

UN NUEVO AISLAMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* DE COLOMBIA, TOXICO PARA LARVAS DE MOSQUITO

Sergio Orduz¹
Margarita Correa²
Astrid Elena Montoya²
William Rojas³

RESUMEN

Durante la búsqueda de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner en Colombia, un aislamiento mostró patogenicidad para las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Los cristales parasporales tienen forma esférica o irregular y muestran gran similitud con los producidos por el *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. La fracción sobrenadante del cultivo entero no mostró toxicidad, así como tampoco se pudo detectar la producción de la B-exotoxina estable al calor. Se detectó la producción de óxidasas, catalasa, ureasa, arginina, carboxilasa, amilasa, lecitinasa, acetil-metil-carbinol y gelatinasa. Hemólisis en globulos rojos de carnero fue de tipo "a". El aislamiento CIB 131 mostró resistencia natural a varios antibióticos, pero fue sensible a cefoperazona, cefalotina, ácido nalidíxico y trimetoprim sulfametoxazol.

SUMMARY

During a survey conducted in Colombia, an isolate of *Bacillus thuringiensis* showed toxicity towards *Culex quinquefasciatus* larvae. Parasporal crystals were spherical or irregular in

shape and showed a great degree of similarity with those produced by the reference strain *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Supernatant fraction of the whole culture was not toxic. Oxidase, catalase, urease, arginine decarboxylase, amylase, lecithinase, acetil-methyl-carbinol and gelatinase production were positive. Hemolysis on sheep blood agar was "a" type. Production of heat stable B-exotoxin was negative. The isolate CIB-131 showed natural resistance to several antibiotics and was sensible to cephoperazone, cephalotin, nalidixic acid, and trimetoprim sulfamethoxazole.

INTRODUCCION

Actualmente se conocen miles de aislamientos de varias especies del género *Bacillus* productores de esporas. Algunos de ellos, pertenecientes a la especie *thuringiensis* Berliner, han mostrado toxicidad selectiva contra larvas de simúlidos y chironómidos (Undeen y Nagel 1978; Gaugler y Finney 1982; de Barjac 1978; Goldberg y Margalit 1978; Ohba y Aizawa 1979; Padua et al. 1984; Ali 1981; y García et al. 1981).

Desde 1985, cuando McGauey (1985) reportó resistencia de *Plodia interpunctella* (Hübner) a una formulac

Desde 1985, cuando McGauey (1985) reportó resistencia de *Plodia interpunctella* (Hübner) a una formulación comercial de *B. thuringiensis* (B.t.), se ha dedicado atención de manera creciente a la búsqueda de cepas alternativas activas contra larvas de mosquito. Basados en estos hechos, los autores ini-

a la búsqueda de cepas alternativas activas contra larvas de mosquito. Basados en estos hechos, los autores iniciaron en 1988 un programa de búsqueda para el aislamiento de bacterias formadoras de esporas que mostraran actividad larvicida contra los mosquitos, a partir de muestras de suelo colectadas en sitios conocidos como criaderos de mosquitos en varios lugares de Colombia. En éste trabajo se reportan las características morfológicas, bioquímicas y la actividad tóxica del aislamiento CIB-131.

MATERIALES Y METODOS

Area y muestras

El área principal de muestreo cubrió la sección nororiental de Colombia, extendiéndose desde Barrancabermeja (Sant.) hasta Currulao (Ant.) en el norte, y a Quibdó (Chocó) en el occidente. Se tomaron muestras de lodo o tierra, debido a que las esporas de las bacterias de ésta especie se sumergen y acumulan en el lodo, en el fondo de los criaderos de larvas de mosquitos (Davidson et al. 1984; Ignoffo et al., 1981; Mulligan et al. 1980; Silapanuntakul et al. 1983). Las muestras fueron tomadas mensualmente en 16 criaderos de mosquitos y colectadas en bolsas o tubos estériles. Estas muestras se mantuvieron selladas a 4°C hasta cuando se inició el procedimiento de aislamiento. En estos criaderos se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: Alcalinidad, dióxido de carbono, oxígeno disuelto, cloruro, dureza, nitritos, conductividad, pH y temperatura, de acuerdo con los métodos analíticos de Hach (Hach Co., Loveland CO.).

1. M.S., Entomólogo, Corporación para Investigaciones Biológicas, Apartado Aéreo 7378, Medellín, Colombia.
2. Bacterióloga, Corporación para Investigaciones Biológicas, Apartado Aéreo 7378, Medellín, Colombia.
3. M.D., Director Científico, Corporación para Investigaciones Biológicas, Apartado Aéreo 7378, Medellín, Colombia.

Aislamiento de bacterias formadoras de esporas.

Todos los procedimientos de aislamiento fueron desarrollados bajo estrictas condiciones asépticas. Las muestras de lodo o tierra fueron colocadas en tubos de ensayo con 4,5 ml de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7,2, agitada en un agitador ambiental a 250 rpm, a 30°C por 30 minutos. Después de esto, los tubos fueron sometidos a un choque térmico a 78°C durante 15 minutos en un baño de agua con el propósito de eliminar los organismos no formadores de esporas. De allí se tomaron alícuotas de 75 μ l y se sembraron con asa de vidrio en cajas de petri con agar nutritivo más extracto de levadura (ANEL) compuesto de 23 g de agar nutritivo y 3 g de extracto de levadura por litro) e incubando a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Las cajas de petri fueron examinadas después de 48 h y las colonias se seleccionaron de acuerdo con los criterios de forma y tamaño, elevación, apariencia del margen y textura de la superficie; y transferidas por separado a nuevas cajas con ANEL. Los aislamientos fueron coloreados por la técnica de Shaffer y Fulton para observar las esporas (S. Singer, comunicación personal) y clasificadas en tres grupos de acuerdo con Smith et al. (1952).

Ensayos con larvas

Búsqueda. La bacteria de tipo I, grupo al cual pertenece el *B. thuringiensis*, fueron cultivadas en tubos de ensayo con medio líquido B. (Dulmage et al. 1970), compuesto de Proflo, peptona Biosate, glucosa, extracto de levadura, y 10 ml de una solución de sales que contenía $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y MnSO_4 . Después de 48 horas de incubación a 30°C y 150 rpm, se tomaron alícuotas de 100 μ l del cultivo entero final (CEF) y se colocaron con 10 larvas de 3 días de edad de *Culex quinquefasciatus* que habían sido colocadas previamente en 100 ml de agua decolorada. Se establecieron controles negativos sin bacterias y positivos con

B.t. subsp. israelensis (**B.t.i.**). Las lecturas de mortalidad se tomaron 24 y 48 horas después de la aplicación del CEF. Se guardaron, para posterior evaluación, solamente aquellos aislados que causaron más de un 70% de mortalidad a las 48 h.

Bioensayos. Estos experimentos fueron realizados utilizando polvo liofilizado preparado a partir de un cultivo líquido producido en peptona-glucosa-solución de sales (PGSM) (Brownbridge and Margalit 1986). Después de 48 horas de incubación, los cultivos fueron centrifugados y liofilizados. Se homogenizaron 50 miligramos del liofilizado en 3 ml de PBS de acuerdo con los métodos descritos por McLaughlin et al. (1984), y modificados por M. Brownbridge (Comunicación personal) y ensayado contra 20 larvas de *C. quinquefasciatus* de 3 días de edad. Se establecieron tres repeticiones consistentes en tres tasas por dilución. La concentración letal media fue hallada con la ayuda de un programa de computador diseñado por G.A. Milliken (Universidad del Estado de Kansas). El conteo de esporas fue realizado sembrando dos diluciones con tres cajas de petri por replica.

Características morfológicas y bioquímicas

Las pruebas morfológicas y bioquímicas se realizaron teniendo como puntos de comparación las cepas de referencia *B.t.i.* serotipo 14 y *B.t. subsp. morrison* (**B.t.m.**) serotipo 8a:8b y nuestro aislamiento CIB-131 con la ayuda de Oxi-Ferm y Entero Tube (Hoffman La Roche, Basilea, Suiza), de manera similar a la descrita por Logan y Berkeley (1984); otras pruebas se realizaron de acuerdo con Sneath (1986). Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos fueron realizadas utilizando la técnica de difusión en agar NCCLS (1984).

RESULTADOS

Durante la búsqueda de bacterias patógenas para larvas de mosquito realizada entre febrero y julio de 1988, se co-

lectaron 64 muestras de suelo en 16 diferentes hábitats larvales. De ellas, se aislaron 264 colonias de bacterias formadoras de esporas y 125 fueron clasificadas en el grupo I. Sin embargo, solamente una colonia (CIB-131), obtenida en Quibdó (Chocó) mostró toxicidad hacia las larvas de mosquito. Las observaciones microscópicas mostraron un bacilo largo con espora y cristales paraesporales. Las medidas de la célula bacteriana fueron: longitud $4,94 \pm 0,60 \mu\text{m}$, ancho $1,18 \pm 0,25 \mu\text{m}$, posición de la espora y forma subterminal y elipsoide, tamaño de la espora $1,71 \times 0,87 \mu\text{m}$, forma del cristal redondeado con diámetro de $0,79 \mu\text{m}$ (Tabla 1).

Algunas de las características bioquímicas más sobresalientes del *B.t.i.*, y del *B.t.m.* fueron similares a la cepa CIB-131. El estudio fenotípico realizado a la cepa CIB-131 dió los siguientes resultados: gelatina +, catalasa -, lecitinas +, oxidasa -, crecimiento anaeróbico -, arginina decarboxilasa +, lisina decarboxilasa -, ornitina decarboxilasa -, utilización de citrato -, deaminación de triptófano -, hidrólisis de caseína y almidón +, formación de ácido a partir de glucosa, fructuosa, maltosa, melibiosa, y refinosa, no utilización de sucrosa, lactosa, arabinosa, sorbitol, dulcitol, y celobiosa, hemólisis de glóbulos rojos de cordero tipo a. Los resultados de las pruebas bioquímicas se encuentran en las Tablas 2, 3, y 4, en las cuales se compara con otros dos aislados de *B.t.*

La cepa CIB-131 mostró resistencia natural a ampicilina, azlocilina, aztreonam, carbenicilina, cefotaxime, cefuroxime, cefalexina, lincomicina, metronidazol, oxacilina y penicilina (Tabla 5).

La fracción sobrenadante de un cultivo líquido donde se cultivó la cepa CIB-131, no mostró toxicidad hacia las larvas de *C. quinquefasciatus* de 3 días de edad. El uso de polvos liofilizados de esta cepa permitió calcular la concentración letal media (CL_{50}) en miligramos de 100 ml. Las pruebas de toxicidad comparada de las inclusiones paraesporales del aislamiento CIB-131 y

TABLA 1. Características morfológicas de dos aislados de *Bacillus thuringiensis* y el aislado CIB-131.

Parámetro	Ser. 14	Ser.8a:8b	CIB-131
Longitud del bacilo (μ m)	3,72*	5,00	4,94
Ancho del bacilo (μ m)	1,10	1,75	1,18
Posición de la espora	T	T	ST
Forma de la espora	E	E	E
Longitud de la espora (μ m)	2,06	1,86	1,71
Ancho de la espora (μ m)	0,62	0,82	0,87
Forma del cristal	Ro	Rb-Ro	Ro
Tamaño del cristal (μ m)	0,65	1,02	0,79

* Medidas en micras

T =Terminal; ST = Subterminal; E = Elipsoide; Ro = redondo; Rb = Romboide

TABLA 2. Utilización de azúcares por dos aislados de *Bacillus thuringiensis* y el aislado CIB-131

Parámetro	Ser. 14	Ser 8a:8b	CIB-131
Glucosa	+	+	+
Fructuosa	+	+	+
Sucrosa	-	+	-
Lactosa	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Celobiosa	+	+	+
Melibiosa	+	+	+
Raffinosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+

TABLA 3. Utilización de aminoácidos por dos aislados de *Bacillus thuringiensis* y el aislado CIB-131.

Parámetro	Ser. 14	Ser.8a:8b	CIB-131
Lisina	-	-	-
Arginina	-	-	+
Fenilalanina	-	-	-

TABLA 4. Caracterización enzimática de dos aislados de *Bacillus thuringiensis* y el aislado CIB-131.

Parámetro	Ser. 14	Ser 8a:8b	CIB - 131
Ureasa	-	-	+
Gelatinasa	+	+	+
Oxidasa	-	+	-
Lecitinasa	+	+	-
Catalasa	-	+	-
Amilasa	+	+	+
Hemólisis	β	β	a

del *B.t.i.* contra larvas de temprano cuarto estadio de *C. quinquefasciatus* fue 14 veces menos potente que el *B.t.i.* (Tabla 6).

DISCUSION

El hecho de que las bacterias formadoras de esporas sean resistentes a la sequía y a otros factores ambientales les permite una alta sobrevivencia bajo condiciones adversas y permiten su amplia distribución, explicando así su aislamiento de una gran diversidad de habitats (Sneath 1986). Esta aseveración es respaldada por los recientes aislamientos de Padua et al. (1984) y Brownbridge y Margalit (1986).

La falta de toxicidad de la fracción sobrenadante del aislamiento CIB-131 es posible que sea explicada por el hecho de que el componente tóxico puede estar asociado con los cristales paraesporales, como fue descrito por Brownbridge y Margalit (1986) para otros aislamientos de *B. thuringiensis*. El número de esporas por ml de los polvos liofilizados del serotipo 14 y del aislamiento CIB-131 fue menor, comparado con los obtenidos por Brownbridge y Margalit (1986). Debido a que las proteínas tóxicas son sintetizadas de manera sincrónica durante la esporulación (Charles y de Barjac 1982; Mikkola et al. 1982), la toxicidad del aislamiento CIB-131 probablemente se pueda incrementar si el número de células y la formación de esporas puede ser incrementada.

La resistencia natural a agentes antimicrobianos ha sido observada en cepas de *B. sphaericus* por Polack and Novick (1982) y Burke y MacDonald (1982) y ésta resistencia ha sido utilizada para recuperar cepas a partir de muestras de lodo (Yousten et al. 1985).

Las medidas de las células, esporas y cristales de las dos cepas de referencia utilizadas (*israelensis* y *morrisoni*) y el aislamiento CIB-131 revelan un alto grado de similitud. Las diferencias fueron encontradas en el tipo de hemólisis, producción de arginina decarboxi-

TABLA 5. Efecto de algunos agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de dos serotipos de *B. thuringiensis* y el aislado CIB-131.

Antibiótico	Conc µg	Diámetro del halo de crecimiento (mm)		
		Ser. 14	Ser.8a:8b	CIB-131
Ac. Nalidíxico	30	20 S	12 R	24 S
Amikacina	10	27 S	22 S	29 S
Azlocilina1	75	15 I	10 R	10 R
Cefalotina	30	16 I	6 R	18 S
Cefoperazona	75	18 MS	22 S	25 S
Cefoxitin	30	15 I	7 R	15 I
Cloranfenicol	30	24 S	20 S	21 S
Gentamicina	10	28 S	21 S	38 S
Lincomicina	2	8R	6 R	16 R
Norfloxacina	10	27S	30S	32S
Oxacilina	5	0 R	6 R	10 R
Trimetoprin-	10	10 R	6 R	0R
Sulfametoxazol	25	22 S	6 R	25 S

R = Resistente

I = Intermedio

MS = Moderadamente Susceptible

S = Susceptible

TABLA 6. Actividad larvívica de *Bacillus thuringiensis* serotipo 14 y aislado CIB-131 sobre larvas de cuarto estadio de *Culex quinquefasciatus*.

Parámetro	Ser. 14	CIB - 131
Esporas/mg de polvo ($\times 10^8$)	0,48	0,72
LC ₅₀ ($\times 10^4$ mg/100 ml)	0,9	14,10
LC ₉₀ ($\times 10^4$ mg/100 ml)	1,61	25,40
95% Intervalo de confianza ($\times 10^4$ mg/100 ml)	0,86-1,08	12,1-17,1
Pendiente de la línea de regresión	0,22	0,16

LC₅₀ calculado a partir de polvos liofilizados producidos a partir de cultivos de 48 horas.

lasa, oxidasa, catalasa, ureasa, crecimiento anaeróbico, y utilización de sucrosa y celobiosa. Las diferencias en toxicidad, susceptibilidad a los antibióticos y las otras características fenotípicas ya mencionadas sugieren que el aislamiento CIB-131 podría ser una nueva subespecie, un nuevo serotipo de

B. thuringiensis o al menos un nuevo biotipo de una de las ya conocidas subespecies de *B. thuringiensis*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Organización Mundial de la Salud (ID

870321) y Colciencias (2213-05-004-87). Los autores quieren expresar su agradecimiento al personal de Bacteriología y Micología de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, y al Servicio Nacional para la Erradicación de la Malaria de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

ALI, A. 1981. *Bacillus thuringiensis* serotype *israelensis* (ABG-6108) against chironomids and some non target aquatic invertebrates. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 38, p. 264-272.

BROWNBRIDGE, 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. 216-222.

BURKE, W.; McDONALD, K. 1982. Naturally occurring resistance in *Bacillus sphaericus* and *Bacillus licheniformis*. Current Microbiology (Estados Unidos) v.9, p. 69-72.

CHARLES, J.F.; DE BARJAC, H. 1982. Sporulation et cristallogene se de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopie electronique. Annales de Microbiologie (Francia) 133A, p. 425-441.

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.

DE BARJAC, H. 1978. Toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves d' *Aedes aegypti* et d' *Anopheles stephensi*. C.R. Acad. Sci. no. 286, p. 1175-1178.

DULMAGE, H.R.; CORREA, J.A.; MARTINEZ, A.J. 1970. Coprecipitation with lactose as mean of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 15, p. 15-20.

GARCIA, R.; DES ROCHES, B; TOZER, W. 1981. Studies of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito larvae and other organisms. Proceedings of the California Mosquito Vector Control Association (Estados Unidos). v. 49, p. 25-29.

GAUGLER, R.; FINNEY, J.R. 1982. A review of the *Bacillus thuringiensis* var.

- israelensis* (serotype 14) as a biological control agent of black flies. Miscellaneous Publications of the Entomological Society America (Estados Unidos) v. 12, p. 1-18.
- GOLDBERG, L.; MARGALIT, J. 1978. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens* Mosquito News (Estados Unidos) v. 37, p. 355-358.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; KROHA, M. J.; FUKADA, T.; COUCH, T.L. 1981. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. Mosquito News (Estados Unidos), v.41, p. 85-91.
- LOGAN, N.A.; BERKELEY, A.C. 1984. Identification of *Bacillus* strains using API system. Journal of General Microbiology (Inglaterra) v. 130, p. 85-91.
- McGAUGHEY, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science (Estados Unidos) v. 299, p. 193-195.
- McLAUGHLIN, R.E.; DULMAGE, H.R.; ALLS, R.; COUCH, T.L.; DAME, D.A.; HALL, I.M.; OSE, R.I.; VERSOI, P.L. 1984. U.S. Standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. Bulletin of the Entomological Society of America (Estados Unidos) v. 30, p. 26-30.
- MIKKOLA, A.R.; CARLBERG, G.A.; VAARA, T.; GYLLENBERG, H.G. 1982. Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains. An electron microscope study. FEMS Microbiology Letter, v. 13, p. 401-408.
- 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. Villanova, Pa. s.p. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- OHBA, M.; AIZAWA, K. 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 33, p. 387-388.
- 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.
- SMITH, N.R.; GORDON, R.E. CLARK, F.E. 1952. Aerobic spore-forming bacteria, U.S. Department of Agriculture, Agriculture Monograph no. 16, 148 p.
- SNEATH, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-Positive rods and cocci. In: Butler, J.P. Ed. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol 2. Baltimore, Md. Williams and Wilkins. p. 1104-1207.
- UNDEEN, A.H.; NAGEL, W.L. 1978. The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Goldberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. Mosquito News (Estados Unidos) v.38, p. 524-527.
- 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.