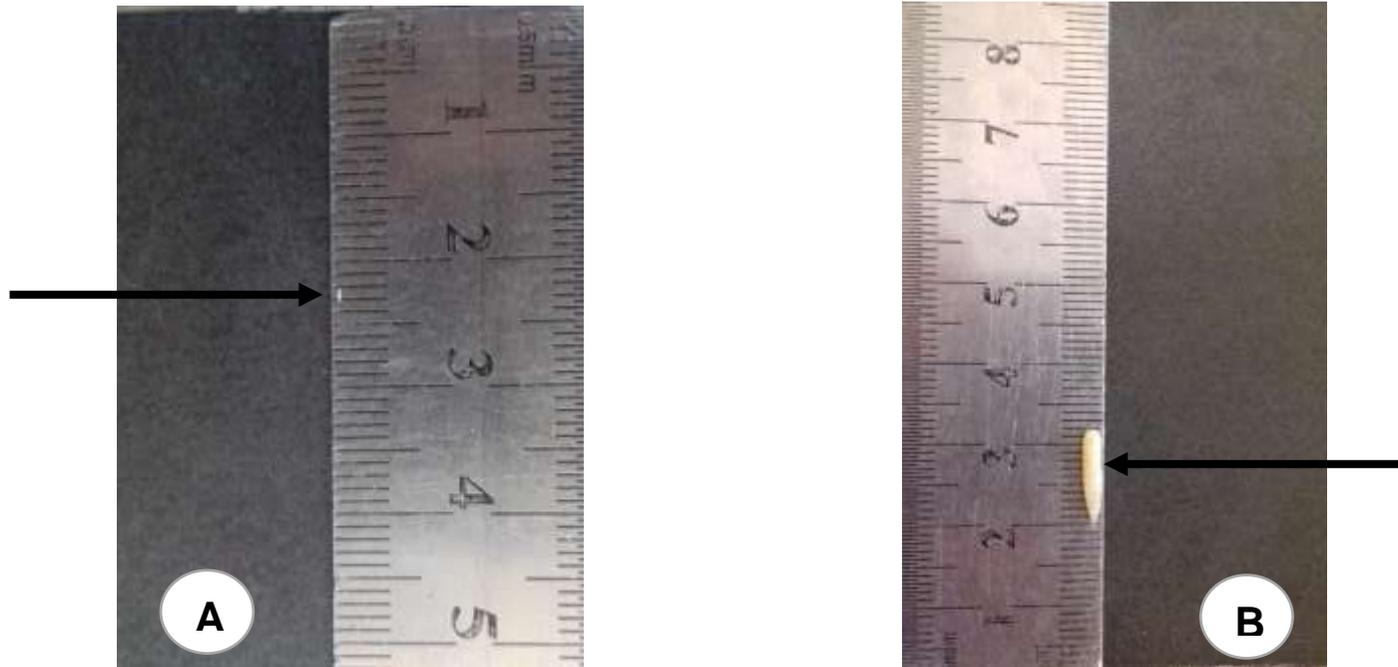
**Fig. 8.** Producción y conservación del filtrado extracelular de *B. thuringiensis*



**Fig. 9.** Jaula entomológica con adultos de *M. domestica*

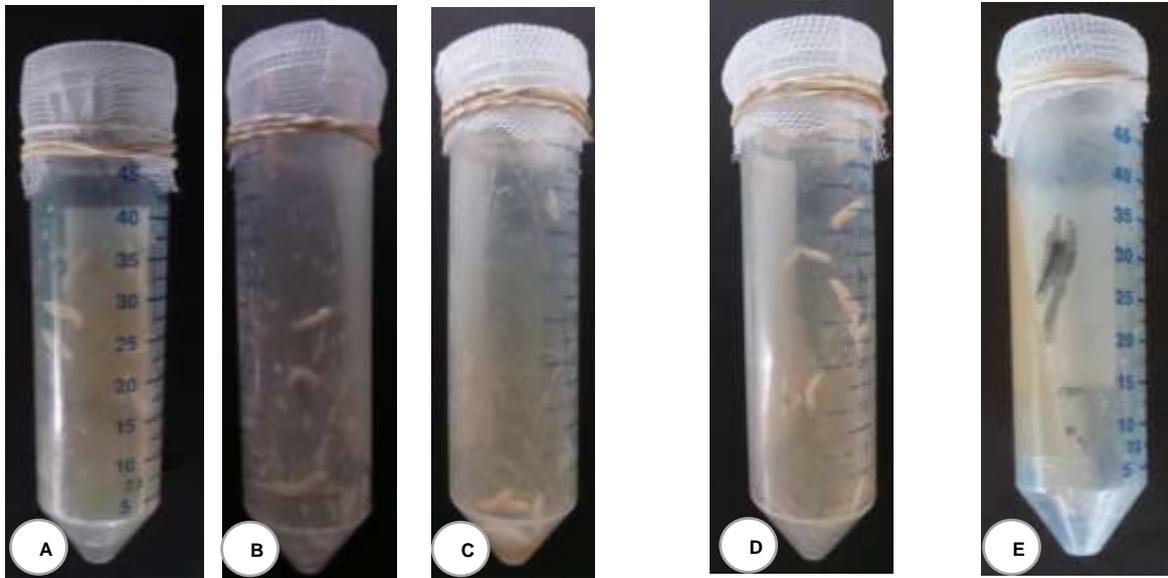


**Fig. 10. Identificación de adultos de *M. domestica*.** **A)** Hembra - Más grande y no presenta los ojos cercanos. **B)** Macho - Relativamente pequeño y presenta los ojos cercanos.

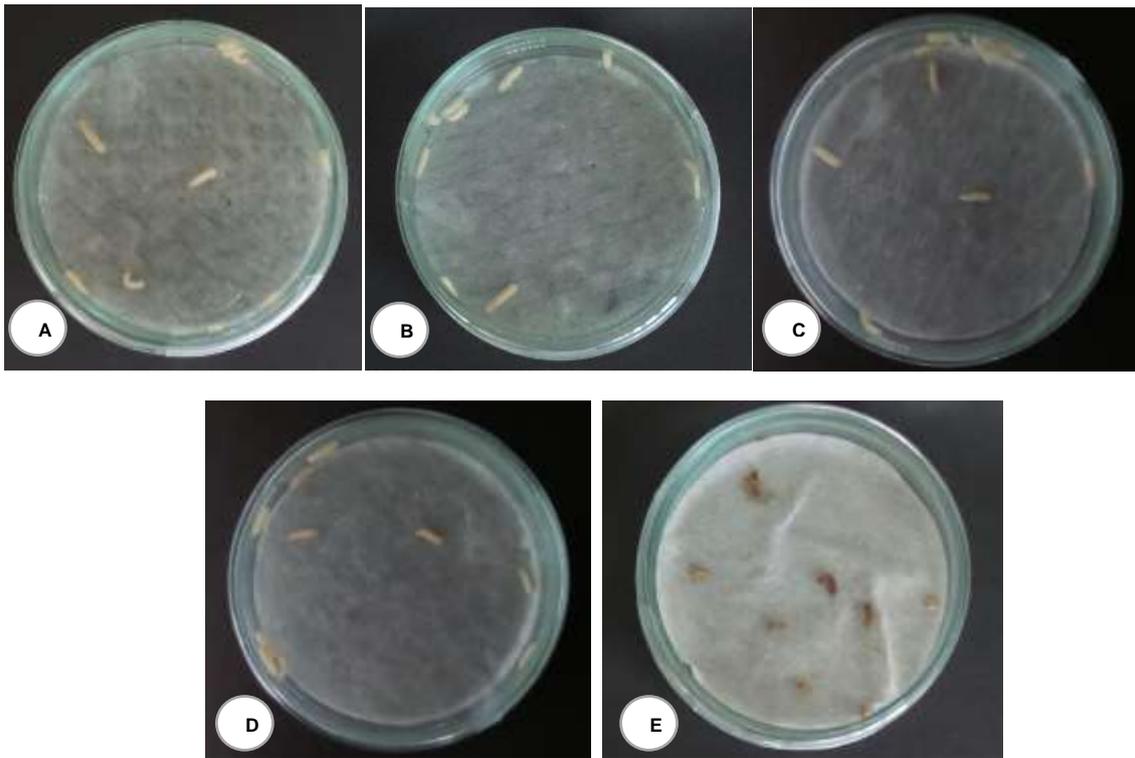


**Fig. 11. Medida de huevo y larva de *M. domestica*. Se indica en la flecha**

**A) Huevo de *M. domestica* B) Larva de tercer estadio de *M. domestica***



**Fig. 12. Bioensayo con larvas de *M. domestica* - Método para ensayos múltiples. A) Cepa C-9, B) Cepa C-22, C) Cepa G-171, D) Control negativo HD-1, E) Control positivo HD-2**



**Fig. 13. Bioensayo con larvas de *M. domestica* - Método estándar.**

**A) Cepa C-50, B) Cepa C-92, C) Cepa C-257, D) Control negativo HD-1**

**E) Control positivo HD-2**

