

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA FÚNGICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



**“Determinación de la actividad larvicida e insecticida de *Bacillus sp.*,
Trichoderma inhamatum (cepa BOL – 12 QD) y *Beauveria bassiana*
(cepa BOL 2 – QC), frente a la mosca de la fruta (*Drosophila
melanogaster*, cepa ORR) I.I.F.B.-F.C.F.B. La Paz-Bolivia, 2011”**

POSTULANTE: VALLEJOS SIRPA JULIO GREGORIO

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

La Paz-Bolivia
2011



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA FÚNGICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



**“Determinación de la actividad larvicida e insecticida de *Bacillus sp.*,
Trichoderma inhamatum (cepa BOL – 12 QD) y *Beauveria bassiana*
(cepa BOL 2 – QC), frente a la mosca de la fruta (*Drosophila
melanogaster*, cepa ORR), I.I.F.B.-F.C.F.B. La Paz-Bolivia, 2011”**

POSTULANTE:

Univ. Vallejos Sirpa Julio Gregorio

ASESORES

Lic. Espinal Churata Christian René
Lic. Gutierrez Condori Julio Cesar
Enrique Terrazas Siles Ph.D. (†)

La Paz-Bolivia
2011

ÍNDICE

	Pag.
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- JUSTIFICACIÓN	3
III.- OBJETIVOS	5
IV.- DISEÑO TEORICO	6
4.1 MOSCA DE LA FRUTA GENERALIDADES	6
4.1.1 <i>Familia Tephritidae</i>	6
4.1.2 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	7
4.1.3 Principales géneros de la mosca de la fruta	8
4.1.3.1 El género <i>Anastrepha</i>	8
4.1.3.2 Morfología general	9
4.1.3.3 Aspectos Biológicos	10
4.1.4 <i>Ceratitis capitata</i>	10
4.1.4.1 Morfología general	11
4.1.4.2 Aspectos Biológicos	12
4.2 CONTROLES DE MOSCA DE LA FRUTA	13
4.2.1 Manejo integrado de la mosca de la fruta	13
4.2.2 Control Biológico	13
4.2.3 Control químico	14

4.2.3.1	Inconvenientes de los productos químicos	15
4.2.4	Controles Culturales	16
4.2.5	Control de la natalidad	18
4.2.6	Control Etológico	18
4.2.7	Control Legal	19
4.3	ASPECTOS GENERALES DE LAS BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS	19
4.3.1	Descripción del género <i>Bacillus Sp</i>	19
4.3.1.1	Hábitat Natural	20
4.3.1.2	Fisiología bacteriana del genero <i>Bacillus</i>	20
4.3.1.3	Crecimiento y formación de productos	22
4.3.1.4	Diferencia entre especies del genero <i>Bacillus</i>	23
4.3.1.5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	23
4.3.1.5.1	Mecanismo de acción <i>B. thuringiensis</i>	23
4.3.1.5.2	Identificación y caracterización de <i>B. thuringiensis</i>	25
4.3.1.5.3	Clasificación taxonómica de <i>B. thuringiensis</i>	26
4.4	ASPECTOS GENERALES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	26
4.4.1	Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero	27
4.4.2	Germinación de la espora	28
4.4.3	Penetración del integumento	28
4.4.4	Penetración a través de cuerpos abiertos	29

4.4.5	Replicación en el hemocele	30
4.4.6	Dispersión de esporas	30
4.4.7	<i>Beauveria sp</i>	31
4.4.7.1	Características de la especie <i>Beauveria bassiana</i>	31
4.4.7.2	Clasificación taxonómica <i>Beauveria bassiana</i>	32
4.4.8	<i>Trichoderma sp</i>	32
4.4.8.1	Características de <i>Trichoderma</i>	32
4.4.8.2	Micoparasitismo y enzimas líticas	33
4.4.8.3	Antibiosis y metabolitos secundarios	34
4.4.8.4	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma inhamatum</i>	35
4.4.9	La quitina	35
4.4.10	Enzimas quitinolíticas	36
V.	DISEÑO METODOLÓGICO	38
5.1	Diseño experimental	38
5.2	Procedencia de la muestra <i>Bacillus sp</i>	39
5.3	Aislamiento e identificación de <i>Bacillus sp</i>	39
5.3.1	Observación macroscópica	39
5.3.2	Observación microscópica	39
5.3.3	Pruebas bioquímicas	40
5.4	Hongos biocontroladores	41

5.4.1	Procedencia de los hongos biocontroladores	41
5.4.2	Activación de las cepas de estudio	41
5.4.3	Identificación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma imhamatum</i>	41
5.4.3.1	Observación macroscópica	41
5.4.3.2	Observación microscópica	41
5.5.	Producción de las larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> (cepa ORR)	42
5.5.1	Procedencia de <i>Drosophila melanogaster</i>	42
5.5.2	Activación de las cepas de estudio	42
5.6	Evaluación de la Actividad biocontroladora	42
5.6.1	<i>Bacillus</i>	42
5.6.1.1	Evaluación de la actividad larvicida <i>Bacillus sp</i>	42
5.6.1.2	Prueba de interacción <i>Bacillus sp</i> – <i>Drosophila melanogaster</i>	43
5.6.2	Hongos entomopatógenos	43
5.6.2.1	Prueba de interacción <i>Trichoderma imhamatum</i> y <i>Beauveria bassiana</i> – <i>Drosophila melanogaster</i>	43
5.6.3	Actividad enzimática	43
5.6.3.1	Preparación de fermentos de <i>Bacillus sp.</i> , <i>T. inhamatum</i> y <i>B. bassiana</i>	43
5.6.3.2	Obtención de los sobrenadantes	44
5.6.3.3	Actividad Quitinolítica	44
5.7	Análisis estadístico	44
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	45

6.1	Aislamiento de <i>Bacillus sp</i>	45
6.1.1	Observación macroscópica	45
6.1.2	Observación microscópica	46
6.1.3	Pruebas Bioquímicas	47
6.1.4	Medición de la actividad larvicida	47
6.2	Medición de la actividad insecticida	51
6.3	Actividad enzimática	52
VII.	CONCLUSIONES	55
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>Drosophila melanogaster</i>	7
<hr/>	
Figura 2. Ciclo de vida <i>Drosophila melanogaster</i> (modificado de Weigmann et al, 2003)	8
Figura 3. Fruta contaminada por larvas de <i>Anastrepha</i> (Weigmann et al, 2003)	9
Figura 4. Estadio Adulto de <i>Anastrepha</i> sp.	10
Figura 5. Estadio adulto de <i>Ceratitis capitata</i> .	12
Figura 6. Mecanismo de acción de proteínas Cry en insectos lepidópteros	25
Figura 7. Desarrollo en placa de <i>Beauveria bassiana</i> . (Samson et al. 1988)	32
Figura 8. Eventos de interacción de <i>Trichoderma</i> patógeno	33
Figura 9. Estructuras químicas de metabolitos secundarios aislados a partir de <i>Trichoderma</i> spp	34
Figura 10. Estructura molecular de la quitina fuente (Sabry, 1992).	36
Figura 11. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por	

cepas de <i>Bacillus sp.</i> , procedentes de Puerto Acosta (IIFB – 2010).	48
Figura 12. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de <i>Bacillus sp.</i> , procedentes de Escoma (IIFB – 2010).	49
Figura 13. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de <i>Bacillus sp.</i> , procedentes de Coroico (IIFB – 2010).	50
Figura 14. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de <i>Bacillus sp.</i> , procedentes de Palos Blancos (IIFB – 2010).	51
Figura 15. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de <i>Bacillus sp.</i> , y de hongos <i>T. inhamatum</i> <i>B. bassiana</i> procedentes de (IIFB – 2010).	52
Figura16. Actividad enzimática quitinolítica de <i>T. inhamatum</i> , <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Bacillus sp.</i> , medida en los medios de cultivo en Batch, en un lapso de 15 días, (IIFB – 2010).	53
Figura17. Superficie de respuesta del diseño factorial, μmol paranitrofenol/mL/min liberado, por efecto de la actividad quitinolítica de diferentes microorganismos (1. <i>T. inhamatum</i> ; 2. <i>B. bassiana</i> ; 3. <i>Bacillus</i>	54

**sp.). Producido a en diferentes lapsos
de tiempo (IIFB – 2008).**

RESUMEN

En el presente trabajo de tesina se hace una primera investigación sobre la utilización de biocontroladores biológicos de bacterias y hongos entomopatógenos para el control de *Drosophila melanogaster* o mosca de la fruta, realizando la evaluación larvicida e insecticida. Los *Bacillus sp.* Fueron aislados de muestras de tierras provenientes de, Puerto Acosta, Escoma, Palos Blancos y Coroico del departamento de La Paz y los hongos utilizados del cepario del laboratorio de biotecnología fúngica del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas (IIFB) para luego realizar la evaluación enzimática de quitinasas. La mosca de la fruta es una plaga que afecta los cultivos de frutas y es considerada una problemática mundial.

Las muestras de tierras fueron analizadas en el laboratorio de Biotecnología del IIFB, donde se aislaron *Bacillus sp.* identificándolas por diferentes técnicas como la observación macroscópica, observación microscópica y pruebas bioquímicas (fermentación de glucosa, gas CO₂, hidrólisis de almidón y la prueba de Voges Proskauer) donde se observaron las características del *Bacillus sp* y de los hongos (conidias, hifas, y otras propiedades de los géneros de *Trichoderma* y *Beauveria*).

En cuanto se refiere a la evaluación larvicida de *Bacillus sp.*, se encontró una buena actividad en las muestras provenientes de Puerto Acosta donde se observa que las cepas P4, P5, P6 y P7 obtuvieron una actividad de larvicida del 100% cuando se aplicó una concentración de 3×10^6 esp/mL del bioformulado sobre las larvas de la mosca de la fruta.

La medición de la actividad insecticida se realizó mediante la aplicación de esporas de *Bacillus sp*, en una concentración de 3×10^6 esp/mL y de esporas fúngicas a una concentración de 6×10^6 esp/mL a los estados adultos de *Drosophila melanogaster*. En el caso de *Bacillus sp*, la actividad alcanzó al 33%, observando muy poca actividad por parte de este controlador. Mientras que en el caso de *T. inhamatum* y *B. bassiana* se alcanzó una actividad insecticida del 80% y 100% respectivamente.

En el análisis enzimático *quitinolítico de β -quitinasas*, realizado a las tres cepas de estudio, se observó que la mejor actividad enzimática en todos los microorganismos se logró a los 12 días, sin embargo solo, *B. bassiana* alcanza una actividad enzimática de 0.049 U.

PALABRAS CLAVE: larvicida, insecticida, quitinasa.

I.- INTRODUCCIÓN.

En nuestro país, existen diferentes tipos de problemas que atraviesan cultivos agrícolas, entre las que destacan las fitoenfermedades (originada por hongos) y las plagas (insectos); esta última se presenta como la principal problemática del norte paceño, regiones del valle y trópico de Bolivia. Este tipo de afección se observa en la mayoría de casos en el cultivo de frutas, ya sean cítricos, manzana, mango, etc. Las plagas más representativas son: la mosca de fruta (*Ceratitis capitata*) y la mosca de la fruta mexicana (*Anastrepha* spp.)

Existen numerosos métodos para el control de plagas unos más agresivos que otros, tenemos el control natural, que usualmente es llevado a cabo por otros insectos, que matan y devoran al insecto plaga. El control químico, que es uno de los métodos más usados, pero deterioran el ecosistema de la región, contaminando el producto y el suelo. En control biológico, se utilizan componentes como ser extractos de plantas, metabolitos de bacterias y hongos, que no dañan el suelo ni el fruto y que son fácilmente degradados por la luz solar.

En Bolivia, el uso de larvicidas e insecticidas biológicos no es muy frecuente, debido a que la mayoría de los productores agrícolas no tienen conocimiento sobre esta alternativa de control de plagas, que no solamente puede ayudar al control de insectos, sino que también puede mejorar el rendimiento de producción de los cultivos.

En la actualidad se está empleado el uso de microorganismos como ayuda para combatir plagas agrícolas que dañan la producción de los cultivos, reemplazando a los agentes químicos que contaminaban el producto y el medio ambiente.

El control biológico de la mosca de la fruta ha sido desarrollado y aplicado en varios países, y en algunos casos este método ha alcanzado un gran éxito en el control de la plaga. Hoy en día la aplicación de control biológico clásico contra *C. capitata* y

Anastrepha spp. Es usado satisfactoriamente en Sudamérica, Centroamérica, Australia y Hawái. El uso constante y creciente de los productos que se obtienen a partir de *Bacillus thuringiensis* se debe fundamentalmente a su alta especificidad, así como a su inocuidad para insectos benéficos, plantas y mamíferos, incluidos los humanos. Dadas sus propiedades, esta bacteria representa una alternativa útil y complementaria a los insecticidas químicos actuales para el control de algunos insectos fitófagos.

Otra alternativa es el empleo de microorganismos como los hongos entomopatógenos, caracterizados por su capacidad biocontroladora sobre insectos. El empleo de este tipo de hongos ha cobrado importancia en los últimos años. En general, los hongos representan una excelente alternativa porque pueden infectar diferentes estados de desarrollo de su hospedero y son de baja o nula patogenicidad para organismos benéficos, para el humano.

Sin embargo, en nuestro medio no existe información relacionada con la utilización de biocontroladores en base a bacterias y hongos. Debido a esto, en el presente trabajo se plantea determinar la actividad larvicida e insecticida de *Bacillus* sp., *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL 12 QD) y *Beauveria bassiana* (cepa BOL 2 QC) respectivamente, frente a *Drosophila melanogaster* (cepas ORR), trabajo desarrollado en el IIFB de la carrera de Bioquímica en la gestión 2010-2011.

II.- JUSTIFICACIÓN.

La mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) es un problema mundial, debido a que contamina varios tipos de cultivo, dañando los frutos y el rendimiento de producción de los cultivos de frutas. Mientras que la utilización de agentes químicos es dañina para el producto, el medio ambiente y el ser humano, el mercado aun está expuesto a la búsqueda de alternativas para el control de esta plaga.

El control biológico, es una alternativa para el tratamiento de esta plaga, en el que se emplean bacterias y hongos, ya que estos producen metabolitos secundarios con capacidad biocontroladora, enzimas degradativas y toxinas, que son compuestos orgánicos fácilmente degradables por las condiciones ambientales, sin ocasionar daño al ecosistema ni al ser humano.

Los bioinsecticidas son agentes biológicos, sustancias activas o mezclas de sustancias de origen biológico utilizados para disminuir, prevenir, combatir, controlar, regular, o repeler la acción de organismos que son plagas en cultivos de importancia agrícola. Estos bioinsecticidas provocan un impacto mínimo sobre la microbiota ambiental y son efectivos contra las plagas agrícolas, por lo que no tienen restricciones toxicológicas en su empleo.

Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, alternativas a los insecticidas químicos. Esto estimula considerablemente el interés de emplear agentes biológicos (microorganismos), como biocontroladores. El microorganismo más exitoso en cumplir este objetivo, que además mantiene potencial para seguir desarrollándose, es la bacteria con cualidades insecticidas como *B. thuringiensis*, y los hongos entomopatógenos como; *Beauveria bassiana* y *Trichoderma inhamatum*.

En el I.I.F.B. (Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas), hace muchos años se está trabajando en el control biológico de diferentes fitoenfermedades que afectan a cultivos de la región andina. No obstante, ahora se pretende iniciar la investigación del control de plagas (insectos), como respuesta a una de los problemas más importante del Norte de nuestro departamento, caracterizado por la producción de frutas.

El estudio pretende determinar la actividad larvívica de las δ - endotoxinas producidas por *Bacillus sp.* y la actividad insecticida producida por: *Beauveria bassiana* y *Trichoderma inhamatum*, quienes poseen la actividad enzimática quitinolítica frente a *Drosophila melanogaster*.

III.- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad larvicida e insecticida de *Bacillus sp.*, *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL – 12 QD) y *Beauveria bassiana* (cepa BOL 2 – QC), frente a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*, cepa ORR), I.I.F.B.-F.C.F.B. La Paz-Bolivia, 2011

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar el aislamiento de cepas nativas de *Bacillus sp.* a partir de muestras de tierra, procedentes de diferentes regiones del departamento de La Paz.
- Producir un cepario, de *Bacillus sp.* que presenten capacidad biocontroladora sobre *Drosophila melanogaster*
- Realizar la identificación macroscópica, microscópica y perfil bioquímico de *Bacillus sp.*
- Determinar la actividad larvicida de *Bacillus sp.* sobre *Drosophila melanogaster* empleando las esporas del microorganismo.
- Determinar la actividad insecticida de los hongos entomopatógenos *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana* sobre *Drosophila melanogaster* empleando esporas.
- Determinar la actividad enzimática quitinolítica de *Bacillus sp.*, *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana*.

IV.- DISEÑO TEORICO.

4.1 MOSCA DE LA FRUTA GENERALIDADES.

4.1.1 Familia Tephritidae.

Esta familia de *Drosophila melanogaster*, o mosca de la fruta, pertenece al orden de los *dípteros*, e incluye plagas de suma importancia agrícola. A las moscas

pertenecientes a este grupo se les atribuye pérdidas anuales de billones de dólares en pérdidas directas en diferentes variedades de frutos y vegetales (Malavasi, 2000). Por esto, limita en gran manera el desarrollo de la producción agrícola, ya que la presencia de éstas impone restricciones de exportación en mercados de importancia mundial (Carroll *et al*, 2004).

La familia *Tephritidae* incluye aproximadamente 4.400 especies conocidas, de las cuales cerca de 200 son consideradas como plagas y alrededor del 35% de las larvas de mosca de esta familia se desenvuelve dentro de los frutos o nueces de sus hospederos (Araujo, 2002).

Los hospederos de las moscas de la fruta poseen gran relevancia en el mercado mundial, dentro de los más importantes se encuentran los cítricos, mangos, manzanas, ciruelas, entre otros. Recibe este nombre debido a que se lo encuentra alimentándose de frutas en proceso de fermentación tales como [manzana](#), mango, cítricos, etc.

La mosca de la fruta es considerada como el problema más grave que afecta a la fruticultura en el ámbito mundial, debido a su abundancia y el número e importancia económica de los hospederos que ataca, en los que causa daños directos (larvas en fruto) e indirectos lo que causa pérdidas millonarias.

Drosophila melanogaster es utilizado para los trabajos experimentales biológicos ya que es considerado un material adecuado debido a su fácil manejo, su corto ciclo de vida y la gran cantidad de mutaciones que esta puede presentar.

Su hábitat es considerado como cosmopolita, es decir, están ampliamente distribuidas, por lo que se las encuentra en todo tipo de clima, altitud y latitud. Se localizan especialmente en las frutas suaves donde la fermentación se ha iniciado y en general en alimentos con alto contenido de ácido acético.



Clasificación científica	
Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Diptera
Suborden:	Brachycera
Familia:	Drosophilidae
Subfamilia:	Drosophilinae
Género:	Drosophila

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Drosophila melanogaster*

4.1.2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

El ciclo comienza cuando las hembras (son un poco más grandes que los machos) ponen los huevos en la papilla alimenticia.

De los huevecillos salen unas pequeñas larvas que viven en la papilla alimentándose rápidamente. Días después estas larvas comienzan a reptar por las paredes del recipiente de cristal, con capacidad de 250 mL a un tercio de su altura, más o menos, y se fijan. Aquí se transforman en pupas, que tiene forma de pequeñísimas capsulitas. De las pupas nacerán los ejemplares adultos que volverán para aparearse y comenzaran de nuevo el ciclo. La metamorfosis de las larvas dura sobre unos 15 días, y el periodo de vida de un adulto viene a ser de 15 a 20 días.

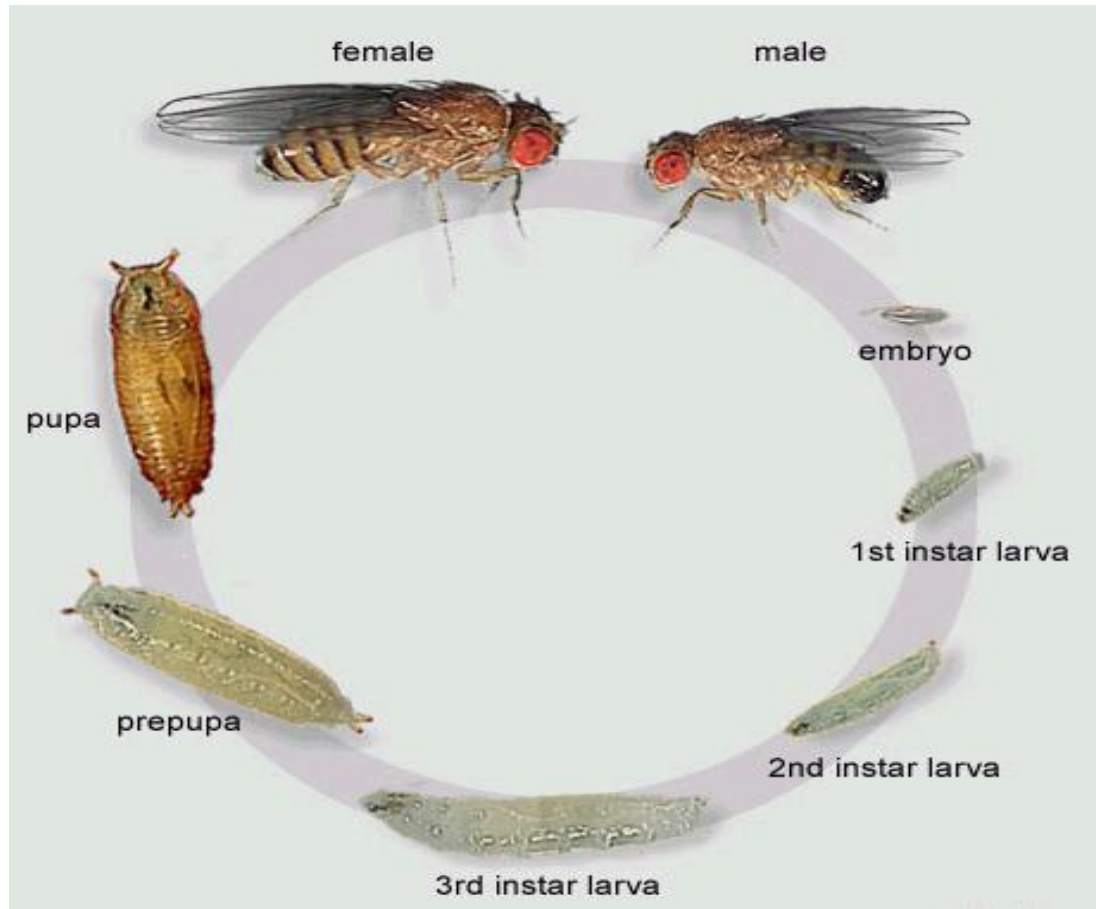


Figura 2. Ciclo de vida *Drosophila melanogaster* (modificado de Weigmann et al, 2003)

4.1.3 Principales géneros de la mosca de la fruta.

Los géneros de la mosca de la fruta de mayor importancia económica en el ámbito mundial son: la *Ceratitis capitata* conocida como la mosca de la fruta o del mediterráneo que se ha reportado atacando más de 250 especies de hospederos (Cristeson y Foote, 1960; liquido 1992). El género *Anastrepha* conocida como la mosca de la fruta de México que tiene reportado a la fecha, alrededor de 185 especies de hospederos, distribuidas en el continente americano (Hernandez Ortiz y Aluja, 1993).

4.1.3.1 El género *Anastrepha*.

El género *Anastrepha* pertenece a un grupo de organismos muy dinámicos, algunas especies bajo condiciones tropicales, pueden completar hasta diez generaciones al año. Presentan una gran adaptabilidad en los agroecosistemas frutícolas, en condiciones óptimas el desarrollo y su grado de infestación y multiplicación es masiva.

Debido al daño provocado por las larvas, muchas de las especies de esta familia causan altas pérdidas en las cosechas de frutos y vegetales (Figura 3).



Figura 3. Fruta contaminada por larvas de *Anastrepha* (Weigmann et al, 2003)

Además, del daño que provoca ésta plaga en su estado larval pueden ser vectores de enfermedades fúngicas, ya que se ha encontrado la presencia de hongos en insectos adultos de mosca de la fruta, lo que puede ser un peligro para los cultivos de importancia económica.

4.1.3.2 Morfología general.

La morfología general de este género según la SAGARPA, *sf.* & Aluja (1993) presenta las siguientes características: cabeza con las genas y el vértice amarillos totalmente; carina facial moderadamente desarrollada y sin una protuberancia media; sedas oculares (receptores táctiles) pobremente desarrolladas y apenas visibles,

frente con dos pares de sedas orbitales presentes; longitud antena moderada. Tórax castaño negruzcas o totalmente negras; con una franja delgada clara que se va ensanchando hacia la parte posterior y dos franjas más a los lados que van de la sutura transversa hasta poco antes de llegar al escutelo. Abdomen con terquitos amarillos. Alas con bandas de color café amarillento pálido ligeramente separadas.



Figura 4 Estadio Adulto de *Anstrepha* sp.

4.1.3.3 Aspectos Biológicos.

Las hembras de este género pueden depositar desde 100 hasta 800 huevos durante toda su vida adulta, estos son ovopositados en el interior de los frutos (Suárez *et al.* 2007). Las hembras depositan sus huevos en más de 90 especies frutales (Norrbon & Kim, 1988; Norrbom 2004; Suárez *et al.* 2007). Aluja (1993), señala que los huevecillos depositados por las hembras pueden diferir en forma y tamaño en las distintas especies pero generalmente son de color blanco de forma alargada y ahusada en los extremos; su tamaño es menor de 2 mm, su estado de huevo dura de 2 a 3 días. Las larvas tiene una longitud de 3 a 15 mm, muestra una forma mucidiforme, ósea, ensanchada en la parte caudal y adelgazándose gradualmente hacia la cabeza, son de color blanco amarillento, su estado larval puede durar de 8 a 15 días.

4.1.4 *Ceratitís capitata*.

Ésta es una de las plagas más importantes de la fruticultura mundial, atacando más de 250 especies vegetales (Suárez *et al.* 2007).

El género *Ceratitís* tiene una especie de particular interés, que ha sido producto de gran investigación en varios campos; esta especie es *C. capitata*, la cual se ha esparcido por todo el mundo desde el continente africano.

Las pérdidas ocasionadas por esta especie de mosca de la fruta varían de entre 10 a 50%, dependiendo del cultivo y de los controles fitosanitarios establecidos. De la Familia *Tephritidae*, *C. capitata*, se considera como la plaga más dañina para la industria frutera en el mundo, si se tiene en cuenta la cantidad de fruta dañada directamente, el aumento de los costos de la producción por las implementaciones de controles, así como la cantidad de mercados que se pierden por la presencia de la misma (Malavasi, 2000; Alves *et al*, 2004). Cabe destacar, que además de las restricciones cuarentenarias y de los daños directos a los frutos, los efectos en la salud humana y en el ambiente debido al uso de plaguicidas sintéticos, es una consecuencia indirecta de la presencia de las moscas de la fruta en plantaciones comerciales (Corvalan, 2004).

4.1.4.1 Morfología general.

El adulto de la Mosca del Mediterráneo difícilmente puede confundirse con otros tefrítidos de importancia económica. Son moscas, de tamaño un tercio menor a la mosca casera, de color café, casi negro y con marcas marfil-amarillo con negro brillante en la parte dorsal del tórax.

La cabeza es oscura, con la cara blanco grisáceo, ojos compuestos, color iridiscente, con cuatro pares de cerdas fronto-orbitales. A las cortas y amplias, tiene un promedio de 5 mm de largo por 2.5 mm de ancho, con manchas muy

características. La parte basal está llena de numerosos puntos redondos y alargados de color que oscila entre café oscuro y negruzco.

En la parte media del ala hay una banda vertical ancha que se extiende del margen costal a las venas cubitales. Esta banda media es principalmente de color amarillo; la parte superior es café oscuro en la celda subcostal estando el resto rodeado de café (SAGARPA, *sf*).



Figura 5. Estadio adulto de *Ceratitís capitata*.

4.1.4.2 Aspectos Biológicos.

Las hembras de *Ceratitís capitata* pueden producir de 300 hasta 800 huevecillos durante toda su vida, bajo condiciones favorables. Los huevecillos eclosionan y dan lugar a larvas, las cuales se alimentan sobre la pulpa de la fruta. Generalmente los frutos se caen en el terreno y las larvas se introducen en el suelo para pupar. Al final del periodo de pupa los adultos emergen del suelo. La duración del ciclo de vida depende de las condiciones climáticas prevalecientes. Bajo condiciones favorables los huevecillos se convierten en larvas en 36 horas cuando la temperatura es de 26 °C y las larvas requieren de 7 días a 24.5-26 °C para alcanzar su madurez.

En la actualidad *C. capitata* se ha expandido por todo el planeta, ya que se adapta a diversas condiciones climáticas; su ciclo de vida le permite cambiar de hábitat de

acuerdo a su estadio y por su gran cantidad de cultivos hospederos, de los cuales se reportan más de 400 de importancia económica y 102 hospederos silvestres.

La mosca de la fruta, está relacionada con una amplia lista de hospederos (INFOAGRO. 2002), entre las especies más importantes y de mayor distribución en Sudamérica: *Anastrepha fraterculus* (conocida como la mosca sudamericana de la fruta); y *Ceratitis capitata* (conocida como la mosca del mediterráneo).

Entre los principales se encuentran el durazno (*Prunus persica*), ciruela (*Prunus domestica*), pera (*Pyrus communis*), manzana (*Malus spp*), aguacate (*Persea americana*), piña (*Ananas comosus*), mango (*Mangifera indica*), chile (*Capsicum spp.*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), berenjena (*Solanum melongena*), pepino (*Cucumis sativus*), café (*Coffea arabica*), etc (SEGARPA. 1997).

4.2 CONTROLES DE MOSCA DE LA FRUTA.

4.2.1 Manejo integrado de la mosca de la fruta.

El manejo integrado de la mosca de la fruta, tiene como objetivo el manejo de las poblaciones de la plaga, mediante la utilización de todas las técnicas disponibles, con la finalidad de evitar el daño económico de la plaga y minimizando los efectos secundarios de su control (Aluja, 1993).

El manejo de la plaga implica la necesidad de un conocimiento profundo de los factores que interviene en el problema, tales como son: el conocimiento de la vegetación local y biológica, hábitos del insecto, el conocimiento de la fenología de los hospederos cultivados y silvestres, aspectos sociales políticos y económicos así como la determinación del momento oportuno de control en función de los niveles de población de la plaga, entre otros (Aluja, 1993).

4.2.2 Control Biológico.

Es un método barato, efectivo y que no interfiere con otros elementos del ecosistema, aunque es muy sensible a la acción de otras tácticas de control como el uso de químicos Steiner, W. A. (1996).

Nicholls (2004), manifiesta que el control biológico clásico consiste en la regulación de la población de una plaga mediante enemigos naturales exóticos (parásitos, depredadores y/o patógenos) que son importados con ese fin.

El control biológico juega un papel importante en reducir el impacto negativo de un gran número de insectos plaga (Hernández, V. 2003), asimismo el uso de agentes de control biológico de plagas ha demostrado ser amigable al ambiente y seguro a los humanos (Pimentel, 1984); ofreciendo soluciones sustentables a problemas de insectos plaga.

El control biológico se define como, cualquier condición o practica por medio el cual, la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduzca a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad (FAO. 2005.).

El control biológico es el empleo de extractos de hongos, bacterias y otros insectos depredadores para combatir las plagas, de forma que, así se evita o reduce el empleo de plaguicidas que dejan residuos tóxicos en los frutos y plantas y son puros venenos para la salud humana.

4.2.3 Control químico.

El control de plagas con productos químicos es cada vez más complicado. La exigencia por los consumidores en la reducción de la aplicación de estos productos es cada vez más notable. Los productos agroquímicos no siempre dan buenos resultados, por lo que, se presta hoy día, mucha importancia a una agricultura mas biológica. Para iniciar una lucha biológica, se debe reducir las aplicaciones de

pesticidas durante un tiempo determinado y instando al agricultor a aceptar la no venta de sus productos hasta alcanzar una producción controlada biológicamente.

Muchas actividades del hombre tienden a incrementar o crear nuevas plagas: introducción de plagas potenciales en áreas libres de ellas, monocultivos, introducción de animales y plantas exóticas, simplificación de un ecosistema como resultado de actividades agrícolas e industriales entre otras (Aluja, 1993).

El control químico se lo utiliza como una última alternativa de control, debido a que no solo eliminan los insectos no deseados sino que acaban con un gran número de insectos benéficos como polinizadores y depredadores (Altieri & Nicholls, 2000). Además cuando se utiliza el mismo tipo de insecticida químico para controlar una plaga, es muy probable que este no actúe eficientemente debido a que la plaga desarrolla resistencia química al pesticida, hoy en día existen más de 450 especies de artrópodos resistentes a 1.000 diferentes insecticidas (Nicholls, 2004).

En la actualidad se está trabajando con insecticidas biológicos, esta moderna concepción de lucha biológica se está realizando con buenas perspectivas y prometedores resultados no solo ecológicos (respecto al ambiente) sino también económicos, lo que presenta facilidad de encontrar cepas utilizables de bacterias, que materias activas de insecticidas químicos; menor coste de homologación de producto biológico que de naturaleza química; y un mercado potencial muy grande. Los campos de actuación más prometedores son: virus, nemátodos, hongos, bacterias (Altieri & Nicholls, 2000).

Para el combate de la mosca de la fruta es posible hacer aplicaciones selectivas. Estas se logran mediante la combinación de un cebo con un tóxico. El beneficio de este tipo de aplicación consiste en no afectar a otros insectos que pueden ser benéficos y de esta forma se minimiza el efecto sobre el equilibrio de los ecosistemas. Los insecticidas recomendados son del tipo Malathión, ya que éstos, además de ser efectivos contra la mosca de las fruta, son de baja toxicidad para el

hombre, animales domésticos. El cebo más confiable es la proteína hidrolizada, debido a su mayor atracción, pero, a falta de ésta, es posible utilizar productos de fermentación como las melazas. Debido a su selectividad y poder de atracción, esta mezcla no se aplica con una cobertura total, sino que se puede aplicar en bandas alternas.

Otra alternativa es la aplicación en mancha a los troncos de los árboles. La época de la aplicación dependerá de la situación específica de cada lugar. En general, se recomienda efectuarlas con un intervalo de 8 a 15 días durante la época de fructificación. No es conveniente hacerlas al momento de la floración, aun cuando el trampeo indique la presencia de la plaga, ya que el contacto de la gota con la flor puede ocasionar la caída de éstas. Tampoco deberán hacerse después de la época de fructificación, ya que entonces la presencia de las moscas no provoca daño económico (Boscán, 1993).

4.2.3.1 Inconvenientes de los productos químicos.

Dentro de los productos químicos existen varios tipos todos ellos muy utilizados en agricultura, tanto para combatir plagas, enfermedades, malas hierbas, etc.

Estos productos son:

Insecticidas: Combaten a los insectos.

Acaricidas: Contra los ácaros araña.

Avicidas: Repelentes de aves.

Fungicidas: Control contra enfermedades ocasionadas por hongos.

Herbicidas: Eliminan las malas hierbas.

La contaminación del medio ambiente es un problema por la utilización de estos productos químicos que dejan unas sustancias químicas residuales que suelen ser tóxicas.

Tras el uso prolongado de los productos químicos se producen resistencias en las plagas las cuales es difícil de eliminarlas con un producto químico o con otros que tengan la misma materia activa.

Estos productos afectan al desarrollo vegetativo de la planta, tanto su crecimiento como su porte que se aprecia totalmente dañado. Perjudican la salud humana de una forma directa, ya que estos productos crean unas sustancias residuales que quedan en los frutos y se transforman en el organismo cuando es ingerido ese alimento.

También perjudican la salud cuando se efectúan las curas directas, puesto que los productos químicos penetran en la ropa o por el contacto directo con la piel y por el gas que desprende algunos de ellos, afectando también el aparato respiratorio.

Son contaminantes, contaminan las aguas naturales debido a lluvias o riegos que arrastran estos productos acaban en los ríos, lagos, aguas subterráneas y mares contaminándolos.

4.2.4 Controles Culturales.

Los controles culturales también son conocidos como Mecánicos-Culturales, los cuales contribuye eficientemente con el control de la plaga de mosca de la fruta (SENASA, 2007), una de las características más importantes del control Mecánico-Cultural radica en su fácil aplicación, de tal manera que debe de formar parte de las labores que normalmente realiza el productor, las principales labores que forman

parte del control cultural de mosca de la fruta según Aluja (1993) & SENASA, (2007) son:

1. Recolecta y destrucción de frutos.
2. Rastrillado del suelo.
3. Podas sanitarias.
4. Periodos de campo limpio.
5. Destrucción de posibles hospederos.
6. Control y vigilancia en los predios.

El control cultural incluye una serie de medidas físicas o mecánicas como su nombre lo indica Mecánico-Culturales, las cuales son usadas directa o indirectamente para matar insectos problema o crear un ambiente inapropiado para su establecimiento. Generalmente, estas medidas influyen sobre el ciclo reproductivo. Para llevar un correcto control cultural es necesario hacer un control de malezas dentro de los huertos, ya que de otra manera no se podrá ver dónde cae la fruta quedando escondida (Aluja, 1993), lo que puede provocar un foco de infestación de la plaga. Además, permite a las moscas recién emergidas encuentren refugio para protegerse de depredadores e inclemencias del clima es por esto que muchos autores recomiendan el control exhaustivo de plantas no deseadas.

Cuando se coseche, debe insistirse en cortar toda la cosecha del árbol. Todo fruto caído, desechado o maduro debe enterrarse a una profundidad de 60 cm de la superficie y ser tapado con tierra. También se debe de controlar las malezas que crecen dentro del huerto, ya que de otra manera no se visualiza adecuadamente dónde cae la fruta y permite a las moscas recién emergidas hallar un refugio donde protegerse de los depredadores y las inclemencias del tiempo. Otra medida importante es el rastreo del suelo para exponer a la superficie las pupas enterradas en el mismo; éstas morirán por desecación o al ser depredadas (Boscán, 1993: Comité Técnico Sectorial Agropecuario, 1999).

4.2.5 Control de la natalidad.

Este control también es conocido como la técnica del insecto estéril, esta técnica fue concebida por Knippling hace más de 25 años, y desde entonces ha sido con éxito para el control y erradicación de algunas plagas (Aluja, 1993), se destacan entre ellas la mosca de la fruta y el gusano barrenador del ganado entre otras. La aplicación se basa en la liberación de moscas esterilizadas, en una proporción de 100 estériles por cada mosca salvaje (SENASA, 2007). El objetivo es que estas últimas se apareen con las estériles, si todo sale bien, el 99 % de los apareamientos no dan descendencia y por lo tanto, la población disminuye sin contaminar el ambiente con pesticidas (Gallardo, s.f.). Para la aplicación de esta técnica se deben tomar en cuenta varios aspectos como por ejemplo la distribución de la plaga, la incidencia que tiene ésta en nuestro cultivo, el número de insectos a liberar, entre otras, pero la de mayor importancia es el costo que genera un programa del insecto estéril y si es que nuestro cultivo justifica la inversión para la ejecución de esta técnica.

4.2.6 Control Etológico.

La rama de la biología encargada del estudio del comportamiento de los animales e insectos es la Etología, y es la que nos nutre de los conocimientos necesarios para realizar un control etológico. En el caso de los insectos, con un sistema nervioso simple, el comportamiento está determinado por respuestas fijas a estímulos que pueden ser físicos, mecánicos, pero que predominantemente son de naturaleza química (Marín, s.f.). Esas respuestas resultan ser fijas, hereditarias, repetitivas y por lo tanto predecibles y precisamente esta característica es la que nos habilita a buscar determinados comportamientos que sean convenientes a nuestras estrategias (Aluja,

1993). De esta manera se aprovecha en comportamiento de las plagas para la elaboración de trampas y cebos, los cuales juegan un papel muy importante en el manejo integrado de plagas.

En el control y monitoreo de mosca de la fruta existen dos tipos de cebos:

1) Cebos alimenticios: dentro de estos cebos se encuentran la proteína hidrolizada, los fermentos de frutos, levaduras que son muy atractivas para las moscas de la fruta.

2) Cebos con base en feromonas sexuales: se utiliza en trampas pegajosas (Jackson) como por ejemplo *Trimeldure* la cual es específico para machos de *Ceratitis capitata* y para moscas exóticas del género *Bactrocera* sp. se utiliza Eugenol + Cuelure (Aluja, 1993)

4.2.7 Control Legal.

Son normas de cumplimiento obligatorio contenidas en convenios internacionales, leyes, reglamentos, protocolos y directivas, con el control y erradicación de una plaga.

En base a este control se puede permitir la salida o entrada de cualquier fruto a un lugar donde ya se ha erradicado dicha plaga o simplemente para evitar que las poblaciones de las plagas se incrementen (SENASA, 2007).

Para realizar un correcto control legal, debe basarse en evidencia científica sólida, registros de inspecciones y por sobre todo, no debe incluir registros dudosos (Willink & Villagrán, 2007).

El control legal constituye una parte fundamental en el manejo integrado de plagas, debido a que sus acciones tienen un efecto importante en la dispersión, control y erradicación de las plagas. Respecto al control legal de moscas de la fruta esta se

realiza a través de cuarentenas, permisos para movilizaciones de fruta, certificados de origen, constancias técnicas de la ejecución de las medidas de control entre otras. disposiciones todas ellas, emitidas de la ley de sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos, Mexicanos decretada el 13 de diciembre de 1974 y el reglamento de ley de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos, Mexicanos en materia de sanidad vegetal, emitido el 18 de enero de 1980 (Aluja 1993).

4.3 ASPECTOS GENERALES DE LAS BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS.

4.3.1 Descripción del genero *Bacillus Sp.*

La familia *Bacillaceae* comprende a las bacterias en forma de bastones o formas variables que forman endoesporas.

Las especies de *Bacillus* comúnmente conocidas como formadoras de esporas son Gram positivas o Gram variables. Las células vegetativas son lisas y redondas o ligeramente alargadas pueden encontrarse solas o en cadenas cortas o muy largas.

Los *Bacillus* en general, crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes como fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno.

Por otra parte, las enzimas hidrolíticas que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos (lecitinasas).

4.3.1.1 Hábitat Natural.

La mayoría de las especies de *Bacillus sp.* son saprófitos y están distribuidos ampliamente en la naturaleza, particularmente en suelos, de donde se expanden a través del polvo, agua y materiales de origen animal y vegetal. Su supervivencia se debe a la resistencia que le da la endospora.

El amplio rango de características que se observan dentro del género está reflejado en una diversidad de variantes facultativas de las especies mesofílicas, termofílicas facultativas y obligadas, acidófilos y halofílicas, estas cepas son capaces de sobrevivir en condiciones de temperatura, pH y salinidad, que inhibirían o matarían la mayoría de los otros microorganismos. Como resultado, los miembros de este género pueden encontrarse en cualquier ambiente desde tierras árticas, tierras fértiles, estanques de agua dulce y salada. Actualmente, las especies de *Bacillus* se encuentran primariamente en laboratorios de microbiología como contaminantes (Brock, 1993).

4.3.1.2 Fisiología bacteriana del género *Bacillus*.

En la mayoría de los casos, la producción de antibióticos parece relacionarse con el proceso de esporulación, y el antibiótico se libera cuando el cultivo entra en la fase estacionaria del crecimiento y después se produce la esporulación.

La esporulación incluye una serie de eventos muy complejos, no ocurre cuando la célula se divide, sino solo cuando el crecimiento cesa debido a la falta de un nutriente esencial. Una spora es una estructura latente capaz de sobrevivir durante periodos prolongados, provista de la capacidad de restablecer el estadio vegetativo de crecimiento, en condiciones ambientales favorables.

La parte de la corteza está constituida por glucopéptidos, una molécula típica de la endospora es el ácido dipicolínico. Además las esporas son ricas en iones calcio y la mayor parte está asociada a la corteza en combinación con el ácido dipicolínico, esta combinación influye en la resistencia al calor.

En la esporulación, suceden una serie de cambios estructurales, la posición de la endospora varía en las distintas especies de *Bacillus*, unas veces se sitúan en el centro, en el extremo terminal y antes del extremo (sub terminal).

Durante la esporulación, se han identificado siete estadios (O-.VII), en cada estadio son distintos los procesos de esporulación por su aparición secuencial.

Estadio O: Representa el estadio de la célula al fin del crecimiento exponencial, en un momento en el cual la célula vegetativa contiene dos cromosomas.

Estadio I: Donde ocurren los eventos más importantes como ser la producción y excreción hacia el medio (productos metabólicos) y varias exoenzimas.

Estadio II Se caracteriza por la formación de un tabique en la espora en desarrollo cerca de un polo de la célula, dando como resultado de la segregación del material nuclear en dos compartimentos la célula madre y la espora. Durante este periodo existe un marcado aumento de la alanina-deshidrogenasa, importante enzima de germinación.

Estadio III: Durante este estadio se forma el protoplasma de la espora como consecuencia del crecimiento unidireccional de la membrana citoplasmática de la célula madre, alrededor de la espora en desarrollo. La actividad de una cantidad de enzimas se incrementa notablemente durante este estadio.

Estadio IV: Entre las membranas externas e internas de la espora en desarrollo se deposita un glucopéptido y constituye el principal componente de la capa cortical. En este estadio la actividad metabólica es considerablemente menor que de la célula vegetativa.

Estadio V: El depósito de la proteína de la cubierta y la incorporación de cistina llevan a una estructura cortical completa.

Estadio VI: Durante este estadio, se produce la moderación de la espora y el citoplasma del protoplasto de la espora se vuelve más homogéneo y electro denso.

Hay una síntesis continua del glucopéptido cortical, o una modificación de este y una captación de ácido dipicolínico y calcio.

Estadio VII: La endospora madura liberada de la célula madre, esto es iniciado por una enzima lítica sintetizada o inactiva después de la maduración de la endospora. (Stanier, Roger, 1985).

4.3.1.3 Crecimiento y formación de productos.

El crecimiento bacteriano es un proceso de replicación de todas las estructuras celulares, sus organelos y componentes protoplasmáticos a partir de los nutrientes presentes en el ambiente del sistema. Para que se pueda producir el crecimiento bacteriano, se debe proveer al microorganismo de todas las sustancias fundamentales para la síntesis y el mantenimiento de su protoplasma, una fuente de energía y condiciones ambientales adecuadas. El crecimiento puede dividirse en diversas fases llamadas, fase logarítmica o de retardo, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Los procesos que ocurren durante el crecimiento, principalmente donde el producto deseado es un metabolito microbiano. Existen dos tipos básicos de metabolitos microbianos, aquellos que se llaman primarios y secundarios. Un metabolito primario es el que se produce durante la fase primaria de crecimiento del microorganismo, en tanto que un metabolito secundario es el que se produce cerca de fase estacionaria del crecimiento.

4.3.1.4 Diferencia entre especies del genero *Bacillus*.

Uno de los aspectos más distintivos del género es el rango más amplio del contenido de guanina + citosina de su ADN, que varía de 32 a 62 %. Existe una gran diversidad en el tipo de metabolismo, requerimiento nutricional, composición y estructura de la pared celular. Virtualmente todas las especies actualmente reconocidas secretan una variedad de enzimas extracelulares solubles.

El *B. anthracis* es el único patógeno para el hombre dentro del género; el *B. thuringiensis*, es un patógeno de insectos por la proteína cristalina toxica producida durante la esporulación. La proteína interfiere en el desarrollo del insecto y se utiliza como un insecticida biológico. (Joklink, 1987).

4.3.1.5 *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis es una bacteria gram positiva con capacidad de esporulación. Es muy semejante a otras especies del genero *Bacillus*, como *B. cereus* y *B. anthracis*, pero se diferencian de ellas por la formación de un cristal proteínico en el momento de la esporulación. El cristal está compuesto por proteínas, algunas de las cuales son extremadamente toxicas contra insectos, principalmente de los ordenes *Lepidóptera*, *Díptera*, y *Coleóptera*; mientras que los mamíferos, incluido el hombre, no se ven afectados y que la mayoría de los vectores de enfermedades humanas son del orden *Díptera*. Además que estas proteínas son biodegradables, por lo que no contaminan suelos ni aguas del ecosistema. Por estos motivos, esta bacteria es utilizada como una alternativa ecológicamente sostenible a los insecticidas químicos para controlar plagas agrícolas, plagas forestales y vectores de enfermedad (Wharton, R. & Quicke, D. 1988.).

4.3.1.5.1 Mecanismo de acción *B. thuringiensis*.

B. thuringiensis tiene un ciclo de vida que comprende la formación de endoesporas cuando las condiciones del medio en el que se encuentran son adversas. Las endoesporas son una forma de resistencia frente a situaciones de estrés ambiental como la desecación o la elevada temperatura y la falta de nutrientes, entre otros. Junto con la endospora también forma un cristal paraesporal (proteínas Cry)

constituido por δ -endotoxinas. Cuando estas proteínas contenidas en el cristal son ingeridos por las larvas de los insectos susceptibles se origina la intoxicación.

Las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas y sus enzimas digestivas (principalmente tripsina y quimiotripsina) disuelven los cristales y activan a las protoxinas por cortes proteolíticos, convirtiéndolas en toxinas. La toxina es reconocida por receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto, se ancla a ella y forma canales iónicos, causando un desequilibrio osmótico y por tanto la lisis celular. Esto provoca en último término la muerte del insecto. Las endoesporas de *B. thuringiensis* se mantienen en el canal alimentario, donde, después de una disminución del pH provocada por el desequilibrio osmótico, pueden germinar (Wharton, R. & Quicke, D. 1988).

Una característica importante de estas toxinas es su alto grado de especificidad. En la relación toxina - insecto susceptibles se han descrito cuatro niveles de especificidad. El primer nivel corresponde a la conducta alimentaria del insecto; este debe ingerir con su alimento las endoesporas y los cristales de *B. thuringiensis*. El segundo nivel viene definido por el pH del intestino medio del insecto, que debe ser alcalino, pues la mayoría de los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* se solubilizan a pH alto. El tercer nivel es debido a las proteasas alcalinas del intestino del insecto; estas han de ser las adecuadas para poder digerir parcialmente las proteínas, es decir, realizar el paso de protoxinas a toxina. Por último, el cuarto nivel de especificidad corresponde a los receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto; las toxinas deben ser reconocidas por los receptores para poder anclarse a la membrana Zhang *et al* 2008.

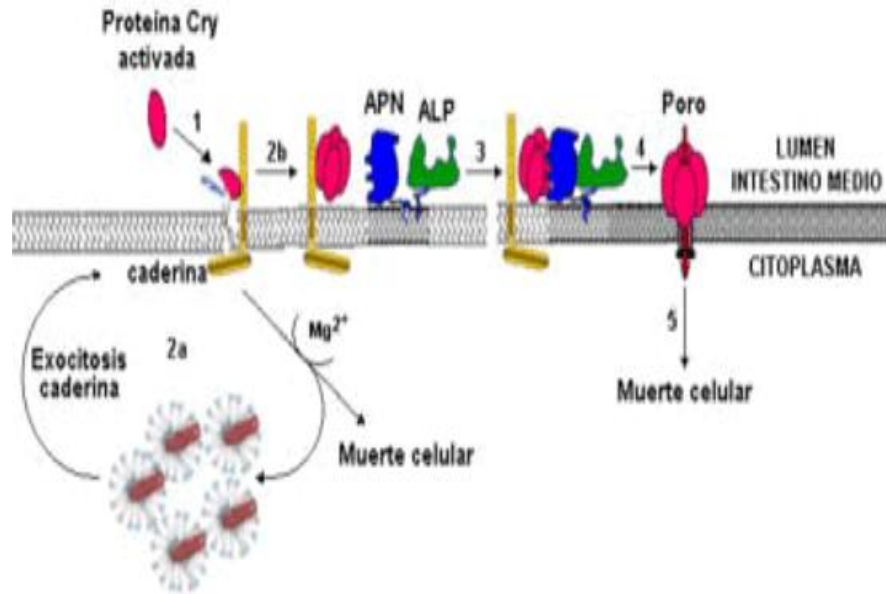


Figura 6. Mecanismo de acción de proteínas Cry en insectos lepidópteros. 1) Unión de la toxina a caderina y clivaje desde su extremo C-terminal para generar la forma monomérica activa; 2a) inicio de la cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} , estimulación de exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical y consiguiente muerte celular; 2b) formación de la estructura oligomérica pre-poro; 3) unión del oligómero a la aminopeptidasa N (APN) y/o fosfatasa alcalina (ALP) y migración a zonas específicas de la membrana; 4) formación del poro; 5) desequilibrio osmótico y consiguiente muerte celular. (Adaptado por Vallejos, 2011).

4.3.1.5.2 Identificación y caracterización de *B. thuringiensis*.

Los métodos de identificación que se utilizan habitualmente para la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de *B. thuringiensis* son; el serotipo flagelar, la descripción morfológica del cristal paraesporal, la caracterización por métodos moleculares y los bioensayos.

Se determinó el desarrollo morfológico y de pigmentación en el medio de cultivo, la morfología de las colonias de *Bacillus sp.* Crecidos en placa pueden variar en relación con el medio de cultivo utilizado. En agar nutritivo forma colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro. El diámetro que avanza en la placa de cultivo depende directamente de la densidad de colonias que alberga. Su textura es seca y cerosa, apreciándose en colonias maduras que su círculo central posee una superficie de apariencia más brillante y lisa que el halo externo, mate, debido probablemente a la esporulación de las células centrales, más adelantadas

del ciclo. (Ros, J. Alemen, A. Castillo, E. Crespo, J. Latorre, Y. Moner, P. Sastre C. Wong, E. 1996).

4.3.1.5.3 Clasificación taxonómica de *Bacillus thuringiensis*.

Reino : Eubacteria
Filo : Firmicutes
Clase : Bacilli
Orden : Bacillales
Familia: Bacillaceae
Género: *Bacillus*
Especie: *thuringiensis*

4.4 ASPECTOS GENERALES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.

A nivel mundial existe un importante interés en la explotación e investigación de hongos que producen enfermedades en invertebrados y es evidente el número de productos comerciales disponibles bajo desarrollo, a base de estos microorganismos. Las tendencias de investigación y comercialización de estos organismos se basan en una serie de beneficios que se pueden optar al incluirlos como biocontroladores de plagas, como por ejemplo en la productividad de los cultivos, en la salud animal y humana y en el aumento en la producción. El producto final para comercializar pasa por una serie de procesos en donde se ven involucradas una gran variedad de disciplinas como la patología, ecología, genética, biotecnología, fisiología, producción en masa, formulaciones y aplicación de estrategias. Los productos a base de bacterias, virus, nematodos y hongos son una opción en donde se han prohibido los productos químicos, en donde los insectos han generado resistencia a estos productos, o en sistemas de producción orgánica. Además son una herramienta de valor en las nuevas tendencias de los mercados importantes, en donde se exigen productos libres de contaminación, esto aunado a la preocupación por la preservación de la biodiversidad y la salud humana (Butt *et al*, 2001).

Los hongos entomopatógenos fueron los primeros microorganismos reportados como causantes de enfermedades en insectos, esto debido a su crecimiento macroscópico en la superficie del hospedero. La mayoría son patógenos obligados o facultativos, aunque algunos son simbióticos y saprófitos. Constituyen un grupo de importancia en el control de plagas agrícolas, ya que virtualmente todos los insectos muestran susceptibilidad a las enfermedades que causan. Se conocen alrededor de 100 géneros de hongos entomopatógenos afectando principalmente a los órdenes *Hemiptera*, *Díptera*, *Coleóptera*, *Lepidóptera*, *Hymenoptera* y *Orthoptera*, los cuales constituyen los órdenes en donde se encuentran las plagas más dañinas en la agricultura. Entre los más estudiados y utilizados se encuentran *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, los cuales se han incorporado a nivel mundial y regional en programas de control biológico (Butt *et al*, 2001; Monzon, 2001; Obregón, 2001; Alean, 2003).

En general los hongos entomopatógenos afectan todos los estadios del insecto, principalmente adultos, estados inmaduros (ninfas, larvas), sin embargo el estado de pupa y huevo son menos comunes. Además la especificidad es variada, ya que algunos son muy específicos a una sola especie de insectos, mientras que se encuentran también de alto rango (Alean, 2003).

4.4.1 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero.

El crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones del ambiente (temperatura, humedad, luminosidad). La alta humedad y alta temperatura les permite una mejor esporulación y germinación de las esporas. El modo de acción de los hongos entomopatógenos es muy particular ya que inicia cuando la espora está en contacto con la cutícula externa del insecto, este mecanismo se presenta solo en estos organismos y en algunos nematodos entomopatógenos, al contrario sucede en otros agentes entomopatógenos como los virus y bacterias en donde la infección del insecto ocurre por vía oral (Dimbi *et al*, 2003). Es de esencial

importancia que el insecto entre en contacto con el inóculo, específicamente con las esporas del hongo, lo cual ocurre al azar en condiciones ideales de clima y en donde exista suficiente cantidad de inóculo. Específicamente la epicutícula o capa más externa del integumento del insecto es el sitio inicial de interacción.

El integumento es una estructura compleja, cuya composición es importante para el proceso de penetración. Las características físicas y químicas de las superficies de integumento y de la espora son las responsables de esta unión. Entre los componentes principales del integumento se encuentran lípidos, lipoproteínas, polifenoles y proteínas. Azúcares no-estructurales y compuestos nitrogenados producidos por las plantas o el insecto pueden contaminar la cutícula, afectando así el proceso de fijación. Algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las esporas. La micosis ocurre por lo general en tres fases, la germinación de la espora en la cutícula del insecto, la penetración del integumento por medio de un tubo germinativo y el desarrollo del hongo por dentro del cuerpo del insecto y su multiplicación. En este se pueden verificar los siguientes pasos: Adhesión, germinación, penetración, multiplicación del hongo, producción de toxinas, muerte del insecto, colonización, producción de micelio hacia el exterior, esporulación y diseminación del hongo (Monzon, 2001; Obregón, 2001). La adhesión se da cuando las esporas del hongo se fijan en la superficie del insecto. Este proceso es el más importante y depende de una serie factores que pueden ser de relevancia a la hora de implementarlo en un programa de control biológico. Dentro de este proceso intervienen lectinas, mucopolisacáridos y en menor cantidad algunos lípidos.

4.4.2 Germinación de la espora.

La germinación es el proceso siguiente, cuando la espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas y además emite un tubo germinativo el cual forma más adelante un apresorio (modificación de hifas para infección de células epidérmicas). El tubo

germinativo puede ser de tamaño variable y en algunos casos puede no llegar a formarse.

En el proceso de germinación juegan un rol importante los requerimientos nutricionales de la espora y las condiciones ambientales presentes. El nivel de agua es determinante en el crecimiento de los hongos y pequeñas diferencias en los niveles de humedad relativa después de la aplicación de conidias, pueden determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga.

4.4.3 Penetración del integumento.

El resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Obregón, 2001).

Una vez que ocurre la germinación, ocurren una serie de transformaciones físicas y químicas tanto el huésped como en el hongo, lo que permite la entrada del patógeno. En general, una vez que el conidio este germinada, estas penetran por medio de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica por el tubo germinal. La capa cuticular es deformada por la presión ejercida por el extremo invasivo de la hifa. Se produce un tubo germinativo y un apresorio, el que se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. En conjunto actúan dos mecanismos uno físico y uno químico. El físico consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, el cual rompe áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción de varias enzimas principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido, lo que facilita la penetración física. Las enzimas descubiertas en el tubo germinativo son proteasas, aminopéptidasas, lipasas, esterases, y Nacetil- glucosamidasa (quitinasas). El proceso de multiplicación se da en el interior del cuerpo del insecto, principalmente por gemación

produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas en los *Deuteromycetes*, también se pueden formar hifas, protoplastos y células sin pared (Monzon, 2001; Alean, 2003; Mora, 2004). Los insectos tienen un sistema inmunológico que les permite reconocer y reaccionar a partículas extrañas como propágulos de hongos, bacterias y virus, en el hemocele del insecto, los cuales pueden ser fagocitados, evitando así la presencia de otros organismos.

4.4.4 Penetración a través de cuerpos abiertos.

Los hongos son capaces de infectar a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de un insecto. Debido a que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápido en este ambiente, por otro lado los fluidos digestivos pueden destruir la espora o hifa germinativa. En ciertas ocasiones la digestión de estructuras fúngicas pueden causar la muerte por toxicidad más que por micosis. Los hongos pueden infectar a través de los espiráculos y otros cuerpos abiertos. Una vez en el hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. La producción de toxinas y enzimas son las responsables de la muerte del insecto ya que consumen todos los nutrientes o lo destruyen por acción física. Los hongos pueden evitar la defensa inmune de un insecto por desarrollo de protoplastos que no son reconocidos por la población de hemocitos del insecto, también formando cuerpos hifales multiplicándose y dispersándose rápidamente y produciendo micotoxinas. El crecimiento del micelio en el cuerpo del insecto induce síntomas fisiológicos anormales tales como convulsiones, falta de coordinación y comportamientos alterados. Una vez que el hongo causa la muerte del insecto, éste emerge del cuerpo, si las condiciones son las óptimas. La esporulación ocurre sobre el cadáver dependiendo de las condiciones, ya que si éstas no son favorables, las esporas permanecen dentro del insecto por algunos meses esperando que las circunstancias cambien. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede ocurrir también en insectos vivos. La dispersión de las esporas depende de la

forma del esporangio, y pueden pasarse de insecto a insecto o por adhesión de esporas que se encuentren en el ambiente (Monzon, 2001; Alean, 2003).

4.4.5 Replicación en el hemocele.

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por física destrucción (Bustillo 2001).

Los hongos pueden evitar la defensa inmune de un insecto por (1) desarrollo de protoplastos que no son reconocidos por la población de hemocitos del insecto (Dunphy and Nolan 1982b; Latgé et al. 1986 citado por Tanada and Kaya 1993), (2) formando cuerpos hifales multiplicándose y dispersándose rápidamente (Samson *et al.* 1988) y (3) produciendo micotoxinas (Tanada and Kaya 1993). Las toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Ferrón 1981).

Posterior al crecimiento del hongo en el hemocele, la micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. En la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales y cambio de color del cadáver (Ferrón 1978).

4.4.6 Dispersión de esporas.

Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta, los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y

eventualmente producirá esporas cuando lleguen las condiciones favorables. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede también ocurrir en insectos vivos (Tanada and Kaya 1993).

4.4.7 *Beauveria* sp.

El género *Beauveria*, está compuesto por varias especies, entre las cuales se reportan *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. amorpha* y *B. velata*. La principal especie y la más estudiada es *B. bassiana*, la cual tiene una amplia distribución geográfica (se ha aislado del suelo y de insectos) y resulta patogénico a diversos ordenes y a más de 200 especies de insectos. Pertenece a la clase *Deuteromycete*, orden Moniliales y a la familia Moniliaceae (Alean, 2003).

Entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café, “la palomilla del repollo”, “picudo del plátano” (*Cosmopolites sordidus*), así como el picudo de la chiltoma (*Anthonomus eugenii*) (Mora, 2004).

B. bassiana se ha usado en forma comercial en diferentes lugares del mundo, por ejemplo en Rusia se ha utilizado por más de 15 años dentro de programas de control biológico de *Leptinotarsa decemlineata*. En Europa se utiliza para el control de *Lasppeyresia pomonella*, en Brasil se estudia para el control de *Ceratomyxa* spp, *Diabrotica speciosa* y *Chalchodermus aeneus* (González et al, 1996).

Los insectos que mueren debido al efecto de este hongo, presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo.

4.4.7.1 Características de la especie *Beauveria bassiana*.

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco (Figura 7), conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies

hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo 1996). *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 µm) y las estructuras conidióforas forman densos grupos (Samson *et al.* 1988).



Figura 7. Desarrollo en placa de *Beauveria bassiana*. (Samson *et al.* 1988)

4.4.7.2 Clasificación taxonómica *Beauveria bassiana*.

Reino : Fungi
División : Ascomycota
Clase : Sordariomycetes
Orden : Hypocreales
Familia : Clavicipitaceae
Género: Beauveria

4.4.8 *Trichoderma sp.*

El control biológico involucra el uso de organismos beneficiosos, sus productos, como metabolitos secundarios, reduce los efectos patogénicos de fitopatógenos en plantas y promueve una respuesta favorable por parte de esta. *Trichoderma sp.*, ha sido usado ampliamente como un agente antagónico controlador, contra varias fitoenfermedades.

4.4.8.1 Características de *Trichoderma*.

Trichoderma es un género de hongo con característica asexual, se encuentra en todo tipo de suelos y zonas climáticas. *Trichoderma* es un invasor oportuno secundario, este hongo se caracteriza por presentar esporas resistentes, generadoras de enzimas hidrolíticas (celulasas, quitinasas, glucanasas, etc) y también es productor metabolitos con capacidad antibiótica, cualidad que hace a este hongo sea ideal para el control de fitoenfermedades (Harman et al., 2004). Otro mecanismo por el cual este hongo tiene capacidad controladora es por su potencial de confrontación directa con patógenos y lograr en estos el micoparasitismo (Howell, 2003) y antibiosis (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

4.4.8.2 Micoparasitismo y enzimas líticas.

El micoparasitismo es un proceso complejo, que consta de varios eventos, organizados de la siguiente manera: reconocimiento del patógeno, ataque, penetración y subsecuente muerte del patógeno.

Durante este proceso *Trichoderma* secreta enzimas hidrolíticas, que hidrolizan la pared celular del hongo patógeno, desnaturalizando de esta manera su estructura celular (pared del hongo) (Kubicek et al., 2001; Corteje et al., 2006). Se cree que *Trichoderma* secreta las enzimas hidrolíticas cuando este detecta la presencia de otro hongo en su medio y se produce el fenómeno de respuesta enzimática (Figura 8) (Corteje & Lorito, 2007).

A

B

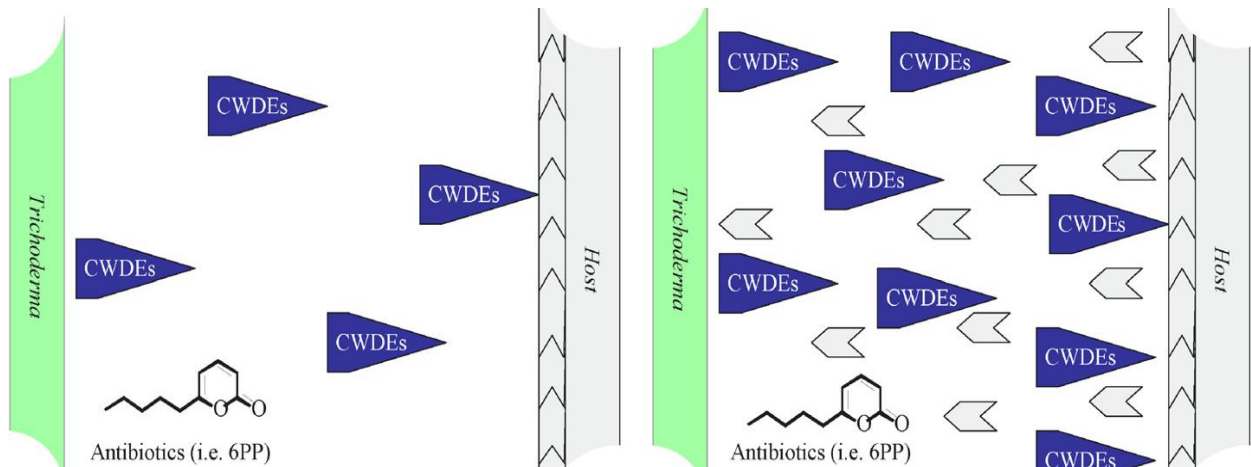


Figura 8. Eventos de interacción de *Trichoderma* patógeno A: Se inicia la producción de enzimas por parte de *Trichoderma* conjuntamente con metabolitos volátiles. B: productos de enzimáticos degradan la pared celular y se activa el proceso de micoparasitismo (2007).

4.4.8.3 Antibiosis y metabolitos secundarios.

Trichoderma produce una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). El término “metabolito secundario” incluye un heterogéneo grupo de compuestos químicamente diferente. Se incluyen en este grupo los antibióticos que son los productos naturales capaces inhibir el crecimiento microbiano. La producción antibiótica es a menudo correlacionada con el biocontrol.

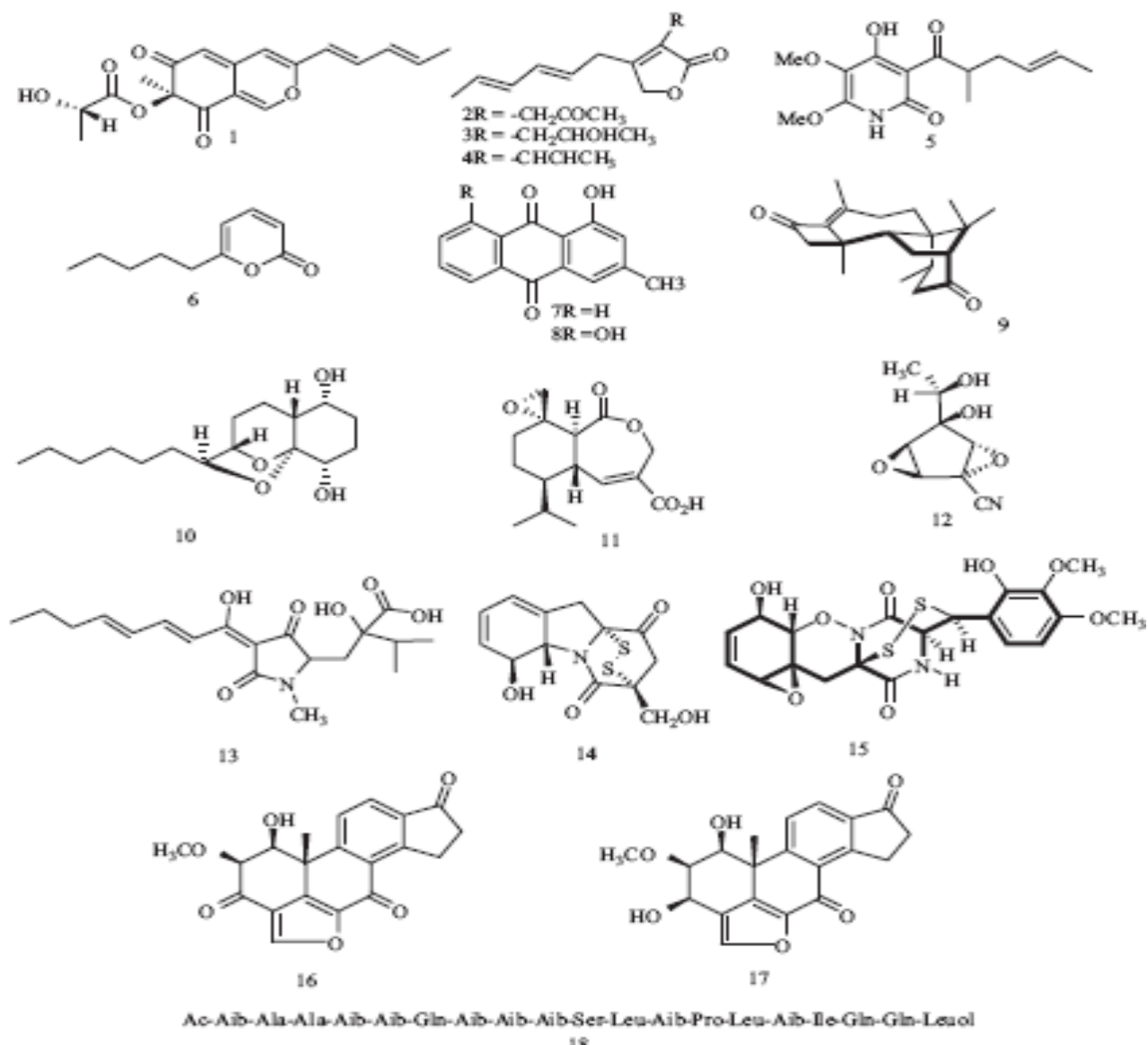


Figura 9. Estructuras químicas de metabolitos secundarios aisladas a partir de *Trichoderma spp* 1: T22azafilona; 2: T39butenolida; 3: harzianolida; 4: dehidroharzianolida; 5: harzianopiridina; 6: 6-pentil- α -pirano; 7: 1-hidroxi-3-metil-antraquinona; 8: 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona; 9: harziandiona; 10: koninginina A; 11: ácido heptelidico; 12: trichoviridina; 13: ácido harcianico; 14: gliotoxina; 15: gliovirina; 16: viridina; 17: viridiola; 18: trichorzianina, (1991).

Ghisalberti et al., (1990) demostró la eficacia del biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Gaeumannomyces graminis*, este efecto se relacionó con la producción de piranos. Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), clasificaron a los metabolitos secundarios en tres categorías: (1) metabolitos volátiles como el 6 – fenilpirano; (2) los compuestos solubles en agua, como el ácido del heptelidico o ácido del koningico; (3) El peptaibol el cual es un oligopéptido lineal de 12–22 aminoácidos (Figura 9).

4.4.8.4 Clasificación taxonómica de *Trichoderma inhamatum*.

Reino :	Fungí
Filo :	Asomycota
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	Hypocrea
Especie:	<i>Hypocrea inhamatum</i>
Nombre:	<i>Trichoderma inhamatum</i>

4.4.9 La quitina

La quitina es el compuesto orgánico que más abunda en el planeta después de la celulosa, y cumple misiones semejantes de protección y resistencia en animales inferiores y hongos. (Herrera, 1993).

Es un polisacárido versátil formado por el azúcar N-acetilglucosamina, unida mediante enlaces B-1,4 tal como se aprecia en la (Figura 10), que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, aunque el lugar donde posiblemente más abunda es el océano.

Las cadenas de quitina de más de seis o siete monómeros son insolubles; las cadenas pueden comprimir muchos miles de monómeros. Las formas rígidas y extendidas de las moléculas son una consecuencia de los enlaces β -1,4 que generan una disposición en zig-zag entre los puentes de oxígeno vecinos. Las moléculas planas, similares a un listón, empaçadas en un orden paralelo, se mantienen juntas mediante puentes de hidrogeno. Los arreglos son altamente cristalinos cuando las moléculas están empaçadas apretadamente, y son más amorfas cuando el empaquetado es menos fuerte (Warren, 1996)

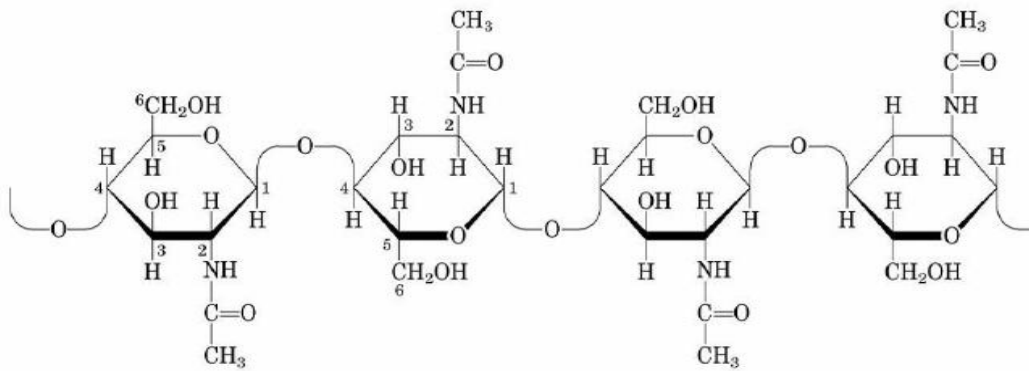


Figura 10. Estructura molecular de la quitina fuente (Sabry, 1992).

La quitina tiene tres formas naturales del polisacárido: alfa, beta, gamma; las cuales difieren entre sí por su estructura cristalina. En la forma alfa, la más abundante, las cadenas son antiparalelas, es decir, cada cadena dispuesta en un sentido contrario que se complementa una con otra de la misma forma que la hélice del ADN. La beta quitina tiene las cadenas paralelas, la gamma quitina, la más rara de las tres formas, presenta por cada cadena dispuesta en un sentido, dos que se orientan en sentido opuesto.

No se conoce las razones por las que la quitina se puede cristalizar, en condiciones naturales, en tres formas distintas, pero el fenómeno evidencia varias consecuencias.

En primer lugar las tres tiene propiedades distintas que les permiten acometer funciones diferentes: así la forma alfa es la más rígida y cumple funciones esqueléticas, en tanto las otras dos, capaces de hidratarse, desarrollaron propiedades mecánicas semejantes a las del cartílago. Por otro lado, el hecho de que las cadenas de forma alfa sean antiparalelas indica que los procesos de síntesis y ensamblaje de cadenas para crear las microfibrillas no pueden ser simultáneos en el tiempo, sino separados (Herrera, 1993).

4.4.10 Enzimas quitinolíticas

El interés actual que se ha generado entre la comunidad científica alrededor de las enzimas quitinolíticas, radica en su gran variedad, presencia entre una amplia gama de grupos bacterianos y un gran potencial biotecnológico aplicable a diferentes campos de la investigación, medicina e industrias de varios campos.

Las quitinasas hidrolizan quitina y quitosán. Varían muy ampliamente de tamaño, cubriendo un rango de 350 hasta más de 800 aminoácidos. Muchas de ellas son proteínas modulares, con dominios catalíticos que se encuentran en el rango cerca de 250 a más de 400 aminoácidos. Los dominios auxiliares, incluyen dominios de unión de quitina.

Las quitinasas son enzimas capaces de realizar la hidrólisis de los enlaces β -1.4 de la N-acetilglucosamina en quitina, quitodextrinas.

El proceso de degradación de la quitina y el quitosano se encuentra mediado por un conjunto de enzimas que actúan sobre el sustrato específico de distintas maneras. La actividad exoquitinasa se define como la acción progresiva que inicia en los terminales no reductores de la molécula de quitina con la liberación sucesiva de unidades de acetilglucosamina. La actividad endoquitinasa se define como el clivaje aleatorio en los puntos internos de la cadena de quitina.

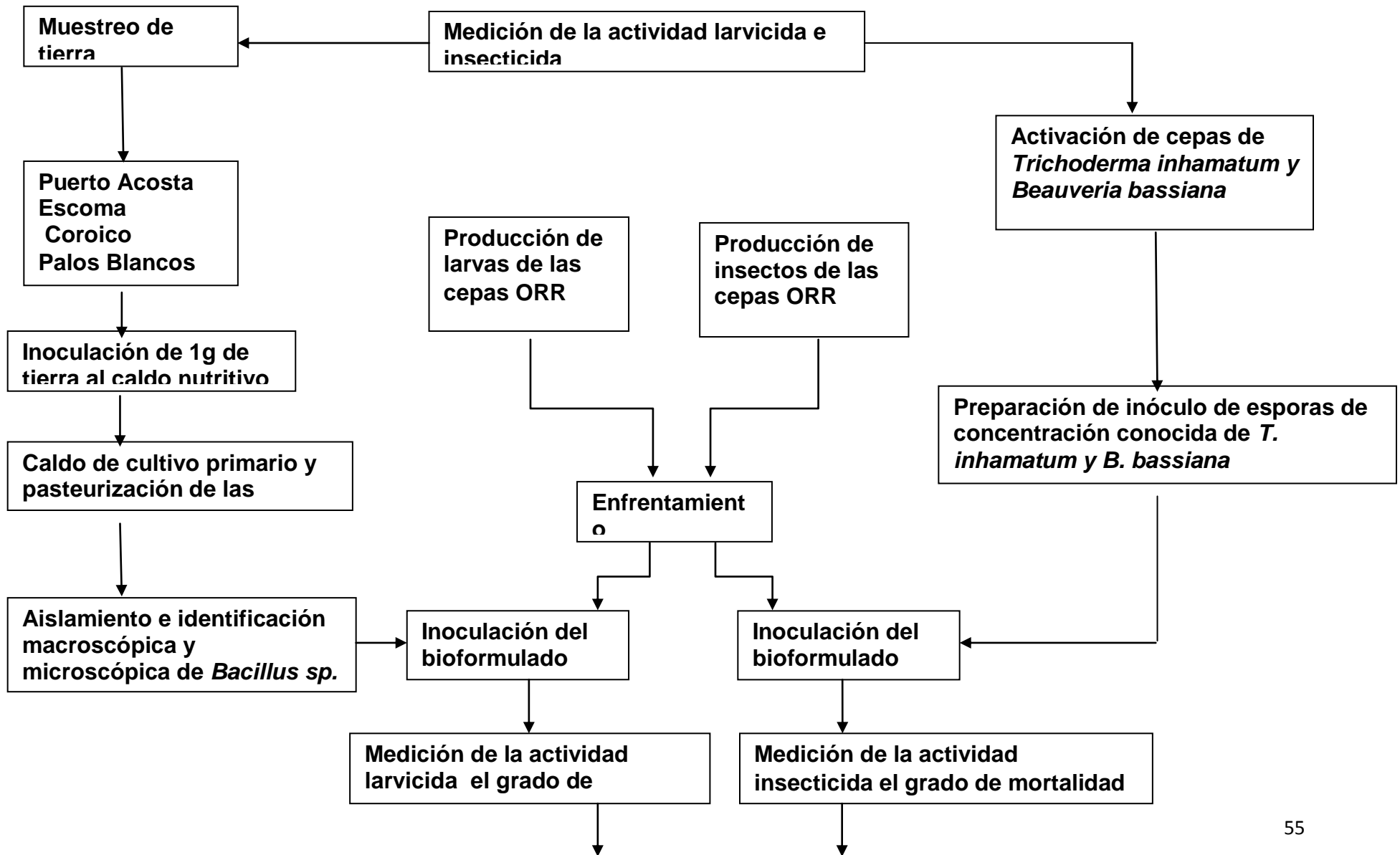
Los microorganismos quitinolíticos, son aquellos que poseen la capacidad de degradar la quitina por si solos mediante la hidrólisis de los enlaces glicosídicos.

Como se mencionó anteriormente, la quitina en la naturaleza se encuentra en diferentes formas, como son; α -quitina, β -quitina, G-quitina. Por esta razón, existe una gran variedad de quitinasas, cuya variedad radica en el tipo de molécula que se va a degradar, la especie del microorganismo o simplemente la función que cumple dentro de éste complejo enzimático. Se conoce que una forma de quitinasa no es capaz de hidrolizar con igual eficiencia las formas α y β de la quitina.

Estudios realizados previamente, por (Svitil *et al.* 1997), demostraron que una quitinasa aislada a partir de una cepa de *Bacillus sp.* PS-71, degradó más eficientemente la forma β de la quitina que la α , tal vez porque la hidrólisis se dificulta al estar fuertemente empacadas en cadenas antiparalelas de la alfa quitina; esto puede explicar también porque la mayoría de los organismos poseen la forma alfa en lugar de la beta en sus exoesqueletos y sus paredes celulares (Svitil *et al.* 1997).

V. DISEÑO METODOLÓGICO.

5.1 Diseño experimental.



**Medición de la actividad enzimática quitinolítica de
Bacillus sp., *T. inhamatum* y *B. bassiana***

5.2 Procedencia de la muestra *Bacillus sp.*

Se aislaron a partir de muestras de tierras recolectadas en diferentes regiones del departamento de La Paz, como ser: Puerto Acosta y Escoma de la provincia Camacho, Coroico provincia Nor Yungas, Palos Blancos provincia Iturrealde. Estas fueron transportadas en conservadores, que fueron descontaminadas con hipoclorito de sodio al 1,5%.

El material empleado, así como la metodología fue realizada de acuerdo a técnicas de muestreo.

5.3 Aislamiento e identificación de *Bacillus sp.*

Las muestras de tierra colectadas, fueron tratadas en un medio estéril, se inóculo en caldo nutritivo (Medio basal). Luego de 24 hrs. mediante pasteurización, se procedió a eliminar la flora microbiana vegetativa, sometiendo las mismas a 55° C por 15 minutos. Posteriormente se realizó una resiembra en agar nutritivo, para luego realizar la identificación de los microorganismos que lograron desarrollar.

Para el desarrollo de la identificación, se realizó la descripción macroscópica del cultivo y la microscópica por tinción gram y de esporas.

5.3.1 Observación macroscópica.

Para la caracterización de estructuras macroscópicas se empleó una lupa, donde se apreció las características de las colonias desarrolladas como ser:

- Forma: puntiforme, circular, filamentosa, rizoide, fusiforme.
- Elevación: plana, elevada, convexa, umbilicada, filiforme.
- Borde: entero, ondulado, lobulado, crenado, filamentoso y enrollado.

5.3.2 Observación microscópica.

Se empleó la tinción diferencial de Gram, tomando la colonia más representativa que concuerde con la descripción macroscópica que se detalló anteriormente.

Se realizó la fijación de la colonia en un portaobjetos utilizando para ello una gota de solución fisiológica (NaCl 0.9 %), aplicando sobre el portaobjetos, el colorante inicial que se empleo fue el cristal violeta por un minuto, luego se procedió a lavar el portaobjetos, posteriormente se aplicó el mordiente lugol por 30 segundos, y se procedió a lavar con agua para aplicar el decolorante etanol al 95 % por 30 segundos, nuevamente se procedió a lavar el portaobjetos para aplicar el colorante de contraste la fucsina fenicada por un minuto y finalmente se realizó el lavado para posteriormente dejar que seque a temperatura ambiente, en todos los pasos se aplicó los colorantes hasta cubrir toda la superficie del portaobjetos. Posteriormente se realizó la visualización microscópica, empleando el objetivo de inmersión 100 X, previa aplicación de una gota de aceite de inmersión.

5.3.3 Pruebas bioquímicas.

En la prueba de **Voges Proskauer** permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el α -naftol. Se realizo la siembra en un tubo con medio de Clark y Lubs. y tras la incubación 24-48 hrs. a 28°C añadimos dos reactivos: α -naftol en solución alcohólica al 6% y una solución de KOH al 40%. Este último reactivo oxida a la acetoina formado diacetilo que se une a un residuo de guanidina del medio en que se hace la prueba, en presencia del α - naftol.

La prueba es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

La prueba de **fermentación de glucosa**, la capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico (en este caso glucosa) incorporado en un medio de crecimiento básico. y **producción de gas (CO₂)** se realiza en medio TSI antes de la inoculación (color del medio). Por duplicado tomar suavemente una porción del centro de la colonia con asa bacteriológica recta y estéril e inocular por picadura y estría en un tubo con agar triple azúcar hierro (TSI) inclinado. Incubar el medio TSI a 35+/-2°C durante 24 h.

La última de las pruebas bioquímicas consistió en investigar la producción de α -amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón. Al colocar el lugol sobre toda la superficie de la placa, se observa una coloración azul si existe la presencia de almidón.

5.4 Hongos biocontroladores.

5.4.1 Procedencia de los hongos biocontroladores.

Las cepas de hongos utilizadas en el presente trabajo fueron: *Trichoderma inhamatum* (BOL – 12 QD) y *Bauveriia bassiana* (BOL – 2 QC), procedentes del cepario del IIFB.

5.4.2 Activación de las cepas de estudio.

Las cepas de *T. inhamatum* y *B. bassiana*, se encontraban en estado activo, por lo cual se procedió a replicar las mismas en medio de cultivo PDA (250 g/L papa, 10 g/L glucosa, 15 g/L agar -agar).

5.4.3 Identificación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma imhamatum*.

5.4.3.1 Observación macroscópica.

Se determinaron, las características morfológicas y de pigmentación en las cajas petri, donde se tomó en cuenta lo siguiente:

- Anverso de la caja aspecto del frente hifas; velloso seco algodonoso, etc.
- Formación de macro estructuras sexuales color de la especie fúngica.
- Reverso de la caja aspecto del frente hifal ruboso, liso pigmento: presencia/ausencia de esclerocios. (Albert, 2009).

5.4.3.2 Observación microscópica.

Se utilizó la técnica de cinta adhesiva en porta objetos, para luego observar en un microscopio e identificar las características de hongos (conidios hifas y otras propias de la especie).

Se realizó, tomando una muestra de la superficie de la caja de Petri donde se replicó los hongos controladores, se empleó un fragmento de cinta adhesiva transparente, que posteriormente se colocó sobre un portaobjeto, el cual contaba con una gota de azul de metileno y se observó al microscopio. No obstante en el proceso de identificación se tomó en cuenta la observación de las características morfológicas del hongo.

5.5. Producción de las larvas de *Drosophila melanogaster* (cepa ORR).

5.5.1 Procedencia de *Drosophila melanogaster*.

Las cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en el presente trabajo fueron: ORR del cepario del IIFB área laboratorio de genotoxicidad.

.

5.5.2 Activación de las cepas de estudio.

Las cepas ORR estaban desarrolladas en su estadio adulto, por lo cual se procedió a replicar las mismas en medio de cultivo de mantenimiento (12,5g de levadura, 10g de gelatina, 20,8g de azúcar, 32.75g de harina amarilla, 0,002g de nipazol, 1,15 mL de sol. Acida en 250 mL de agua). No obstante para la producción de larvas se utilizó el medio de levadura y sacarosa (100g de levadura, con 25g de sacarosa en 250mL).

5.6 Evaluación de la Actividad biocontroladora.

5.6.1 *Bacillus*.

5.6.1.1 Evaluación de la actividad larvicida *Bacillus* sp.

Una vez aislados los microorganismos, se procedió a la preparación de un inóculo de concentración conocida, donde se verificó que los *Bacillus sp* estaban en estado de esporulación.

Para la determinación del número de esporas por mL del bioformulado de *Bacillus sp.*, se preparó la concentración 3×10^6 esporas por mL, empleando la escala de Mac - Farlan realizando una dilución con agua estéril, el mismo procedimiento se realizó para todas las cepas.

5.6.1.2 Prueba de interacción *Bacillus sp.* – *Drosophila melanogaster*.

Se sembró en placa Petri sobre medio de cultivo de mantenimiento, larvas producidas de *Drosophila melanogaster*, en estadio terciario, sobre un soporte sólido de papel filtro, se procedió a la inoculación del bioformulado del *Bacillus sp.*, considerándose tres repeticiones por prueba, en la cual se midió la actividad larvicida. (Mortalidad de larvas).

5.6.2 Hongos entomopatógenos.

5.6.2.1 Prueba de interacción *Trichoderma imhamatum* y *Beauveria bassiana* – *Drosophila melanogaster*. (Evaluación de la actividad insecticida).

Para probar la actividad biocontroladora se utilizó un vaso de cristal que se colocó boca abajo en contacto con la placa Petri, que contenía el medio de cultivo de mantenimiento donde se colocaron *Drosophila melanogaster* de estadio adulto en un soporte sólido de papel filtro, luego se procedió a la inoculación de esporas, considerándose tres repeticiones por prueba, en la cual se midió la actividad insecticida (Mortalidad de *Drosophila melanogaster*).

5.6.3 Actividad enzimática.

5.6.3.1 Preparación de fermentos de *Bacillus sp.*, *T. inhamatum* y *B. bassiana*.

Se empleó el medio cultivo Caldo Patata Dextrosa (PDC: 250 g/L papa; 5 g/L glucosa), del que se alicuotó 30 mL de medio PDC a botellas de 100 mL, que posteriormente fueron autoclavados en un autoclave (AH, American, Model N° 258 MALTOWOE; WI:54220) a 120 °C y 1,5 atm por 20 minutos, luego se inóculo 1 mL de suspensión de esporas *Bacillus sp.*, *T. inhamatum* y *Beauveria bassiana*, a una concentración de 10⁶ esp./mL (calculado en cámara de Neubauer). Se consideraron 15 repeticiones por prueba, la actividad se evaluó cada 3 días por un lapso de 15 días.

5.6.3.2 Obtención de los sobrenadantes.

Los sobrenadantes fueron centrifugados a 12000 rpm durante 15 min., a 5 °C de temperatura, en una centrifugadora refrigerada, posteriormente se filtró el sobrenadante en Holders con papel de nitrocelulosa de 0.2 µm.

5.6.3.3 Actividad Quitinolítica.

La actividad quitinolítica de los fermentos, se evaluó de acuerdo a la tabla 1. Se definió como unidad enzimática a: “la cantidad de enzima que libera un 1 µmol de p - nitrofenol por mL de enzima por minuto, bajo las condiciones específicas” (Transmo y Karman, 1993).

Tabla1. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática quitinolica, (IIFB – 2008).

	Blanco	Control	Test
Sustrato *	200 µL	200 µL	200 µL
Enzima **	-	200 µL	-
Filtrado ***	-	-	200 µL
Buffer ****			
***	200 µL	200 µL	200 µL
H₂O (d)	200 µL	-	-

Incubar a 37 °C, por 1 hora a 180 rpm,
Enfriar y leer la absorbancia a λ 415 nm.

- * 1 mg/mL de 4 – p-nitrofenol,
- ** 1mg/mL de enzima de *Trichoderma atroviridae*.
- *** Procedente de cultivos en batch de *T. inhamatum*, *B. bassiana* y *Bacillus sp.*
- **** Buffer Citrato – fosfato a pH = 5.5.

5.7 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizará por la prueba de ANOVA, empleando para este objetivo el software STATISTIC 8v. Los niveles de probabilidad menores de 0.05 serán considerados como estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1 Aislamiento de *Bacillus sp.*

El aislamiento y selección de cepas de especies de *Bacillus sp.* Con actividad entomopatógena incluyo un pre tratamiento de pasteurización de las muestras de tierra, destinado a la eliminación de la flora vegetativa presente en la misma sin afectar la viabilidad de la mayoría de las esporas, siendo esta la primera etapa selectiva.

En instancia primera, para la determinación del microorganismo *Bacillus sp.* entomopatógeno productor de proteínas esporulares, nos basamos en parámetros de identificación macroscópica, microscópica y perfil bioquímico para todas las muestras obtenidas de las diferentes regiones del departamento de La Paz, las cuales nos sirvieron para evaluar la actividad larvícida, frente a la *Drosophila melanogaster*.

Se determinó el desarrollo morfológico y de pigmentación en el medio de cultivo, la morfología de las colonias de *Bacillus sp.*, desarrollados en placa, se observó que pueden variar en relación con el medio de cultivo utilizado.

Se observo que el crecimiento en agar nutritivo, hubo la formación de colonias circulares con borde irregulares y el perfil plano con color marfil claro de las colonias.

6.1.1 Observación macroscópica.

En todas las cepas provenientes de cuatro regiones de la ciudad de La Paz, se observó que en medio solido las colonias desarrolladas tenían particularidades propias de *Bacillus s.p.*, como se aprecia en la (Tabla 2).

Característica similares fueron observadas según Escobar, (1992) y Lara (2008)

TABLA 2: Características de desarrollo en placa de *Bacillus s.p.* en agar nutritivo.

Lugar	Puerto Acosta				Escoma		Coroico		Palos Blancos	
Cepa	P4	P5	P6	P7	A2	A5	Y11	Y12	C4	C11
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Color	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro	Marfil Claro
Textura	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso	Ceroso
Borde	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular
Perfil	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano

FUENTE: Propia. LUGAR: IIFB. La Paz–Bolivia 2010

6.1.2 Observación microscópica.

Luego de apreciar las características en placa se procedió apreciar su aptitud tintorial mediante la tinción Gram (Tabla 3), donde se encontró que eran Gram positivos con presencia de esporas subterminales lo que corroboraba la identificación macroscópica. Como afirma Lara, (2008).

TABLA 3: Resultados de la tinción gram y presencia de esporas.

Lugar	Puerto Acosta				Escoma		Coroico		Palos Blancos	
Cepa	P4	P5	P6	P7	A2	A5	Y11	Y12	C4	C11

Tinción Gram	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)	Bacilo G (+)
Esporas	(+)	(+)	(+)	(+) subterminal	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

FUENTE: Propia. LUGAR: IIFB. La Paz–Bolivia 2010

Si es aerobio, esporulado y gram positivo, es del genero *Bacillus sp.*, ahora, para afirmar mas e intentar dar con la especie, realizamos cuatro pruebas bioquímicas, la primera de ellas es la de Voges- **Proskauer** en la que se encontró la presencia de acetoina o acetyl-metil carbonil.

En la segunda prueba se encontró que el microorganismo contaba con capacidad fermentativa a la glucosa produciendo ácido y gas negativo.

La última de las pruebas bioquímicas consistió en investigar la producción o no de α -amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón aspecto que resulto positivo en los test, por lo que el microorganismo pertenecía al *Bacillus sp.*

6.1.3 Pruebas Bioquímicas.

Los resultados presentados en el perfil bioquímico, ver (Tabla 4), completan la identificación del genero *Bacillus* ya que muestran el comportamiento metabólico de esta bacteria: V-P (+), amilasa+, ácido+, gas-. Sauka. D y Benintende g. (2009).

TABLA 4: Se aprecia el perfil bioquímico de *Bacillus s.p.*

Lugar	Puerto Acosta				Escoma		Coroico		Palos Blancos	
Cepa	P4	P5	P6	P7	A2	A5	Y11	Y12	C4	C11
V-P	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Fermentación de la glucosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Gas CO2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hidrólisis del almidón	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

FUENTE: Propia. LUGAR: IIFB. La Paz–Bolivia 2010

Según la tabla podría ser: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus anthracis*.

6.1.4 Medición de la actividad larvicida.

En la (Figura 11), apreciamos la actividad larvicida de *Bacillus sp.*, luego de haber aplicado un inoculo de concentración conocida de esporas de *Bacillus sp.*, de 3×10^6 esp/mL en larvas de *Drosophila melanogaster* cepa ORR. Donde logramos apreciar el efecto de esta aplicación, midiendo el grado de mortalidad de las larvas, encontramos que las cepas “P”, aisladas del altiplano, cuatro tuvieron una actividad larvicida y de muy buen rendimiento, igualando al grupo control del tabaco como podemos ver observar en la (Figura 11). No obstante se encontró que existe una diferencia estadista en la actividad larvicida de $P < 0.05$, de las cepas que se lograron aislar.

Tabla5. Análisis de varianza del Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *bacillus sp.*, procedentes de Puerto Acosta (IIFB – 2010).

Source	DF	SS	MS	F	P
Moscas muertas	9	52,70	5,86	5,67	0,001
Error	20	20,67	1,03		
Total	29	73,37			

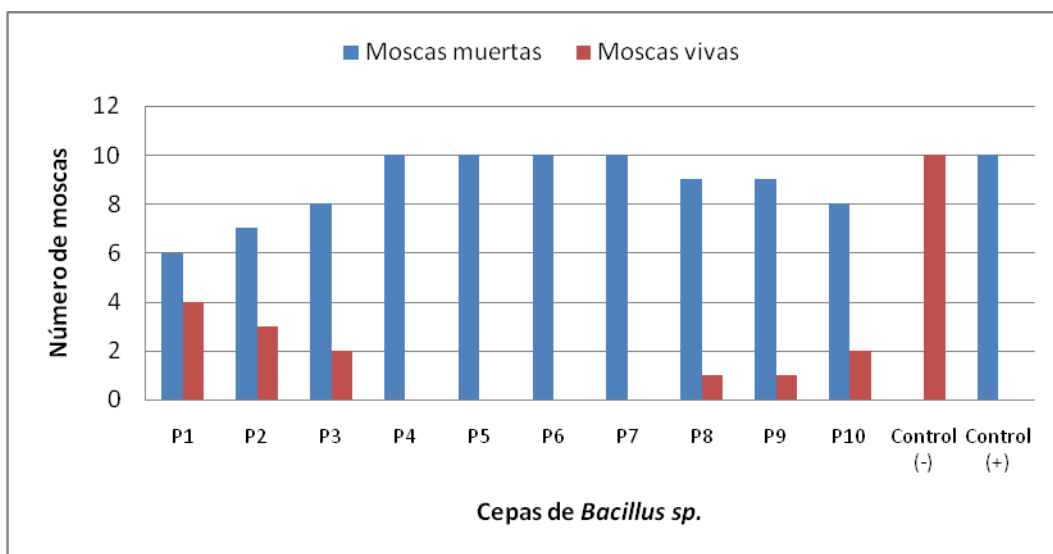


Figura11. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Puerto Acosta (IIFB – 2010).

Al apreciar los resultados obtenidos de las cepas “A”, (Figura 12), se obtuvo un bajo rendimiento de actividad, sobre todo en las cepas A9, A10, A11 y A12, igualando casi en su totalidad la actividad del grupo control negativo. Se llegó a observar una actividad superior en la cepa A2, y en las restantes cepas de estudio el rendimiento se considera aceptable, debido a que su actividad se encuentra entre el 60 % - 70 %. Aspecto que se refleja en el análisis de varianza, en el cual se observa que si existe diferencia en el empleo de cepas para la actividad larvica para un $P < 0.05$.

Tabla 6. Análisis de varianza del Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Escoma (IIFB – 2010).

Source	DF	SS	MS	F	P
Moscas muertas	13	267,452	20,573	27,87	0,000
Error	28	20,667	0,738		
Total	41	288,119			

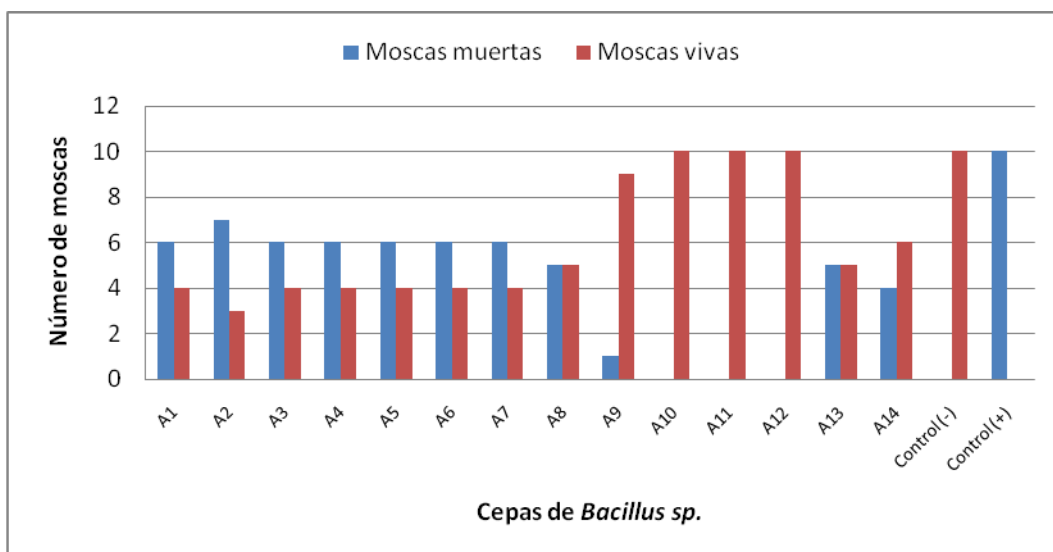


Figura 12. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Escoma (IIFB – 2010).

En el caso de actividad de las cepas “Y” de Coroico, se vió que la actividad larvicida es similar a la de las cepas “P” y un poco mayor a la actividad de las cepas “A”, alcanzando valores iguales al grupo de control positivo en el caso de las cepas Y11 y Y12 (Figura 13).

Tabla 7. Análisis de varianza del Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Coroico (IIFB – 2010).

Source	DF	SS	MS	F	P
Moscas muertas	14	256,58	18,33	9,06	0,000
Error	30	60,67	2,02		
Total	44	317,24			

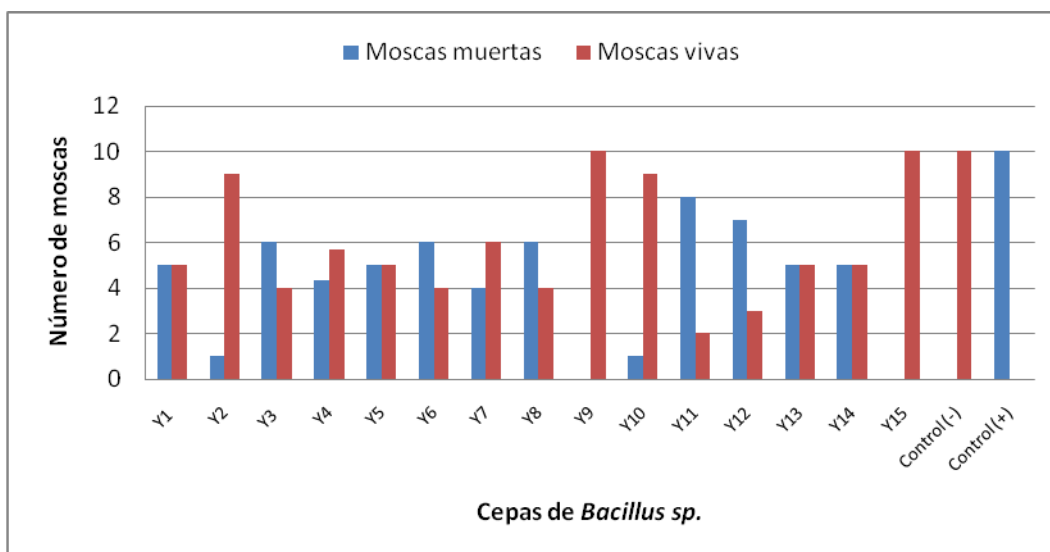


Figura 13. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Coroico (IIFB – 2010).

En el caso de actividad de las cepas "C" de Palos Blancos se vió que la actividad larvicida es inferior a la de las cepas "P" y emparentando la actividad de las cepas "Y", alcanzo valores iguales al grupo control positivo en el caso de las cepas C11, C4, (Figura 14).

Tabla 8. Análisis de varianza del Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Palos Blancos (IIFB – 2010).

Source	DF	SS	MS	F	P
Moscas muertas	14	485,78	34,70	16,26	0,000
Error	30	64,00	2,13		
Total	44	549,78			

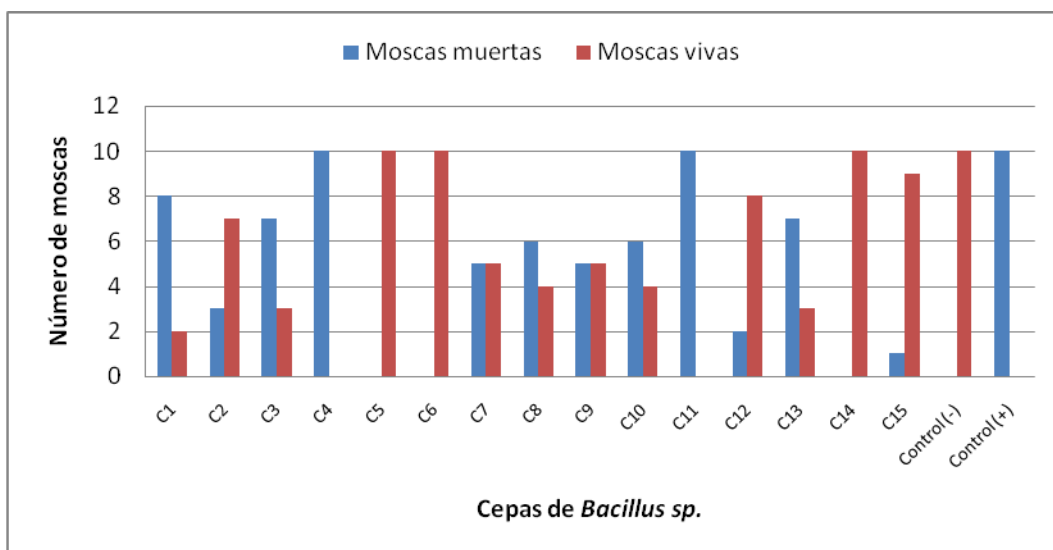


Figura 14. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, procedentes de Palos Blancos (IIFB – 2010).

6.2 Medición de la actividad insecticida.

En la (Figura 15), apreciamos la actividad insecticida de *Bacillus sp* luego de haber aplicado un inóculo de concentración conocida de esporas de *Bacillus sp.*, de 3×10^6 esp/mL y de los hongos, *T. inhamatum*, *B. bassiana* por el recuento de esporas a una concentración de 6×10^6 esporas / mL sobre insectos de *Drosophila melanogaster* cepa ORR. Donde logramos apreciar el efecto de esta aplicación, midiendo el grado de mortalidad de los insectos, encontramos que las cepas “*Bacillus sp*”, tiene poco actividad frente al estado adulto del insecto, mientras que los hongos presenta una buena actividad insecticida la mayor se observa *B. bassiana* igualando al grupo control del tabaco como podemos ver en la Figura 14. Se realizo a los dos días de la aplicación.

Tabla 9. Análisis del Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, y de hongos *T. inhamatum* *B. bassiana* procedentes de (IIFB – 2010).

Muestras	Muertas	Vivas
<i>Bacillus sp.</i>	5	10
<i>T. inhamatum</i>	12	3
<i>B. bassiana</i>	15	0
Control (-)	0	15

Control (+)	13	2
-------------	----	---

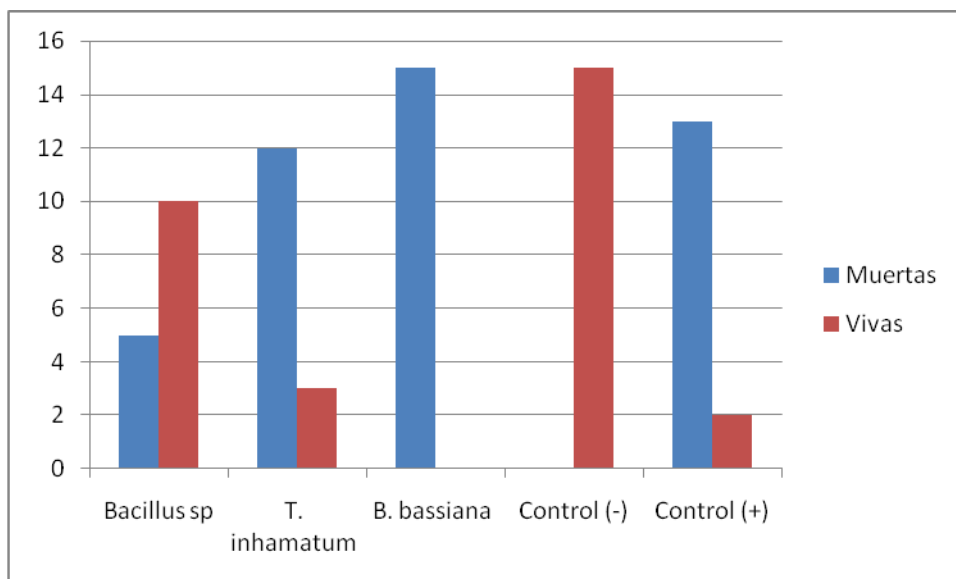


Figura 15. Número de moscas muertas, ocasionado por efecto de los cristales cry δ - endotoxinas, producidas por cepas de *Bacillus sp.*, y de hongos *T. inhamatum* *B. bassiana* procedentes de (IIFB – 2010).

6.3 Actividad enzimática.

En el análisis enzimático quitinolítico realizado a la tres cepas de estudio, se observó que la mejor actividad enzimática se presentó a los 12 días por la cepa *Beauveria bassiana* con 0.049 μmol p-nitrofenol/mL/min, no obstante en todos los casos, la mejor actividad de cada uno de los microorganismos se observó a los 12 días (Figura16).

Esta prueba se realizó, con la finalidad de conocer la capacidad degradativa de la cubierta de los insectos, la misma que se encuentra conformada por la β 1-4 N-acetil glucosamina, que le da característica de dureza al insecto. Se emplearon estos microorganismos debido a que estos cuentan con capacidad lítica de B 1 – 4 N-acetilglucosaminasa. No obstante también se realizó el análisis de la actividad α 1 – 4 N- acetilglucosaminasa, en la que se observó que estos valores son muy inferiores

a los esperados, aspecto que puede ser relacionado con la capacidad de síntesis enzimática de cada microorganismo.

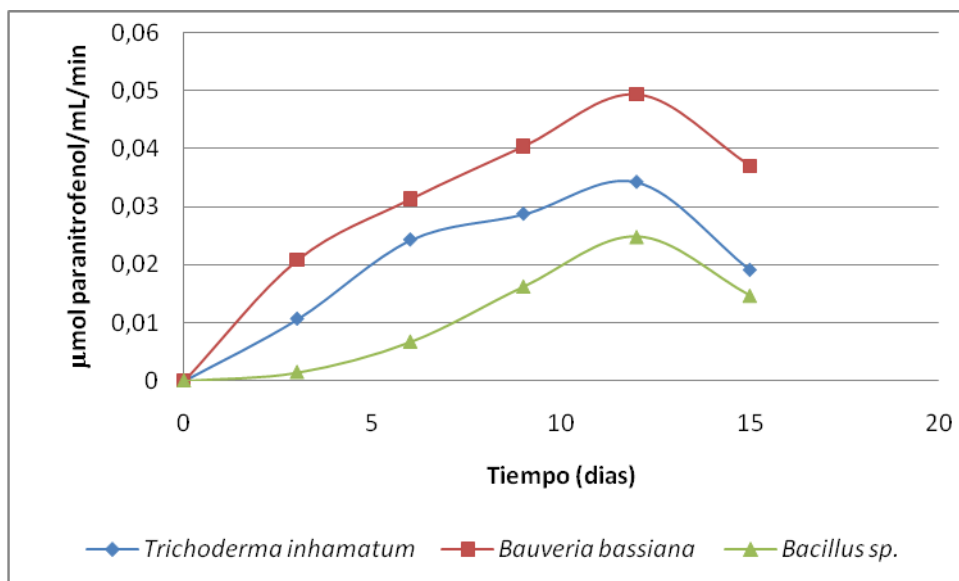


Figura16. Actividad enzimática quitinolítica de *T. inhamatum*, *Beauveria bassiana* y *Bacillus sp.*, medida en los medios de cultivo en Batch, en un lapso de 15 días, (IIFB – 2010).

Realizando el análisis comparativo de los resultados mediante un análisis de variancia, encontramos que existe diferencia estadística de $P < 0.05$ (Tabla 10), en la producción enzimática de quitinasas en el empleo de microorganismos para la producción enzimática; Respecto al tiempo de fermentación, de igual manera que en el anterior caso se establece que este influye sobre la producción de enzimas y este resultado es significativo para un $P < 0.05$ (Tabla 10), (Figura17).

Tabla10. Análisis de variancia de la actividad enzimática quitinolítica de *T. inhamatum*, *Beauveria bassiana* y *Bacillus sp.*, medida en los medios de cultivo en Batch, en un lapso de 15 días, (IIFB – 2010).

Source	DF	SS	MS	F	P
Microorganismo	2	4,81872	2,40936	126,20	0,000
Tiempo	4	3,69371	0,92343	48,37	0,000
Interacción	8	0,27515	0,03439	1,80	0,116
Error	30	0,57276	0,01909		
Total	44	9,36034			

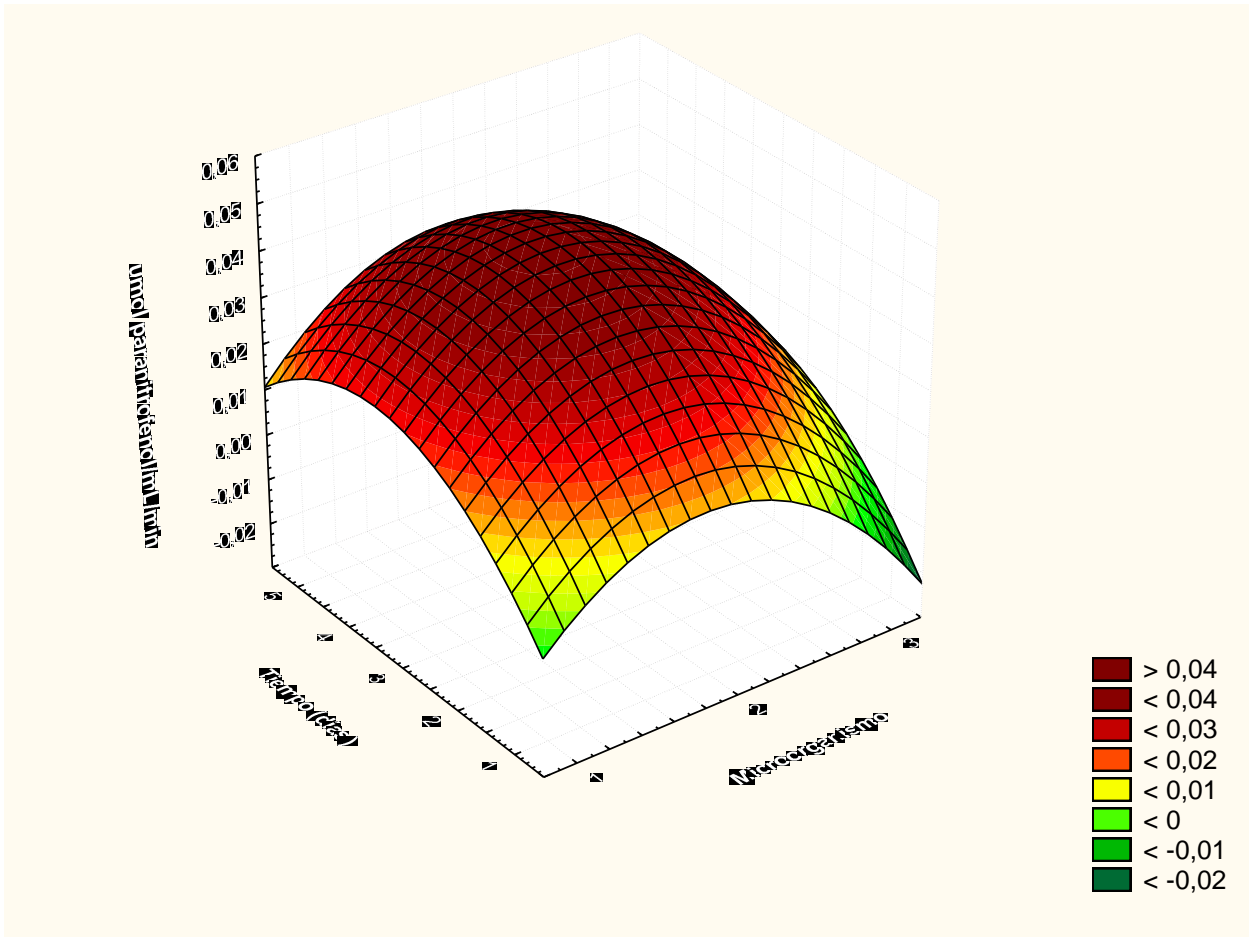


Figura17. Superficie de respuesta del diseño factorial, µmol paranitrofenol/mL/min liberado, por efecto de la actividad quitinolítica de diferentes microorganismos (1. *T. inhamatum*; 2. *B. bassiana*; 3. *Bacillus sp.*). Producido a en diferentes lapsos de tiempo (IIFB – 2008).

VII. CONCLUSIONES.

- Se determinó la actividad larvicida de *Bacillus sp.* frente a *Drosophila melanogaster* existiendo una buena actividad de las cepas P (4, 5, 6,7) las cuales mostraron una buena actividad larvicida en relación con los otras cepas de capacidad biocontroladora exceptuando las cepas de A (9, 10, 11 y 12), de igual manera las cepas C (4 y 11) mostraron muy buena actividad, las cepas Y se encontraron que Y (11 y 12) mostraron la más baja actividad del estudio realizado.
- Se realizó el aislamiento e identificación de *Bacillus sp.* de muestras de tierra de diferentes regiones del departamento de La Paz, confirmando las características macroscópicas y microscópicas propias de este microorganismo la característica microscópica que se observaron que eran gram positivos con presencia de esporas subterminales y el macroscópico color marfil claro, forma circular, textura cerosa borde irregular, perfil plano.
- Se realizó un cepario de 26 microorganismos con características de pertenecer a él genero, de *Bacillus sp.*, de las cuales se seleccionaron solo aquellas que tenían una buena actividad biocontroladora de *Drosophila melanogaster* que eran 12 cepas.
- Se determinó la actividad insecticida de los hongos entomopatógenos y de *Bacillus sp.* , aplicado un inóculo de esporas, existiendo una buena actividad de *Beauveria bassiana* (cepa BOL 2 QC) en relación con los otros biocontroladores y la actividad de *Bacillus sp.* en los insectos es muy baja. La exposición frente al estado adulto de *Drosophila melanogaster*, por los hongos entomopatógenos, en el caso de *B. bassiana* llegando a matar a los 15 insectos y 13 de *T. inhamatum* mientras que de *Bacillus sp* la bacteria seleccionada solo 5.

- Se determinó la actividad quitinolítica presentando a los doce días una actividad enzimática buena de los hongos entomopatógenos y de *Bacillus sp.* pero se observa que la mejor actividad enzimática de *Beauveria bassiana* (cepa BOL 2 QC) en relación con los otros biocontroladores con 0.049 $\mu\text{mol p-nitrofenol/mL/min}$.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Albert, E. J., Sommerfeld, K., Gophna, S., Marshall, J. S. & Gophna, U. The gut microbiota of toll-like receptor 2-deficient mice exhibits lineage-specific modifications. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 65–70 (2009).
- ALEAN, IRINA. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus sociales* bondar (homóptera: aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis Lic. Bogota, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria. p. 22-37
- Altieri, M. 1999. Agroecología, Bases científicas para una agricultura sustentable. Montevideo, Uruguay. Editorial Nordan–Comunidad. 337p.
- Altieri, M. Nicholls, C. 2000. Agroecología, Teoría y práctica para una agricultura sustentable. 1 ed. México D.F., México. 250p.
- ALUJA, M.; CELEDONIO, H.; LIEDO, P.; CABRERA, M.; CASTILLO, F.; GUILLEN, J.; RIOS, E. 1996. Seasonal Population Fluctuations and Ecological Implications for Management of Anastrepha Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in Commercial Mango Orchards in Southern Mexico. *Journal Economic Entomology* **89**(3) p. 654-667.
- ARAUJO, E. 2002. Dípteros frugívoros (Tephritidae e Lonchaeidae) na regio de mossoró/assu, Estado do Rio Grande do Norte. Tese apresentada a Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de Sao Paulo. p 14-19.
- Boscán, N. 1992. Manejo Integrado de las Moscas de las Frutas I. Identificación, Biología y detención del insecto (en línea) FONAIAP Divulgan°41. Consultado 8 de feb. 2008. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve>

- Boscán, N. Valle, A. Godoy, F. 2001. Atramientos amoniacales para la captura de mosca de la fruta del género *Anastrepha* en siembra de níspero en Maracay, Venezuela. *Agronomía Tropical* 52(1): 121-128.
- Brock, Thomas; Michael Madigan ; *Microbiología* 6 ed.; Impreso en Mexico; 1993
- BUSTILLO, A; POSADA, F. 1996. El uso de entomopatógenos en el control de la broca del café en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas*. CATIE. Turrialba, CR. (40) 42 p. 1-13.
- BUTT, T.; JACKSON, C.: MAGAN, N. 2001. *Introduction-Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International. p. 1-8.
- CARROLL, L.; NORRBOM, A.; DALLWITZ, M.; THOMPSON, F. 2004. *Pest Fruit Flies of the World*. Disponible en: http://delta-intkey.com/ffl/www/_wintro.htm. Revisado: 23/07/2006. Última actualización: noviembre 10, 2004.
- CORVALAN L. 2004. Evaluación del índice 0,01 capturas/trampa/día como indicador de baja prevalencia de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en duraznos importados. <http://www.scielo.cl/scielo>. Revisado: 24/07/2006
- DIMBI, S. ; MANIANA, N.; LUX, S.; MUEKE, J.M. 2003. II. Host species, age and sex as factors affecting the susceptibility of the African Tephritid fruit fly species, *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* and *C. fasciventris* to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Anz. Schädlingkunde/J. Pest Science* 76, 113–117, Springer Verlag, Berlin ISSN 1436-5693.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N.; LUX, S.; EKESI, S.; MUEKE, JONES. 2003. I Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera :Tephritidae). *Mycopathologia* (156). p. 375–382. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- DIMBI, SUSAN; MANIANIA, NGUYA. K; LUX, SLAWOMIR MUEKE, JONES. 2004. Effect of constant temperatures on germination, growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49: 83–94, 2004. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDA POR *Bacillus thuringiensis* EN UN MEDIO DE

PRODUCCIÓN SUPLEMENTADO CON "SANGUAZA" <http://www.linros-interinsumos.com/Tempo/revista2/articulo02.htm> 20090507

- FAO. 2005. Manejo integrado de plagas en zonas extensas (en línea) Departamento de Agricultura y Protección al Consumidor. Consultado 8 de feb. 2008. Disponible en <http://www.fao.org/ag/esp/default.htm>
- Gallardo S. s.f. Mosca de la fruta. Revista EXACTA mente. Divulgación Nro 9-Div. I. Argentina.
- GONZALEZ, H.; CARBALLO, M.; BLANCO, H. 1996. Efecto de cepas de *Beauveria bassiana* sobre la mortalidad de *ecdytolopha torticornis* en Macadamia. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Turrialba, CR. (40) p. 17-23.
- HERNÁNDEZ, O. 1992. El género *Anastrepha Schinner* en México. (Diptera: *Tephritidae*). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología. Soc. Mex. Ent. Xalapa, p. 162.
- Hernández, V. 2003. Familia Tephritidae: Clasificación actual, relaciones filogenéticas y distribución de taxa americanos. En: XV Curso Internacional sobre moscas de la fruta. Memorias. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. p.p 11-23
- Herrera –Ruiz J. Sentandreu R. Martinez J. P. 1992 Chitin biosynthesis in fungi, Handbook of Applied Mycology, vol 4.
- INFOAGRO. 2002. Mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* Wied.). http://www.infoagro.com/frutas/mosca_de_la_fruta.htm. Revisado: 19/07/2006.
- Joklink, Wolfgang; Microbiologia (Zincer Microbiology) Trad. Nara Meecroff; 18 ed; editorial panamericana; impresa en argentina 1987.
- LARA, I. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* y su uso como bioinsecticida <http://www.scribd.com/doc/8961317/Cultivo-de-Bacillus-thuringiensis-y-suuso-como-bioinsecticida> 20090215
- MALAVASI, A. 2000. Aspectos cuarentenarios en Moscas de la fruta. Universidad e São Paulo, Brasil. Biofabrica Moscamed Brasil. Dirección de moscas de la fruta. PROSAIA. USAID. p 5-10.
- Marin, M. 2002. Identificación y Caracterización de Moscas de las Frutas en los Departamentos del Valle del Cauca, Tolima y Quindío. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Caldas.
- Marín, s.f. Catalogo: Ingeniería Alimentaria, el comportamiento de los insectos: una nueva herramienta para su control. Bs, As- Argentina. 123p.

- MONZON, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas CATIE. Turrialba, CR. (54) p. 1-12.
- MORA, J. 2004. Guía de ingredientes activos de plaguicidas. Manual No 1. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE Proyecto Fomento de Productos Fitosanitarios No Sintéticos. Turrialba, Costa Rica
- Nicholls, C. 2004. Control biológico de insectos plagas: un enfoque agronómico. 1 ed. Loja, Ecuador, Editorial UTPL. 380p.
- Norrbon, A. L. y K. C, Kim (1988). A List of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (dipteral; Tephritidae). U, S, Dept. Agric. (APHIS-PPQ) 81-52: 1-114
- Robacker, D, C., Martinez, A, J., Garcia, J, A., Diaz, M., y Moreno, C. (1996) Toxity os *Bacillus Tthuringiensis* to mexicana fruit fly (Diptera : Tephiritidae).,Journal of Economic Entomology, 89, 104-110
- Ros, J. Alemen, A. Castillo, E. Crespo, J. Latorre, Y. Moner, P. Sastre C. Wong, E. 1996. Ensayos para el control de la mosca mediterránea de la fruta.
- Salas, J. 1992. Manejo integrado de insectos - plagas en hortalizas (en línea) FONAIAP Divulga N° 40. Consultado 2 de may. 2008. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve>.
- SAUKA. D Y BENINTENDE G. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412008000200013&strip=20090215>
- SEGADE, G. 1993. Moscas de los frutos. Universidad de Buenos Aires. Disponible en: <http://www.estrucplan.com.ar/Articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=216>.Revisado: 25/07/2006.
- SEGARPA. 1997. Apéndice técnico para el reconocimiento de frutos hospederos de moscas de la fruta del género *Anastrepha* y *Rhagoletis pomonella*. Dirección de moscas de la fruta.
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA. 2000. Manual de identificación taxonómica. Especies de *Anastrepha* frecuentes en trampas McPhail.

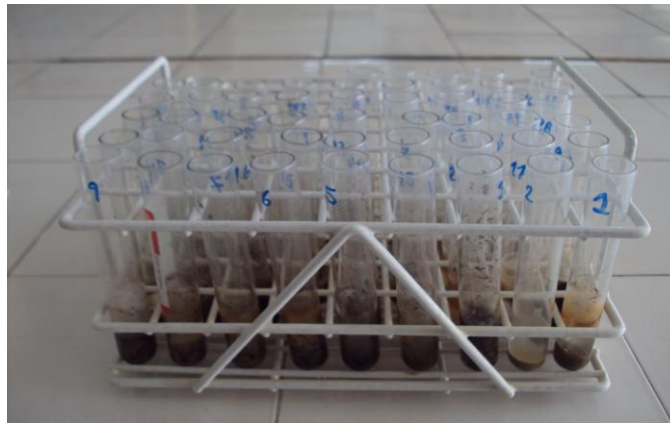
- Stanier, Roger et al; Microbiologia (The microbial word) trad. Dra. Isabel Garcia; 4 ed; Impreso en España 1985.
- Steiner, W. A. (1996) Dispersal and Host-finding ability of entomopathogenic nematodes at low temperatures. *Nematology*, 42, 243-261
- Suárez, L; Molina, A; Murúa, F; Acosta, J; Escobar, J. 2007. Evaluación de colores para la oviposición de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) en Argentina. *Rev. peru. biol.* 14(2): 291-293.
- Sabry, S.A.1992. Microbial degradation of shrimp shell waste. *J.Basic.Microbiol.*32:378-383
- Tanada, P., y Kaya, H. K, (1993), *Insect, Pathology*, San Diego, California: Academic Press.
- Valencia, Hernando, Manual de Microbiología Básica <http://areja.awardspace.com> Sanchez Marina, microbiología, aspectos fundamentales, universidad de colombia 2000
- Wharton, R. & Quicke, D. 1988. A new species of Bracon (Hymenoptera: Braconidae) parasitic on *Eoreuma loftini* (Dyar)(Lepidoptera: Pyralidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 90(3): 288-293.
- Willink, E. & Villagrán, M. 2007. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate*. Viña Del Mar, Chile.
- Zhang X, Griko N, Corona S, Bulla L Jr. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 149: 581-8.

ANEXOS

Anexo N° 1 Recolección de muestras de tierras en tubos falcón.



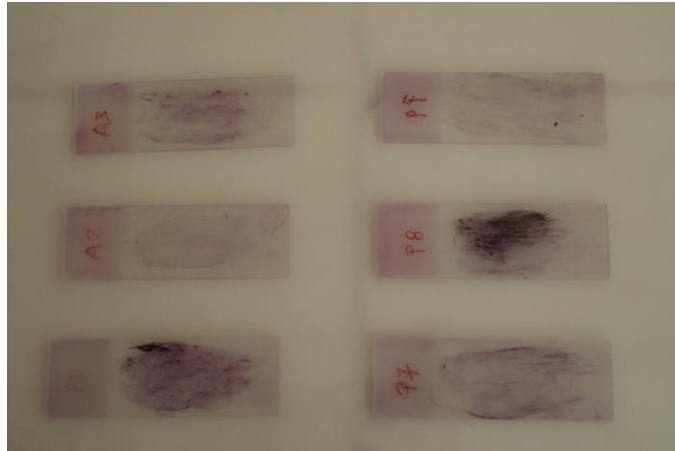
Anexo N° 2 Muestras tratadas por el método de pasteurización.



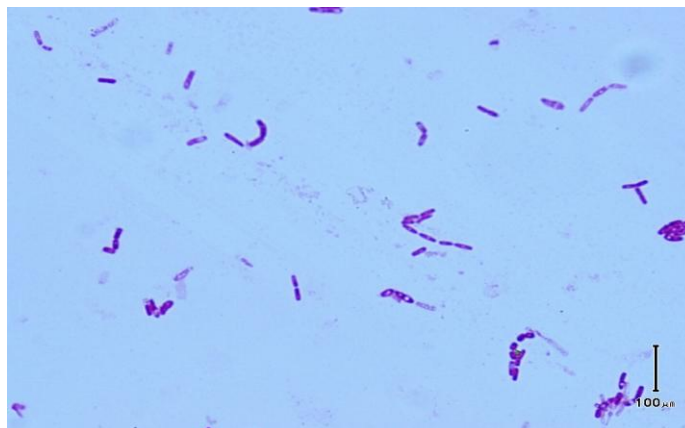
Anexo N° 3 Realización de la tinción Gram de las muestras de tierra provenientes de Coroico.



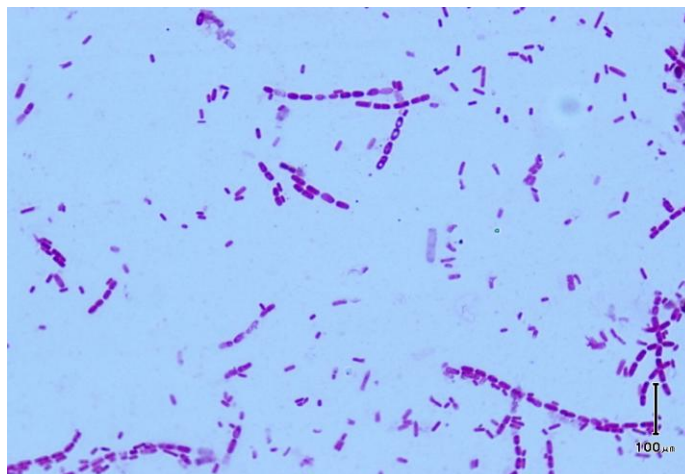
Anexo N° 4 Realización de la tinción Gram de las muestras de tierra provenientes de Puerto Acosta.



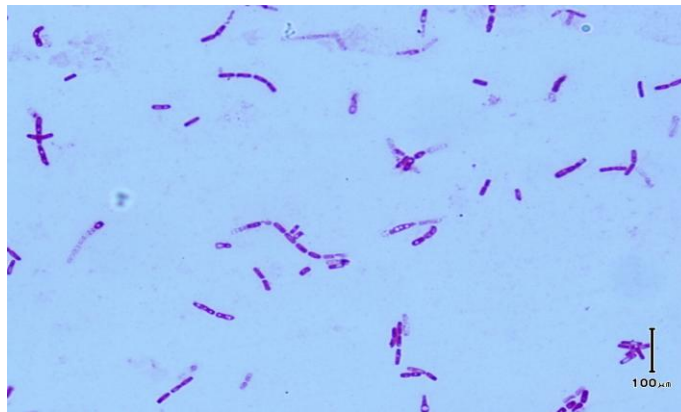
Anexo N° 5 Observación microscópica de la tinción Gram de las muestras de tierra provenientes de Palos Blancos con sus respectivas endoesporas.



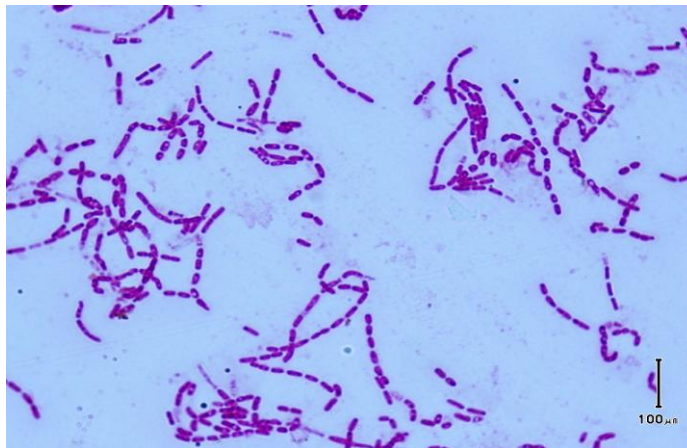
Anexo N° 6 Observación microscópica de la tinción Gram de las muestras de tierra provenientes de Puerto Acosta con sus respectivas endoesporas.



Anexo N° 7 Observación microscópica de la tinción Gram de las muestras de tierra provenientes de Coroico con sus respectivas endoesporas.



Anexo N° 7 Observación microscópica de la tinción Gram de las muestras de tierra provenientes de Escoma con sus respectivas endoesporas.



Anexo N° 8 Observación macroscópica del cultivo de *Beauveria bassiana*.



Anexo N° 9 Observación macroscópica del cultivo de *Trichoderma inhamatum*.



Anexo N° 10 Preparación del cultivo de *Trichoderma inhamatum* para la realización de recuento de esporas.



Anexo N° 11 Preparación del cultivo de *Beauveria bassiana* para la realización de recuento de esporas.



Anexo N° 12 Preparación de cultivos de *Drosophila melanogaster* cepas **ORR**.



Anexo N° 13 Medición de la actividad larvica grupo control negativo de *Drosophila melanogaster* cepas **ORR**. se observa el desarrollo de las 10 larvas.



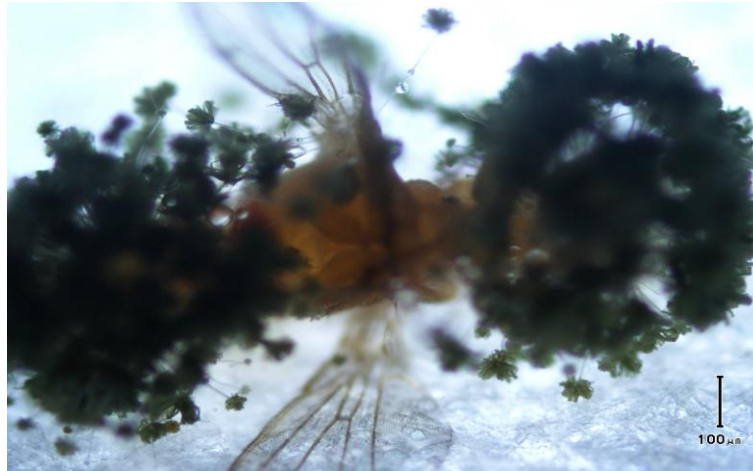
Anexo N° 14 Observación microscópica de *Drosophila melanogaster cepas ORR*. Se observa la colonización por *Trichoderma inhamatum*. A un aumento total de 40X



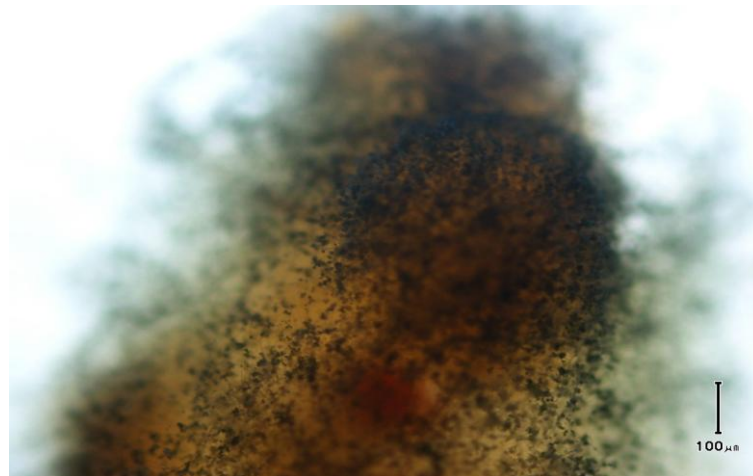
Anexo N° 15 Observación microscópica de *Drosophila melanogaster cepas ORR*. Se observa la colonización por *Beauveria bassiana*. A un aumento total de 40X



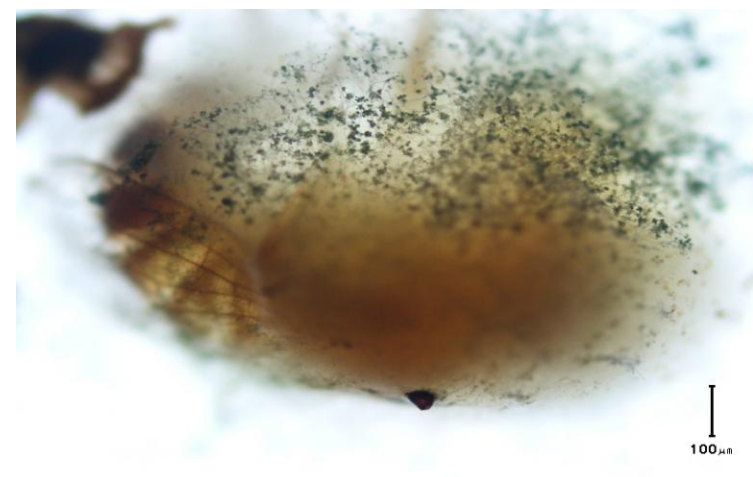
Anexo N° 14 Observación microscópica de *Drosophila melanogaster cepas ORR*. Se observa la colonización por *Trichoderma inhamatum*. A un aumento total de 40X



Anexo N° 15 Observación microscópica de *Drosophila melanogaster cepas ORR*. Se observa la colonización por *Beauveria bassiana*. A un aumento total de 40X



Anexo N° 16 Observación microscópica de *Drosophila melanogaster cepas ORR*. Se observa la colonización por *Beauveria bassiana*. A un aumento total de 40X



Anexo N° 17 Curva de estandarización de P-nitro fenol para la medición de la actividad quitinolítica.

Concentración de P-nitro fenol		
Nº	Abs	c
1	0,041	0,01437815
2	0,06	0,02875629
3	0,081	0,04313444
4	0,103	0,05751258
5	0,124	0,07189073
6	0,141	0,08626887
7	0,17	0,10064702
8	0,193	0,11502516
9	0,212	0,12940331
10	0,239	0,14378145

