

## DISTRIBUCION Y AISLAMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* EN COLOMBIA

Thais Díaz1  
Nora Restrepo  
Sergio Orduz  
William Rojas

### RESUMEN

Mediante la realización de trabajos tendientes a buscar enemigos naturales de mosquitos, se aislaron bacterias entomopatógenas en diferentes zonas del país, entre 1988 y 1991. Se efectuaron aislamientos a partir de muestras de tierra y larvas muertas tomadas de los criaderos. Se procedió a utilizar la metodología usada por Brownbridge y Margali (1986) para el aislamiento de bacterias formadoras de esporas. Las cepas que presentaron toxicidad frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* (Say) se sometieron a pruebas de identificación bioquímica y sensibilidad frente a diferentes antibióticos. Para completar el estudio, las cepas se sometieron a pruebas con larvas de *C. quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* (L.) y *Anopheles stephensi* Liston para determinar la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) y el recuento de esporas del polvo liofilizado. Se aislaron 79 cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner tóxicas para larvas de mosquitos, tres de las cuales presentan un alto poder larvicida frente a larvas de *A. aegypti*. Se encontró que los aislamientos CIB 163-131 y CIB 24-726 pertenecen al serotipo H-30, nuevo para el mundo, y el cual fue denominado *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* (B.t.m.). Las proteínas tóxicas de estas dos cepas de B.t.m. muestran características inmunológicas diferentes a las de las cepas de referencia de la subsp. *israelensis*, la cual se halla ampliamente distribuida en las zonas tropicales cálidas de Colombia.

### SUMMARY

In order to find natural enemies of mosquitoes, entomopathogenic bacteria were isolated from

1. Bacteriologas, B.Sc., Entomólogo, M.Sc. y Director Científico, M.D., respectivamente. Sección de Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB. Apartado Aéreo 7378. Medellín, Colombia.

soil and dead mosquito larvae samples taken from different areas in the country. The methodology of Brownbridge and Margali for the isolation of spore forming bacteria was used. The isolates showing toxicity towards *Culex quinquefasciatus* (Say) larvae were submitted to tests of biochemical identification and sensibility to antibiotics. Using larvae of *C. quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* Liston the  $LC_{50}$  was determined. A total of 79 isolates of *Bacillus thuringiensis* Berliner toxic to mosquito larvae were found. The isolates CIB 163-131 and CIB 24-273 were found to belong to the serotype H-30, new for the world, and it was nominated *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* (B.t.m.). The toxic proteins of these isolates showed immunological characteristics different from those of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, which is well distributed in the tropical warm areas of Colombia.

### INTRODUCCION

En los últimos 40 años, la utilización de insecticidas constituyó una herramienta útil para el control de insectos vectores de enfermedades, especialmente en las áreas rurales de las zonas tropicales, donde la malaria constituye una enfermedad de importancia clínica. La aparición de resistencia a los insecticidas en muchas especies de vectores, el alto costo del control y la contaminación ambiental motivaron la búsqueda de nuevas formas de control. Por tal razón, la atención fue puesta en los enemigos naturales, especialmente en los patógenos bacterianos, que fuera de ser altamente tóxicos para los organismos susceptibles, se pueden producir en gran escala y por poseer estructuras de resistencia

pueden perdurar por mucho tiempo bajo condiciones adversas.

Dentro del grupo de las bacterias se destaca el *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) por tener la capacidad de producir una inclusión durante el proceso de esporulación. Estas inclusiones consisten en proteínas que le dan una actividad insecticida específica (Aronson et al. 1986; Whiteley y Schnepf 1986), ya sea hacia los coleópteros, dípteros o lepidópteros.

Las inclusiones del *B. thuringiensis* se disuelven en el intestino medio de las larvas, liberándose una o más proteínas insecticidas, llamadas también delta endotoxinas. Estudios bioquímicos (Knowles y Ellar 1987) y electrofisiológicos (Harvey et al. 1983) sugieren que la toxina genera poros en la membrana celular, alterando el balance osmótico; posteriormente, las células se hinchan y sufren lisis, la larva deja de alimentarse y finalmente muere.

Formulaciones de *B. thuringiensis* han sido usadas por más de dos décadas como insecticidas biológicos para el control de insectos en cultivos agrícolas y, más recientemente, para el control de vectores de una variedad de enfermedades humanas.

Con el objetivo de encontrar nuevas cepas que posean una alta actividad

larvicida, se inició un programa de búsqueda de bacterias formadoras de esporas tóxicas para larvas de mosquitos.

## MATERIALES Y METODOS

**Sitios de Estudio y Muestreo.** Se estudiaron diferentes áreas en Colombia, donde la malaria es una enfermedad de importancia clínica. Las localidades estudiadas corresponden: en la Costa Atlántica a los Departamentos de La Guajira, Atlántico, Cesar, Magdalena, Córdoba, Sucre y Bolívar, y en Antioquia la parte costera que corresponde a Urabá; en la Costa Pacífica los Departamentos de Chocó, Valle del Cauca y Nariño; hacia el oriente del país los Departamentos de Santander, Casanare y Meta; en el sur, Huila, Putumayo, Caquetá y Amazonas; y en el centro del país el Departamento del Tolima.

Las muestras de tierra y larvas muerta se tomaron de las orillas de los criaderos de larvas de mosquitos y se colectaron en bolsas plásticas o tubos estériles, mientras que las larvas muertas o moribundas, sospechosas de infección bacteriana, se colocaron en papel de filtro. Todas las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su estudio en el laboratorio.

Las agua de los criaderos visitados se sometieron a un análisis fisicoquímico para determinar: alcalinidad, dióxido de carbono, oxígeno disuelto, cloruros, dureza, amonio, nitritos, conductividad, pH y temperatura. Todas estas medidas se realizaron de acuerdo con el método analítico del productor (Hach Co, Loveland CO, USA), con excepción del pH, la temperatura y la conductividad.

**Aislamiento de Bacterias Formadoras de Esporas.** Los procedimientos realizados se llevaron a cabo en las más estrictas condiciones de asepsia. Una vez en el laboratorio,

las muestras de tierras, aproximadamente de 1 g, se disolvieron en 4,5 ml de PBS (Buffer salino fosfato:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,18 g;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,32 g;  $\text{NaCl}$  8,58 g; pH: 7,2; para 1.000 ml de agua destilada).

Las muestras de larvas se homogenizaron con un macerador de tejido en PBS para luego, al igual que las muestras de tierras, colocarlas a 78°C durante 10 min. en Baño de María, con el objeto de eliminar los organismos no formadores de esporas y las células vegetativas.

Las muestras se diluyeron posteriormente en PBS y se sembraron 75  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^{-2}$  en caldo Luria (Tryptona 10 g; extracto de levadura 5 g;  $\text{NaCl}$  10 g; agar 2%; para 1 lt. de agua destilada). La suspensión se distribuyó sobre la superficie del agar en forma homogénea para luego incubarla a 30°C por 24-48 horas. Las cajas con el caldo Luria, con anterioridad se sometieron a una prueba de esterilidad a 30°C por 24 horas. Después de 48 horas, las cajas se examinaron para analizar el crecimiento bacteriano y seleccionar, según sus características morfológicas, el mayor número posible de colonias.

Las cepas seleccionadas se transfirieron a medio líquido M1 (Proflo 1 g; glucosa 3 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6 g; peptona 5 g; buffer de fosfatos 200 ml; solución de sales 10 ml; para 1.000 ml de agua destilada), y se incubaron con agitación a 200 rpm por 48 horas a 30°C.

**Evaluación de Toxicidad.** Una vez se comprobó la pureza por observación microscópica, el cultivo se repartió así: 800  $\mu\text{l}$  del cultivo final se colocaron en viales con glicerol al 20% para preservar las muestras a 70°C; 100  $\mu\text{l}$  se tomaron para realizar la prueba de toxicidad en vasos plásticos que contenían 100 ml de agua destilada y 10 larvas de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) de 3 días de edad. La mortalidad de las larvas se registró a

las 24 y 48 horas después de la exposición. Esta prueba se realizó por duplicado y se utilizaron las cepas 1884 ó IPS-82, obtenidas del Instituto Pasteur, serotipo H-14, como controles positivos y también se incluyeron controles negativos sin ninguna suspensión bacteriana.

Los aislamientos que mostraron alguna patogenicidad se cultivaron en 200 ml del medio M1 y se liofilizaron. Una muestra de 50 mg del polvo liofilizado se homogenizó en 4,5 ml. de PBS y posteriormente se hicieron diluciones desde  $1 \times 10^{-3}$  hasta  $1 \times 10^{-8}$ , y con el conocimiento de este rango de toxicidad se procedió a determinar la concentración letal media ( $\text{LC}_{50}$ ) de cada una de las cepas.

**Determinación de la Concentración Letal Media ( $\text{LC}_{50}$ ).** Para determinar la  $\text{LC}_{50}$  se utilizaron las diluciones realizadas a partir de los 50 mg de liofilizado disueltos en PBS; conociendo el rango de acción desde un 95% de mortalidad hasta un 5% de la misma, de acuerdo con los resultados del rango de toxicidad. Se utilizaron 20 larvas de los mosquitos *C. quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* (L.) y *Anopheles stephensi* Liston de 3 días de edad, en vasos plásticos con 100 ml de agua destilada. Las mismas muestras se procesaron en dos días diferentes junto con los controles positivos y negativos. La  $\text{LC}_{50}$  se determinó con la ayuda de un programa de computador diseñado por G.A. Millikan (Universidad de Kansas). El conteo de esporas también se realizó utilizando 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  y cada dilución por duplicado.

**Pruebas Bioquímicas y Características Serológicas.** Las pruebas bioquímicas para los aislamientos patogénicos y las cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* de referencias, se evaluarón con el Enterotubo (Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza) en forma similar a la descrita por Logan y Berkeley (1984);

otras pruebas se realizaron de acuerdo con Sneath (1986).

La susceptibilidad a antibióticos se hizo por la técnica de difusión en agar (NCCLS 1984) y la clasificación serológica se determinó como ha sido descrito por de Barjac (1981).

Las proteínas del cristal paraesporal de las subespecies **medellin**, **israelensis** (1884) y **morrisoni** (PG-14) se separaron de las esporas y desechos celulares en un gradiente de sucrosa de 69 a 78%. Se centrifugó por 14 horas a 24.000 rpm y 4°C, y se separó la banda correspondiente a los cristales. Estos fueron solubilizados en NaOH de acuerdo con la técnica descrita por Thiery (1987). La separación de la proteína se realizó por medio de electroforesis en poliacrilamida (12%), en condiciones denaturantes. Las proteínas se revelaron con azul de Coomassie y se fotografiaron los geles. Otros geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa en un aparato BioRad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La nitrocelulosa se incubó con anticuerpos preparados en conejos contra los cristales de **B.t.** subsp. **israelensis**, y se revelaron con anticuerpos de cabra contra conejo, marcados con peroxidasa.

## RESULTADOS

Durante el inventario realizado entre febrero de 1988 y agosto de 1991, se estudiaron 300 muestras provenientes de 773 criaderos de larvas de mosquitos. De estas muestras se realizaron 3.529 aislamientos de bacterias formadoras de esporas, de las cuales 79 aislamientos corresponden al cepas de **B. thuringiensis** tóxicas para larvas de mosquitos; 41 de ellas son serotipo H-14, y las cepas CIB 163-131 y CIB 24-726 corresponden al serotipo H-30, un nuevo serotipo reportado para el mundo, razón por la cual ha sido sugerido colocarle el nombre de **Bacillus thuringiensis** subsp. **medellin** (Tabla 1). Bajo el micros-

**Tabla 1.** Distribución geográfica, serotipo y toxicidad de las cepas de **Bacillus thuringiensis** contra larvas de **Aedes aegypti** y **Culex quinquefasciatus**. 1988-1991.

Código	Serotipo	Concentración letal 50		Origen
		<i>A. aegypti</i> x10 <sup>-5</sup> µl	<i>C. quinquefasciatus</i> rango de dilución*	
CIB 143-0109	14	3,09	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 143-0112	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 143-0123	14	3,56	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 143-0133	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0114	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0115	14	4,48	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0116	14	9,82	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0124	14	5,86	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0113	14	4,89	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0119	14	5,02	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0122	14	4,96	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0127	14	4,90	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0129	14	3,57	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0130	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0112	14	5,42	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Costa Chocó
CIB 127-0132	14	ND		Costa Chocó
CIB 119-0208		6,09	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0216	14	5,75	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0104	14	8,42	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0116	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0117	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0108	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0402a	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0411	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0412	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0413	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0414	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0415	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 119-0419	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 24-1315	14	5,79	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-1330	14	5,90	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-1332	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-3033	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-3036	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-0120	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-1404	14	8,47	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-0718	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 24-0726	30	80,50	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Atlántico
CIB 120-0201	14	5,42	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 120-0211a	14	5,12	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 120-0214	14	ND	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander
CIB 120-0219	14	5,80	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	Santander

copio se aprecia un bacilo formador de esporas con cristales, con la típica apariencia del género **Bacillus**, con la espora de posición subterminal y forma elipsoidal; la forma del cristal es redondeada.

Para las cepas CIB 163-131, CIB 24-276 y CIB 24-718, y utilizando polvos liofilizados, se determinó a LC<sub>50</sub> expresada en mg por 100 ml de agua destilada. Estos valores se compararon con los de las cepas de referencia IPS-82 (Tabla 2).

En las pruebas metabólicas de algunas de las cepas estudiadas, las CIB 163-131; CIB 24-726; CIB 24-718 y el control H-14 presentaron resultados positivos para las siguientes pruebas: utilización de la glucosa, producción de las enzimas gelatinasa, amilasa, lecitinasa, hidrólisis de la caseína y producción de acetil metil carbinol (AMC); y resultados negativos para la utilización de lisina, omitina, adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol, dulcitol y citrato.

Se obtuvieron diferencias en cuanto a la producción de ureasa, la cual fue positiva para las cepas CIB 163-131 y CIB 24-718 y negativa para CIB 24-726 y H-14; la oxidasa fue positiva para las cepas CIB 24-718 y CIB 24-726, pero negativa para CIB 163-131 y H-14. La catalasa fue negativa para el control, y la hemólisis en agar sangre de carnero fue beta, con excepción de la cepa CIB 163-131 que fue alfa (Tabla 3).

En los resultados de las pruebas de sensibilidad a antibióticos (Tabla 4) se observaron patrones diferentes para las cuatro cepas estudiadas, a excepción del ácido nalidíxico, al cual todas fueron sensibles. Para la cefalotina las cepas CIB 24-726 y CIB 24-718 fueron resistentes, la CIB 163-131 fue sensible y el control intermedio. El comportamiento para el antibiótico cefoperazona fue sensible para las cepas CIB 163-131,

CIB 24-720 y CIB 24-718 y moderadamente sensible para el control. Para el cefoxitin las cepas CIB 24-726 y CIB 24-718 fueron resistentes, pero las cepas CIB 163-131 y el control fueron intermedios. Para el trimetoprim sulfametaxol las cepas CIB 163-131, CIB 24-718 y el control fueron sensibles y la cepa CIB 24-726 fue resistente.

Las características más notorias del estudio electroforético fueron las siguientes: Se obtuvo un péptido de un peso molecular de 125-135 kDa en las cepas controles 1884 y PG-14 que no se aprecia en los aislamientos CIB 163-131 y CIB 24-726; también se observó la presencia de

péptidos de peso molecular de 67 kDa y de 28 kDa en todas las cepas.

Debido a estos resultados se procedió a realizar el Westerblot para saber si los aislamientos en estudio presentaban proteínas inmunológicamente similares a las de las cepas de referencia; por medio de esta técnica se corroboró la no presencia del péptido con un peso molecular 125-135 kDa en las cepas CIB 163-131 y CIB 24-726, pero que si se presenta en los controles utilizados. Igualmente sorprendente fue el conocer que el péptido de peso molecular de 67 kDa, presente en las cuatro cepas, es inmunológicamente diferente en las cepas CIB 163-131 y CIB 24-726 comparadas

**Tabla 2.** Concentración letal media de las cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*, CIB 163-0131 CIB 24-0726, y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CIB 24-0718 y 1884.

Cepas	Serotipo	Concentración letal media en 24 horas		
		C. quinquefasciatus x10 <sup>-4</sup> mg/100 ml	A. stephensi x10 <sup>-4</sup> ul/150 ml	esporas /mg x10 <sup>6</sup>
CIB 163-0131	30	14,10	0,14	7,5
CIB 24-0726	30	18,59	ND	15,8
CIB 24-0718	14	23,32	ND	246,3
1884	14	0,98	0,15	ND

**Tabla 3.** Caracterización bioquímica de las cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*, CIB 163-0131, CIB 24-0726, y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CIB 24-0718 y 1884.

Parámetro	1884	24-0718	163-0131	24-0726
<b>Enterotubo</b>				
Glucosa	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-
<b>Otras pruebas</b>				
Urea	-	+	+	-
Gelatinasa	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	-	+
Catalasa	-	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+
Lecitinasa	+	+	+	+
ACM*	+	+	+	+
Hidrólisis de Caseína	+	+	+	+
Hemólisis	Beta	Beta	Alfa	Beta

\*ACM = Aceti-metil-carbinol.



**Tabla 4.** Efecto de algunos antibióticos en el crecimiento de las cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*, CIB 163-0131, CIB 24-0726, y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CIB 24-0718 y 1884.

Antibiótico	Concentración µg	Diámetro del halo de crecimiento			
		1884	163-0131	24-0726	24-0718
Acido Nalidíxico	30	20 S	24 S	34 S	22 S
Cefalotina	30	16 I	18 S	16 R	12 R
Cefoperazona	75	18 MS	25 S	28 S	24 S
Cefoxitin	30	15 I	15 I	8 R	6 R
Trimetoprim sulfametoxazol	25	22 S	25 S	6 R	30 S

S = sensible; I = sensibilidad intermedia; MS = moderadamente sensible; R = resistente.

con los controles 1884 y PG-14. Por otro lado, el péptido de 28 kDa mostró similitud inmunológica con los controles.

## DISCUSION

Durante el período del inventario de bacterias entomopatógenas no se observó ninguna epizootia en los sitios de estudio, lo cual no es de extrañar, ya que esto depende del cumplimiento de un número de condiciones críticas en el medio ambiente (Brownbridge y Margalit 1986).

Las cepas de *B. thuringiensis* fueron aisladas de muestras de tierras colectadas de las orillas de los criaderos de mosquitos; este tipo de material es la fuente más probable de esporas bacterianas debido a que las esporas se sedimentan rápidamente (Davidson et al. 1984; Ignoffo et al. 1981; Mulligan et al. 1980; Silapanuntakul et al. 1983); además, el hecho de ser estructuras de resistencia que pueden soportar condiciones adversas del medio ambiente y facilitan su larga supervivencia, explica su aislamiento de una amplia variedad de habitats (Sneath 1986). Esto es confirmado con los aislamientos de Padua et al. (1984) y Brownbridge y Margalit (1986).

Junto con el hallazgo de cepas tóxicas para larvas de mosquitos, también se aislaron cepas que no lo fueron, lo cual abre un nuevo campo para investigar su acción frente a otros órdenes de insectos, como por

ejemplo para Lepidoptera o Coleoptera, hacia los cuales algunas cepas de *B. thuringiensis* son tóxicas (Krieg et al. 1983; Dulmage, 1981).

Las observaciones microscópicas y las pruebas químicas a pesar de mostrar algunas similitudes y diferencias, no son patrones confiables como para hacer clasificación adecuada de estas cepas. La clasificación serológica es la única técnica mundialmente aceptada para tal efecto, a pesar del inconveniente de que no provee ninguna información acerca del potencial larvicida.

Los resultados obtenidos sobre la concentración letal media indican que está es baja comparada con las de las cepas de referencia utilizadas (1884 e IPS-82). Además, los bajos recuentos de esporas obtenidas en algunas cepas hacen pensar que tal vez sea posible incrementar el número de células y la formación de esporas con un sistema de fermentación adecuado.

Previamente se ha reportado la existencia de resistencia hacia agentes antimicrobianos en cepas de *B. sphaericus* Neide (Polack y Novick 1982; Burke y McDonald 1983) y esta resistencia se utiliza para el aislamiento o recuperación de cepas de muestras de tierras (Yousten et al. 1985).

El nuevo serotipo H-30 que corresponde a las cepas CIB 163-131 y

CIB 24-726, se ha denominado *B. thuringiensis* subespecie *medellin* (B.t.m.).

El amplio uso comercial del serotipo H-14 y la similitud inmunológica del serotipo H8a:8b cepa PG-14, hace pensar en la posibilidad de que en un futuro se pueda presentar resistencia hacia las toxinas de estos dos serotipos. Este problema de resistencia ya ha comenzado a aparecer frente a la cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tóxica para larvas de lepidópteros plagas de varios cultivos agrícolas (McGaughey 1985; McGaughey y Johnson 1987). Y es precisamente en este hecho donde radica la importancia del hallazgo del serotipo H-30, el cual, como se anotó anteriormente, es inmunológicamente diferente a las cepas de referencia ampliamente utilizadas, y en el momento en que aparezca la temida resistencia ya se cuenta con una segunda opción para el control de larvas de mosquitos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación recibió el apoyo financiero de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) y COLCIENCIAS. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dirección de Campañas Directas del Ministerio de Salud por su colaboración durante la colección de muestras en el campo.

## BIBLIOGRAFIA

- ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related pathogens. Microbiological. Reviews (Estados Unidos) v. 50, p.1-24.
- BROWNBIDGE, M.; MARGALIT, J. 1986. New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 48, p. 216-232.
- BURKE, W.; McDONALD, K. 1982. Naturally occurring resistance in *Bacillus sphaericus* and *Bacillus licheniformis*. Current Microbiology (Estados Unidos) v. 9, p. 69-72.

- DAVIDSON, E.W.; URBINA, M.; PAYNE, J.; MULLA, M.S.; DARWAZEH, H.; DULMAGE, H.; CORREA, J.A. 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) v. 47, p. 125-129.
- DULMAGE, H.T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: Burgues, H.D. (Ed.). *Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980*. Academic Press, London. p 193-222.
- DE BARJAC, H. 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Burgues, H. D. (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980*. Academic Press, London. p.35-43.
- HARVEY, W.R.; CIOFFI, J.; DOW J.A.T.; WOLFERSBERG, M.G. 1983. Potassium ion transport. ATPase in insect epithelium. *Journal of Experimental Biology* (Inglaterra) v.106, p.91-117.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; KROHA, M.J. FUKADA, T. COUCH, T.L. 1981. Laboratory tests to evaluate the potencial efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. *Mosquito News* (Estados Unidos) v. 41, p. 85-91.
- KNOWLES B.H.; ELLAR, D.J. 1987. Colloid osmotic lysis is a general feature of the mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins with different specificities. *Biochemica and Biophysica Acta* (Holanda) no.924, p.509-518.
- KRIEG, A.; HUGER, A.; LANDENBRUCH, G.; SCHNETTER, N. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Zeitschrift fur angewandte Entomologie/Journal of Applied Entomologie* (Alemania) v. 96, p. 500-508.
- LOGAN, N.A.; BERKELEY, A.C. 1984. Identification of *Bacillus* strains using API system. *Journal of General Microbiology* (Estados Unidos) v 130, p 1871-1872.
- McGAUGHEY, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* (Estados Unidos) v. 227, p. 193-195.
- \_\_\_\_\_; JOHNSON, D.E. 1987. Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible Indian meal moths (Lepidoptera Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) v. 80, p. 1122-1126.
- MULLIGAN F.S., III; SCHAEFFER, C.H.; WILDER, W.H. 1980. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) v. 73, p. 684-688.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1984. (Approved Standard M2-A3). Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. U.S.A.
- PADUA, L.E.; OHBA, M.; AIZAWA, K. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (Serotype 8a:8b), highly and selectively toxic against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v. 44, p. 12-17.
- POLACK, J.; NOVICK, R.P. 1982. Closely related plasmids from *Staphylococcus aureus* and soil bacilli. *Plasmid* (Estados Unidos) v. 7, p. 152-162.
- SILAPANUNTAKUL, S.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A.; CHAROENSIRI, K. 1983. The comparative persistence of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae in different kinds of environments. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v.42, p. 387-392.
- SNEATH, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Butler J.P. (Ed.). *Bergey's manual of Systematic Entomology*. Vol.2 Williams and Wilkins, Baltimore, MD. U.S.A. p. 1104-1207.
- THIERY, I. 1987. Similarities between crystal protein subunits of *Bacillus thuringiensis* strain Bti serotype H-14 and strain PG-14 serotype H-8a 8b, and their relationships with mosquitocidal activity. *Annales du Institute Pateur de Microbiologie* (France) v. 138, p. 457-470.
- WHITELEY, H.R.; SCHNEPT, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology* (Estados Unidos) v. 40, p. 549-576.
- YOUSTEN, A.; FRETZ, S.B.; JELLY, S.A. 1985. Selective medium for mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) v. 49, p. 1532-1533.