

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Ingeniería en Biotecnología



Proagroin

*Agricultura de Clase Mundial
con Justicia Social!!!*

CON JUSTICIA SOCIAL!!!

“Aislamiento e identificación bioquímica y microscópica de bacterias representativas del género *Bacillus* con potencial insecticida contra *Stomoxys calcitrans*”.

Proyecto de graduación para optar por el título de Ingeniería en Biotecnología con el grado académico de Bachiller.

Yarenis Chinchilla Ballesterero

Cartago, Noviembre 2011

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROSCÓPICA DE
BACTERIAS REPRESENTATIVAS DEL GÉNERO BACILLUS CON POTENCIAL
INSECTICIDA CONTRA *Stomoxys calcitrans*.**

Yarenis Chinchilla Ballestero*

RESUMEN

Stomoxys calcitrans es una de las plagas de mayor cuidado en explotaciones ganaderas y agrícolas, es necesario buscar una alternativa biológicamente amigable para su control. Esta investigación tuvo como objetivo probar una metodología para el aislamiento e identificación bioquímica y microscópica de bacterias representativas del género *Bacillus* con potencial insecticida contra *Stomoxys calcitrans*, muestreada en 3 fincas de la zona de San Carlos, Alajuela.

Se aislaron colonias azules con halo de precipitación en agar selectivo PEMBA y microscópicamente se observaron bacilos Gram positivos con endosporas, se logró la identificación con el sistema API 50 CHB de las cepas aisladas. La metodología usada fue efectiva para el aislamiento e identificación de *B. cereus* a partir de larvas de *S. calcitrans*.

Palabras clave: Agar PEMBA, *Bacillus*, endosporas, Gram positivas, API 50 CHB.

ABSTRACT

Stomoxys calcitrans is one of the major pest that affects the livestock care and agriculture, it's necessary to find an alternative biologically friendly for its control. This research aimed to test a methodology for the isolation, biochemical identification and microscopical of representative bacterias of the *Bacillus* gender with insecticide potential against *Stomoxys calcitrans*, sampled on 3 farms in the area of San Carlos, Alajuela.

The blue colonies were isolated with a precipitation halo in a selective agar PEMBA and microscopically some Gram positive bacilli with endospores were observed, the identification of the isolates with the API 50 CHB system was achieved. The methodology used was effective for the isolation and identification of *B. cereus* from larvae of *S. calcitrans*.

Keywords: Agar PEMBA, *Bacillus*, endospores, Gram positive, API 50 CHB.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2011.

DEDICATORIA

A Dios quien hizo todo esto posible.
A mi familia por su apoyo incondicional.

Yarenis

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes instituciones y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Primeramente a Dios, quien me dio la fuerza para seguir adelante cada día, y hacer posible la conclusión exitosa de este proyecto.

A la empresa y al TEC, por el apoyo financiero y de equipo para la realización de este proyecto.

A Jessica Linares quien con su apoyo y anuencia a colaborar siempre, se convirtió en más que una tutora.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su valiosa dirección, especialmente a los profesores William Rivera y Arnoldo Gadea, por sus aportes y sugerencias.

A Alejandro Quirós funcionario de MAG, por su ayuda en la parte inicial de este proyecto.

INDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
DEDICATORIA	3
INDICE GENERAL	5
INDICE DE CUADROS	7
INDICE DE ANEXOS	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1 Antecedentes de <i>Stomoxys calcitrans</i>	12
2.2 Biología del insecto	12
2.3 Efectos negativos de la mosca del establo	13
2.4 Medidas de control de <i>S. calcitrans</i>	14
2.5 Control biológico de <i>S. calcitrans</i>	15
2.6 Género Bacillus	15
2.7 <i>Bacillus cereus</i>	16
2.8 <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.9 <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Obtención e identificación de muestras	21
4.2 Desinfección de larvas	21
4.3 Macerado y siembra en placas	22
4.4 Identificación macroscópica y microscópica de los aislamientos	22
4.5 Tinción de Schaffer-Fulton	22
4.6 Tinción con azul de Coomassie	23
4.7 Identificación bioquímica API 50 CHB	23
5. RESULTADOS	24

5.1 Identificación macroscópica de los microorganismos aislados	24
5.2 Identificación microscópica de los microorganismos aislados	28
5.3 Identificación bioquímica de los microorganismos aislados	30
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
6.1 Identificación macroscópica de los microorganismos aislados	35
6.2 Identificación microscópica de los microorganismos aislados	36
6.3 Identificación bioquímica de los microorganismos aislados	37
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
8. BIBLIOGRAFÍA	41

INDICE DE CUADROS

Tabla 4.1. Fincas seleccionadas para colecta de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	21
Tabla 5.1. Características macroscópicas observadas a partir de la siembra del macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> en medio LB a las 36 horas de incubación a 33 °C.....	24
Tabla 5.2. Características macroscópicas de <i>B. cereus</i> en medio selectivo Agar PEMBA con 24 horas de incubación a 33 °C.	27
Tabla 5.3. Características microscópicas de <i>B. cereus</i> con 6 días de incubación a 33 °C, observadas al microscopio óptico a 100x.....	29

INDICE DE FIGURAS

- Figura 5. 1.** Fotografía del crecimiento de cultivo por extensión en medio LB con 36 horas de incubación a 33 °C, a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans*. Procedentes de Finca A: Hermanos Peraza#1. B: Hermanos Peraza#2. C: Palinche. Dilución 10^{-1} a la izquierda, dilución 10^{-3} a la derecha. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN. 25
- Figura 5. 2.** Fotografía del crecimiento de cultivo por rayado en medio selectivo Agar PEMBA con 72 horas de incubación a 33 °C, a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans* procedentes de Finca A: Hermanos Peraza#1. B: Hermanos Peraza#2. C: Palinche. Dilución 10^{-1} a la izquierda, dilución 10^{-3} a la derecha. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN..... 26
- Figura 5. 3.** Fotografía del crecimiento de cultivo por rayado en medio selectivo Agar PEMBA con 24 horas de incubación a 33 °C, de las colonias puras de *B. cereus*. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN..... 27
- Figura 5. 4.** Fotografía del crecimiento de cultivo por rayado en medio LB con 24 horas de incubación a 33°C, de las colonias puras de *B. cereus*. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN..... 28
- Figura 5. 5.** Fotografía de las tinciones de los aislados obtenidos a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans*, con 6 días de incubación a 33 °C. A, B, C, D: Tinción de Gram. E, F, G, H: Tinción Schaeffer-Fulton. I: Tinción con azul de Coomassie. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN..... 29
- Figura 5. 6.** Fotografía de las observaciones al microscopio de luz a 100X de *B. cereus* con 6 días de incubación a 33 °C. A: Tinción de Gram, B: Tinción Schaeffer-Fulton. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN..... 30
- Figura 5. 7.** Fotografía de la galería de API 50CHB de *B. cereus* con 48 horas de incubación a 33 °C. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN. 34

INDICE DE ANEXOS

9.1 Medios de cultivo	44
9.2 Aislamientos en medio selectivo descartados.....	45
9.3 Galería API recién inoculada.....	46
9.4 Hoja de Información	47

1. INTRODUCCIÓN

Stomoxys calcitrans es una de las moscas plaga de mayor cuidado en explotaciones ganaderas y agrícolas, dado que son capaces de contaminar la producción y transmitir diversidad de patógenos a los animales (Salas y Larraín, 2008). Esta ha cobrado relevancia en el área agropecuaria desde los años 1988-1990 (SFE, 2006).

S. calcitrans es un insecto parásito hematófago, ampliamente distribuido, que produce una alta cifra de larvas en cultivos y en residuos de fincas pecuarias (Gomes *et al.*, 2008).

Actualmente, se invierten grandes sumas de dinero por parte del sector agropecuario, en medidas culturales de manejo sanitario y uso de insecticidas sintéticos para el control de esta mosca, los cuales brindan resultados positivos sólo de corto plazo, con lo que se aumenta el riesgo de aparición de razas resistentes (Cruz *et al.*, 2000; Salas y Larraín, 2008; Hiroiuki y Arantes, 2010). Es por esta razón que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de control que sean efectivas y amigables con el ambiente.

Una de estas alternativas, es el aprovechamiento de la característica que tienen los insectos, de que normalmente contienen un gran número de bacterias, que en ocasiones son capaces de ocasionar enfermedades especialmente en larvas (Carrera, 2009), y de este modo alcanzar una nueva opción con miras a lograr el control efectivo de la mosca del establo.

Por esta razón, esta investigación tiene como objetivo, probar una metodología para el aislamiento e identificación bioquímica y microscópica de bacterias representativas del género *Bacillus* con potencial insecticida contra *Stomoxys calcitrans*, muestreada en 3 fincas de la zona de San Carlos, Alajuela.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes de *Stomoxys calcitrans*

En explotaciones ganaderas y agrícolas, las moscas son plagas de gran importancia económica, dado que contaminan los productos y transmiten una variedad de patógenos a los animales (Salas y Larraín, 2008). Una de estas moscas que ha cobrado relevancia en el área agropecuaria, es la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*), la cual produce gran cantidad de larvas en campos de cultivo y en desechos de fincas pecuarias (SFE, 2006).

Los ataques a animales domésticos por moscas chupadoras de sangre, se reportan desde 1988 en la Región Brunca, 1990 en la Huetar Norte y 1996 en la Zona Atlántica de Costa Rica (SFE, 2006).

Según el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), esta proliferación de moscas, entre ellas la del establo, se debe principalmente al manejo inadecuado de los residuos provenientes de cultivos como banano y piña (SFE, 2006), debido a que en el proceso de descomposición de la materia orgánica intervienen una serie de organismos que se ven favorecidos. Estos utilizan este medio para completar su ciclo biológico; entre ellos destacan especies de Dípteros, sobresaliendo la mosca del establo, donde su presencia se ha podido comprobar gracias a estudios de campo y laboratorio (SFE, 2006; SFE y SENASA, s.f).

2.2 Biología del insecto

Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Artrópoda

Clase: Hexápoda

Orden: Díptera

Familia: Muscidae

Género: *Stomoxys*

Especie: *calcitrans* (SFE y SENASA, s.f).

La mosca del establo es un insecto hematófago, parásito externo, endémico del trópico húmedo y ampliamente distribuido (Cruz *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2003; SFE, 2006).

Su tamaño ronda los 6 mm de longitud y su tórax es de color gris con cuatro rayas longitudinales oscuras. Posee aproximadamente el mismo tamaño que la mosca doméstica, pero se puede distinguir fácilmente por sus piezas bucales utilizadas para perforar la piel y beber la sangre. Desde la parte inferior de su cabeza se extiende su aparato bucal, y para absorber la sangre de animales presenta proboscis largas y rígidas, con las cuales ataca las partes inferiores de las patas y, en poblaciones altas, afecta todo el animal (Rojas *et al.*, 2003; Masmatahip *et al.*, 2006; SFE, 2006).

Este insecto pasa por las etapas de huevo, larva, pupa y adulto (Rojas *et al.*, 2003); la hembra realiza de cuatro a cinco ovoposiciones a lo largo de su vida, cada una en promedio de 80 a 100 huevos de forma alargada. Para madurar sus huevos (lo cual sucede en tres días) busca alimentarse por lo menos 3 veces al día (Rojas *et al.*, 2003; SFE, 2006).

La etapa larval consta del primer, segundo y tercer estadio, que se desarrollan en materia orgánica vegetal en descomposición, húmeda y fermentada, donde después de 11 a 22 días empiezan a pupar. Las larvas de *S. calcitrans* son muy similares a las larvas de *M. domestica*, pero pueden ser identificadas a través de los espiráculos respiratorios, que en la mosca de los establos son pequeños y distantes entre sí, formando una S, mientras que en *M. domestica*, estos asemejan una M (SFE, 2006).

De 6 a 10 días luego de permanecer en estado de pupa, surgen los adultos, los cuales, al contrario de los estados inmaduros, se desarrollan a partir de su alimentación con sangre. El período que transcurre entre huevo y adulto dependiendo de la temperatura y la humedad es de 15 a 30 días, alcanzando una longevidad alrededor de los cien días (SFE, 2006; Salas y Larraín, 2008).

2.3 Efectos negativos de la mosca del establo

S. calcitrans, es una mosca que ataca a varias especies, entre las que se destacan vacas, cabras, ovejas, caballos, perros e incluso el hombre (Hiroiuki y Arantes, 2010). Afecta de manera importante al ganado lechero, alimentándose de la sangre, pero no convive con ellos, si no que se retira a lugares sombreados. La presencia de altas infestaciones causa efectos adversos en sus víctimas como aislamiento y amontonamiento, rabeo constante,

alteración de su sistema nervioso, mostrando agresividad, rompimiento de cercas de alambre, no permiten el ordeño, alimentación intranquila, pierden peso y por lo tanto la producción de carne y leche se ve reducida (Rojas *et al.*, 2003).

La mosca del establo no sólo afecta por las molestias que causa su picadura, sino que también, es un vector significativo de agentes de enfermedades infecciosas (Cruz *et al.*, 2000; Masmatathip *et al.*, 2006). Se distingue por su capacidad de transmitir patógenos como virus, hongos, protozoos, helmintos y bacterias. Estudios mencionan que se han logrado aislar alrededor de 47 o más especies bacterianas a partir de esta mosca, siendo de estas, las más destacadas las enterobacterias (Gomes *et al.*, 2008).

De estas especies la mayoría se encuentran en el ambiente, siendo posible que tanto los estados inmaduros como el adulto de *S. calcitrans* se contaminen en su interacción con el entorno (Gomes *et al.*, 2008).

2.4 Medidas de control de *S. calcitrans*

El sector agropecuario basa el control de moscas, casi en su totalidad, en medidas culturales de manejo sanitario y el uso de insecticidas sintéticos que actúan sobre los estados adultos, los cuales brindan resultados positivos sólo de corto plazo, con lo que se aumenta el riesgo de aparición de razas resistentes y se invierte anualmente grandes sumas de dinero para su control (Cruz *et al.*, 2000; Salas y Larraín, 2008; Hiroiuki y Arantes, 2010).

La ineficiencia de estas medidas se debe a que *S. calcitrans* posee un comportamiento biológico diversificado, que le permite utilizar sitios alternativos de reproducción, movimientos de migración y uso de múltiples hospederos, por lo que estas estrategias de control se pueden complicar y ser poco efectivas. Es así que para el desarrollo e implementación de métodos de control se requiere comprender muy bien los aspectos que conforman su ciclo de vida, tanto a nivel de los estados inmaduros como de los adultos (Cruz *et al.*, 2000; Hiroiuki y Arantes, 2010).

Debido a este comportamiento tan variado, la aplicación de insecticidas biológicos o productos químicos en lugares donde los estados inmaduros de esta mosca se desarrollan, pueden dar mejores resultados en su control (Rodrigues *et al.*, 2010).

2.5 Control biológico de *S. calcitrans*

El control biológico es la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales, es decir, mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos. Estos últimos son microorganismos: virus, bacterias, protozoos y hongos, que causan enfermedades entre las plagas (Carrera, 2009).

Para el control biológico de la mosca del establo, se consideran con potencial los parasitoides pupales de la familia Pteromalidae (Hymenoptera), aunque las frecuentes fallas para su control, muestran que se debe tener un conocimiento más profundo, no solo de la biología de la mosca, sino también de la biología de las diferentes especies de parasitoides, previo a su selección y uso en programas de control biológico (Skovgard y Steenberg, 2005).

Por otro lado, por su capacidad de infectar las moscas de forma natural, los hongos entomopatógenos se muestran como otra alternativa de control. Hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* han mostrado cierta eficacia para el control de moscas cuando se incorporan en el medio en que se desenvuelven los estadios inmaduros, sin embargo con muy bajos porcentajes de infección (Skovgard y Steenberg, 2005; Rodrigues *et al.*, 2010).

Normalmente los insectos contienen un gran número de bacterias, la mayoría saprofitas y algunas simbióticas. En ocasiones se presentan bacterias patógenas que son capaces de ocasionar enfermedades especialmente en larvas (Carrera, 2009). Desde el punto de vista comercial, las bacterias entomopatógenas más importantes pertenecen al género *Bacillus* (Paucar, 2011).

2.6 Género *Bacillus*

Bacillus es uno de los principales géneros bacterianos formadores de endosporas (Sosa *et al.*, 2004). Las especies pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en suelo, agua y como parte de la flora intestinal normal de algunos mamíferos, incluyendo al hombre (Marquéz, 2007).

Las endosporas son una estructura especializada resistente a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos. Por lo tanto, la formación de esta

estructura está dada por las condiciones del medio en que se encuentran estas bacterias (Marquéz, 2007).

Entre las características más relevantes que presenta el género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar, pueden alcanzar medidas de 0,5-2,5 a 1,2-10 μm , son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva y además cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno (Marquéz, 2007; Sosa *et al.*, 2004).

La producción de enzimas hidrolíticas policelulares, es otra capacidad que tienen variedad de especies de *Bacillus*, las cuales se encargan de degradar los compuestos disponibles en el suelo como polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que les permite usar dichos productos como fuente de carbono y donadores de electrones. La amilasa es una de las enzimas más conocidas que secretan, la cual se encarga de degradar el almidón y convertirlo en dextrina. La principal bacteria que secreta esta enzima es *Bacillus subtilis* (Marquéz, 2007).

Así también, es importante resaltar que una cualidad por la cual son muy estudiadas estas bacterias, es que presentan un potencial para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica, que impiden el establecimiento de patógenos vegetales, pudiendo servir para proteger a plantas de enfermedades (Marquéz, 2007; Reinoso *et al.*, 2006).

Dadas las características anteriores, las especies del género *Bacillus* se presentan como buenas candidatas para ser usadas como agentes de control biológico. Entre las más utilizadas con este propósito se encuentran: *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Reinoso *et al.*, 2006).

2.7 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria Gram positiva, aerobia o anaerobia facultativa, la espora que produce es oval-central, no deformante de la célula madre, moderadamente resistente al calor, gracias a sus flagelos posee movilidad. Su rango de temperatura óptima está entre 28-40°C, teniendo amplios rangos de pH entre 4,9-9,3. Posee actividad hemolítica extracelular y no presenta cristales proteicos en su interior (Handelsman, 1990; Vilas *et al.*, 2007; Córdoba, 2009).

Esta especie ha sido frecuentemente aislada de coleópteros, himenópteros y lepidópteros enfermos o encontrada en insectos de productos almacenados. Por lo que ha sido citada como patógena de estos. Su patogenicidad se le atribuye presumiblemente a la actividad fosfolipasa C (enzima lecitinasa), cuya acción enzimática consiste en la lisis de los fosfolípidos de las membranas celulares, provocando alteraciones en el sistema digestivo de los insectos susceptibles, resultando en septicemia y muerte del insecto. Este proceso se puede evidenciar por la reacción típica de precipitación que presentan estos microorganismos cuando crecen en medio de cultivo con yema de huevo (Vilas *et al.*, 2007; Martínez, 2008; Córdoba, 2009; Domínguez y Domínguez, 2009).

Uno de los casos en que se ha reportado su patogenicidad es en larvas de *Phyllophaga spp.* (Villegas, 2004). Así también, esta bacteria y *B. subtilis* han sido utilizadas como organismos antagonistas para el control de *Phytophthora infestan*, *P. sojae*, *P. medicaginis* y *P. capsici*, tanto *in vitro* como en suelos infestados por el patógeno (Lagunas *et al.*, 2001).

B. cereus es capaz de desarrollarse en medios ricos, que contienen extractos de levadura, hidrosilato de caseína o una fuente de aminoácidos equivalentes y azúcares. Su fuente favorita de carbohidratos es la trihalosa, azúcar presente en la hemolinfa de los insectos, sin embargo, también puede hacer empleo de la glucosa (Villegas, 2004).

En medios de cultivo generales como agar nutritivo, las colonias presentan una coloración beige opaca, conservando el color del medio de cultivo; poseen forma irregular, de superficie rugosa y borde lobulado (Córdoba, 2009). Crecida en Agar PEMBA o Agar Mossel genera colonias turquesa o rosadas con precipitado respectivamente (Universidad de Buenos Aires, 2010).

2.8 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es un microorganismo Gram positivo, aerobio, mesófilo, formador de esporas en condiciones ambientales hostiles, tales como bajos niveles de nutrientes, incluyendo oxígeno o un pH desfavorable (Castañeda *et al.*, 2009). De manera similar a otros bacilos, secreta cantidades sustanciales de enzimas hidrolíticas como amilasas y proteasas, resultando de interés en diferentes procesos industriales (Molina, 2008).

Macroscópicamente se caracteriza porque sus colonias poseen un tamaño y forma irregular, tienen margen ondulado, color blanco y textura seca. A nivel microscópico, se observan como bacterias que no forman cadenas, con endosporas centrales-terminales y ovaladas (Venegas *et al.*, 2005). En medio Agar PEMBA o Agar Mossel, generan colonias amarillas, sin formación de precipitado (Universidad de Buenos Aires, 2010).

B. subtilis es comúnmente encontrada en el suelo, donde libera compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas (polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos) (Molina, 2008).

Investigaciones en tomate muestran que *B. subtilis* no solamente inhibe al patógeno, sino que además, promueve el crecimiento de la raíz y de la planta e incrementa el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en las hojas. Así también, han sugerido que *B. subtilis* también podría influir en los mecanismos de resistencia, ya que aumenta la cantidad de fenil alanina amonio liasa y la actividad peroxidasa (Lagunas *et al.*, 2001).

En algunos patosistemas de postcosecha, *B. subtilis* es uno de los agentes de control biológico más evaluado y con efectividad comprobada (Gutiérrez *et al.*, 2003).

2.9 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria distribuida ampliamente por todo el mundo y ha sido aislada a partir de hábitats variados (Ruíz *et al.*, 2004), desde insectos muertos o moribundos, correspondientes a los órdenes Coleóptera, Lepidóptera y Díptera; hasta del suelo, ambientes acuáticos y superficies foliares (Ruíz *et al.*, 2004; Paucar, 2011).

Bt es una bacteria aerobia, Gram positiva, quimioheterótrofa, con capacidad para esporular. Sus células vegetativas tienen forma bacilar de 3 a 5 µm de largo por 1 a 1,2 µm de ancho y poseen flagelación pérmica. Es capaz de fermentar glucosa, fructosa, maltosa, ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno (Carmona, 2002; Ruíz *et al.*, 2004; Carrera, 2009; Paucar, 2011).

El principal componente tóxico de Bt es la proteína cristal (Cry) o δ-endotoxina, formada durante el proceso de esporulación, y la cual posee un espectro de actividad biológica definido, selectivo para ciertas especies, entre las que se incluyen importantes plagas agrícolas como: coleópteros, lepidópteros, dípteros, ácaros, nematodos, gusanos planos y

protozoarios (Carmona, 2002; Ruíz *et al.*, 2004; Carreras, 2009; Carrera, 2009; Paucar, 2011).

La aparición de este cristal es una característica distintiva de *B. thuringiensis*, la cual, permite distinguirla de otras especies cercanas filogenéticamente como *Bacillus cereus*. Este cristal paraesporal puede presentar varias morfologías: bipiramidal, cúbico, cuadrado aplanado, esférico o amorfo (Ruíz *et al.*, 2004; Paucar, 2011).

Para diferenciar especies dentro de un mismo género, se recurre también a la determinación de la posición y morfología de la endospora en el interior de la bacteria. *Bacillus thuringiensis* tiene localizada la endospora elipsoidal en posición terminal dentro de la célula vegetativa (Carreras, 2009).

El aspecto macroscópico que presenta *B. thuringiensis* en medios convencionales es la presencia de colonias de 1-1,5 cm de diámetro, de color blanco-grisáceo, perfil plano, opacas, consistencia ligeramente costrosas o harinosas y cerosas, con bordes irregulares o ramificados (Carreras, 2009; Paucar, 2011).

El crecimiento de *Bacillus thuringiensis* se da normalmente a una temperatura entre 27°C y 33°C; sin embargo la producción óptima de endotoxina ocurre en promedio a los 30°C; a más de 45°C se produce una disminución en la producción de los cristales, y por ende en una baja actividad insecticida. A menos de 20°C la velocidad de crecimiento se ve disminuida (Carrera, 2009; Paucar, 2011).

Los medios de cultivo de Bt deben ser ajustados a un pH mayor a 5.0, donde el crecimiento se favorece dentro del rango de 5.6 a 8.5 (Carrera, 2009; Paucar, 2011).

Dadas las características de esta bacteria, la búsqueda de nuevas cepas en los hábitats naturales, se ha convertido en una práctica que ha permitido aumentar las posibilidades de su uso en el control de organismos que constituyen plagas, por lo que la prospección y aislamiento en diferentes regiones ha logrado el enriquecimiento de los ceparios que buscan conservar esta especie con un elevado potencial para el control de insectos y otros (Carreras, 2009).

Debido a su rápida acción y a la posibilidad de producirlo *in vitro* en forma industrial, Bt representa el entomopatógeno de mayor producción en el mundo (Paucar, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Probar una metodología para el aislamiento e identificación bioquímica y microscópica de bacterias representativas del género *Bacillus* con potencial insecticida contra *Stomoxys calcitrans*, muestreada en 3 fincas de la zona de San Carlos, Alajuela.

3.2 Objetivos Específicos

- Probar una metodología para el aislamiento e identificación de bacterias representativas del género *Bacillus* a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans*, mediante el uso de un medio de cultivo selectivo.
- Identificar los aislamientos obtenidos mediante pruebas bioquímicas y microscopía.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención e identificación de muestras

Se realizó una visita a 3 fincas de la zona de San Carlos, Costa Rica, para coleccionar larvas de *Stomoxys calcitrans* presentes en los rastrojos del cultivo de la piña. Las fincas escogidas y su ubicación se observan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Fincas seleccionadas para colecta de larvas de *Stomoxys calcitrans*.

Nombre de la Finca	Coordenadas
Hermanos Peraza #1	N 10° 33' 04,8''
	W 84° 17' 05,6''
Hermanos Peraza #2	N 10° 32' 58,2''
	W 84° 16' 27,9''
Palinche	N 10° 31' 08,4''
	W 84° 15' 19,8''

De cada finca se coleccionaron 30 larvas que presentaban las características de *S. calcitrans*, para su reconocimiento en campo se contó con la colaboración de un funcionario del MAG de la sede de Pital. Las larvas fueron almacenadas en frascos plásticos para su transporte y finalizada la colecta fueron refrigeradas, para su posterior identificación.

En el Laboratorio de Biocontroladores ubicado en la Fundación PROAGROIN, Pital, San Carlos, se procedió a identificar las larvas pertenecientes a *S. calcitrans* con la ayuda de un estereoscopio, diferenciándolas de otras especies por la forma de 'S' que presentan sus espiráculos y descartando las no correspondientes a esta especie. Para evitar su descomposición durante el proceso, las muestras fueron mantenidas en hielera, con la mínima manipulación.

4.2 Desinfección de larvas

Se desinfectaron 10 larvas por finca para eliminar la contaminación externa, pasándolas a través de una solución de alcohol 70% por 2 segundos, después por una de hipoclorito de sodio al 6% por 3 minutos, continuando con una de tiosulfato de sodio al 10% por 5 minutos, finalizando con tres lavados con agua destilada estéril.

4.3 Macerado y siembra en placas

Terminada la esterilización, las larvas fueron secadas con servilletas estériles y 5 de cada finca se transfirieron asépticamente a un tubo *Eppendorf* estéril y se maceraron. El macerado se colocó en tubos con 10 ml de agua destilada (este procedimiento se realizó por duplicado).

Cada suspensión se calentó a 65°C por 12 minutos, y se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10⁻³. De la dilución de 10⁻¹ y 10⁻³ se tomaron 100 µl y se cultivaron por extensión en placas con medio LB, por triplicado y se incubaron a 33° C por 24-48 horas.

Con el fin de disminuir el rango de búsqueda, se decidió aislar específicamente 3 bacterias del género *Bacillus*: *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Por lo que a partir del crecimiento que se presentó en medio LB, se aislaron colonias separadas de aspecto semejante a bacillus, tanto en medio LB, como en Medio Agar PEMBA.

Las colonias aisladas fueron subcultivadas por rayados sucesivos cada 24 o 48 horas, seleccionándolas por la coloración que estas presentaron en el medio y su crecimiento, hasta obtener colonias puras.

4.4 Identificación macroscópica y microscópica de los aislamientos

A los aislados obtenidos después de cada subcultivo se les observó macroscópicamente la morfología (forma, color del medio, color de la colonia). Para su identificación microscópica se realizó tinción de Gram, tinción de Schaffer-Fulton para observar esporas y tinción con azul de Coomassie, para el caso de identificación de cristales de *Bacillus thuringiensis*.

4.5 Tinción de Schaffer-Fulton

Se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos y se frotó con una azada de los cultivos puros aislados. Para fijarlo se flameó con cuidado hasta que la muestra se secase. Una vez seco el frotis, este se cubrió con verde de malaquita y se calentó por 1 minuto y medio con cuidado, pasado el tiempo se enjuagó con agua. Posteriormente se cubrió el frotis con safranina, dejándola actuar 1 minuto, se lavó luego con agua, se dejó secar al aire y por último se observó al microscopio óptico con aumento de 100x.

4.6 Tinción con azul de Coomassie

Se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos y se frotó con una azada de los cultivos aislados. Para fijarlo se flameó con cuidado hasta que la muestra se secase. Una vez seco el frotis se colocaron dos gotas de azul de Coomassie sobre este y se esperó un minuto. Posteriormente se lavó el portaobjetos con agua y se observó al microscopio con aumento de 100X.

4.7 Identificación bioquímica API 50 CHB

Para determinar el género y especie de los aislados se utilizó la prueba bioquímica API 50CHB siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante a continuación:

Preparación de la galería

Se preparó la cámara de incubación, anotando a un lado la referencia de la cepa a identificar. Luego se repartió 10 ml de agua destilada en los alveolos del fondo para crear una atmósfera de humedad y se colocó la galería.

Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión densa de cada cepa a identificar, colocando todas las bacterias del cultivo con un escobillón en 1 ml de agua destilada estéril.

Luego se realizó una suspensión de turbidez de 2 McFarland en el medio de suspensión, trasladando un cierto número de gotas (5-7 gotas).

Una vez realizado este paso, se preparó la suspensión en el medio API 50 CHB, agregando el doble de gotas utilizado anteriormente.

Inoculación de las galerías

Se repartió el medio API 50 CHB preparado, en los tubos de la galería solamente.

Incubación y lectura de las galerías

Las galerías fueron incubadas a 33 °C por 24 horas y 48 horas, realizándose la anotación de los colores presentados en esos dos tiempos.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación macroscópica de los microorganismos aislados

A partir del macerado de las larvas colectadas en las tres distintas fincas muestreadas, se alcanzó crecimiento en las 36 placas con medio LB incubadas a 33 °C durante 36 horas, sobresaliendo las características macroscópicas mencionadas en la tabla 5.1. Siendo mayor el crecimiento a partir de las diluciones de 10^{-1} y menor el crecimiento en las placas sembradas con diluciones de 10^{-3} (Figura 5.1).

Tabla 5.1. Características macroscópicas observadas a partir de la siembra del macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans* en medio LB a las 36 horas de incubación a 33 °C.

Características	Observaciones
Color colonias	Amarillo, beige, blanco
Forma	Irregular
Elevación	Aplanada o con leve elevación
Borde	Ondulados irregulares
Consistencia	Seca y cerosa
Color del medio	Conserva el color del medio

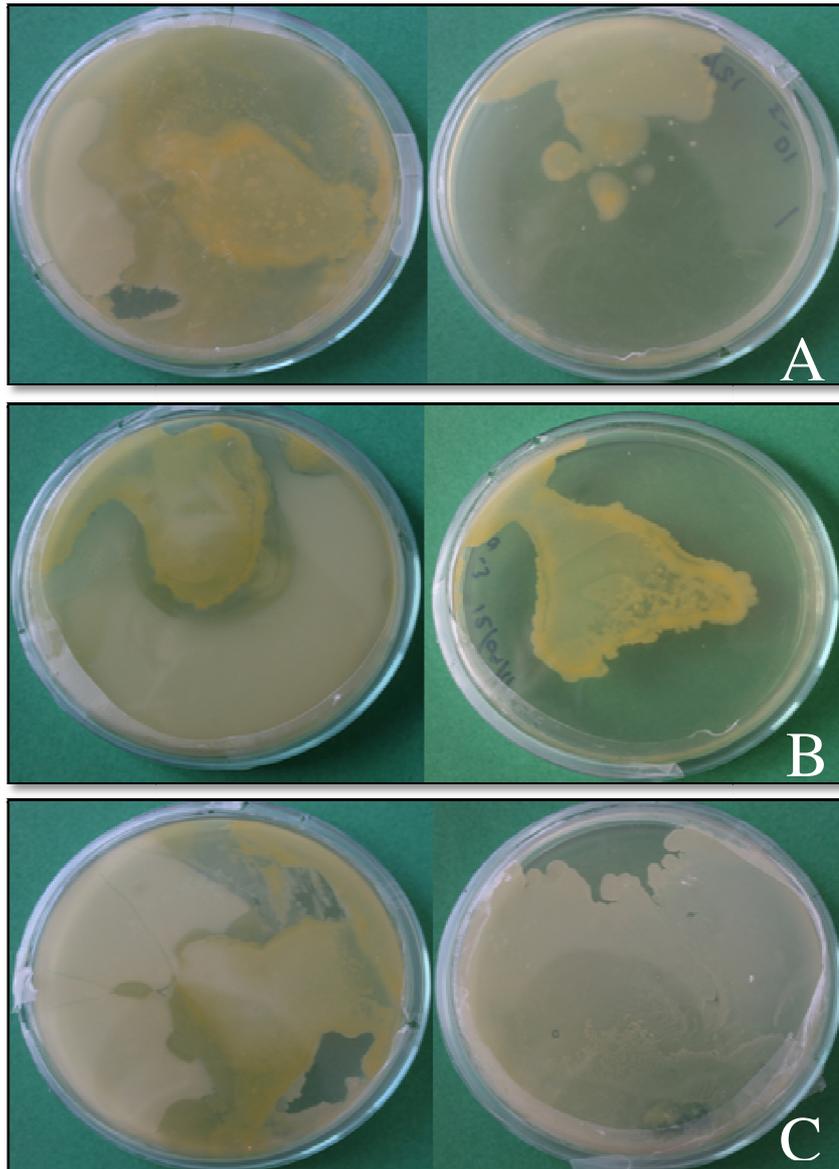


Figura 5. 1. Fotografía del crecimiento de cultivo por extensión en medio LB con 36 horas de incubación a 33 °C, a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans*. Procedentes de Finca A: Hermanos Peraza#1. B: Hermanos Peraza#2. C: Palinche. Dilución 10^{-1} a la izquierda, dilución 10^{-3} a la derecha. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN.

A los 3 días de crecimiento las colonias que asemejaron más las características propias del género *Bacillus* fueron subcultivadas en medio selectivo Agar PEMBA, seleccionándose 8 placas con crecimiento por cada finca, para un total de 32 placas, las cuales presentaron distinta coloración, variando entre amarillo, azul y verde a sus 72 horas de incubación a 33 °C (Figura 5.2).

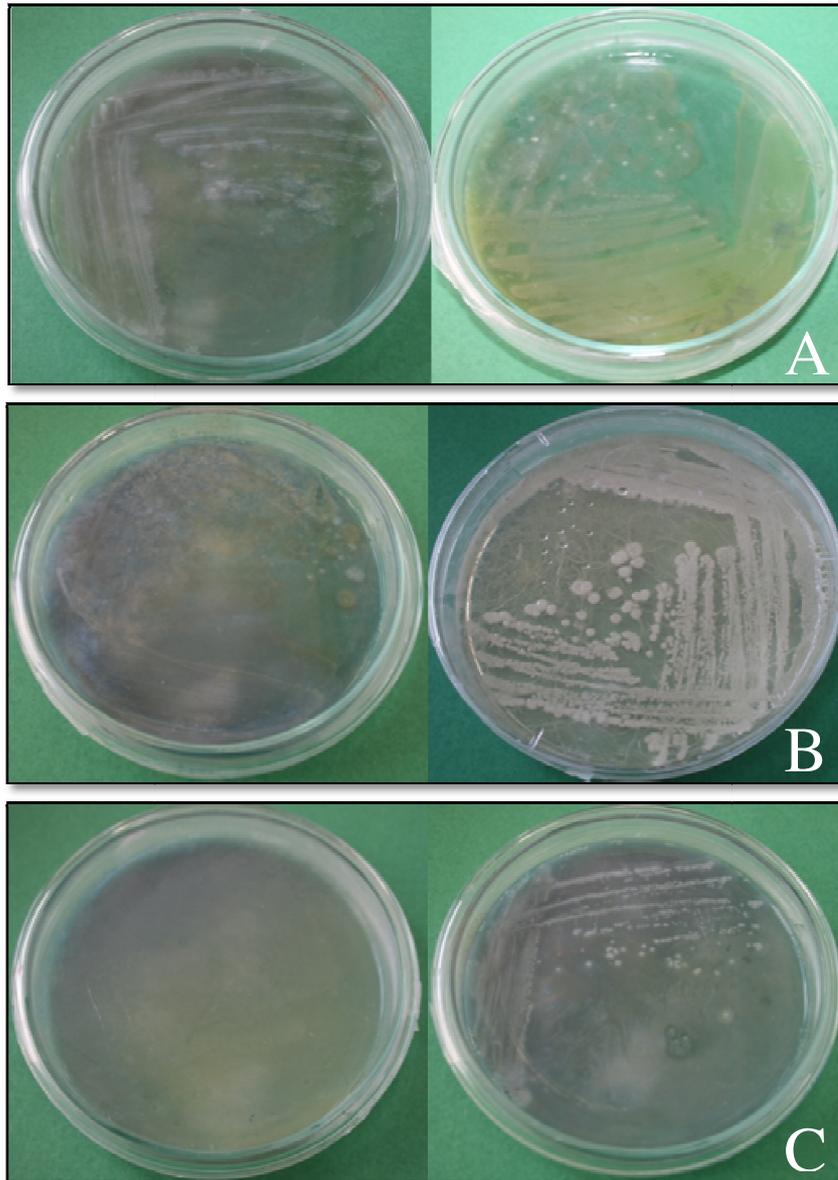


Figura 5. 2. Fotografía del crecimiento de cultivo por rayado en medio selectivo Agar PEMBA con 72 horas de incubación a 33 °C, a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans* procedentes de Finca A: Hermanos Peraza#1. B: Hermanos Peraza#2. C: Palinche. Dilución 10^{-1} a la izquierda, dilución 10^{-3} a la derecha.

Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN.

Después de varios subcultivos sucesivos, se fueron descartando aislados que no presentaban las características de las bacterias buscadas (Anexo 2), obteniendo al final en medio selectivo Agar PEMBA con 24 horas de incubación a 33 °C, las colonias puras de *B. cereus*, las cuales presentaron las características macroscópicas mencionadas en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Características macroscópicas de *B. cereus* en medio selectivo Agar PEMBA con 24 horas de incubación a 33 °C.

	Bacteria
Características	<i>Bacillus cereus</i>
Color colonias	Blanco-azuladas
Precipitado	Si
Color del medio	Verde-amarillo

En la figura 5.3 se puede apreciar el crecimiento de *Bacillus cereus* en el medio de cultivo selectivo Agar PEMBA. Donde se encuentran las colonias de *B. cereus* se observa el cambio de color del medio de cultivo de amarillo a azul, con la formación de precipitado por acción de la enzima lecitinasa.

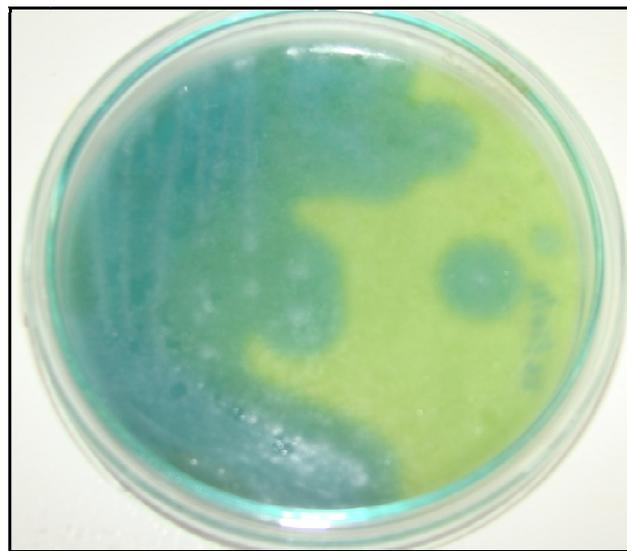


Figura 5. 3. Fotografía del crecimiento de cultivo por rayado en medio selectivo Agar PEMBA con 24 horas de incubación a 33 °C, de las colonias puras de *B. cereus*. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN

En medio LB con 24 horas de incubación a 33 °C, las colonias puras de *B. cereus* presentaron coloración beige y forma irregular como se observa en la figura 5.4.

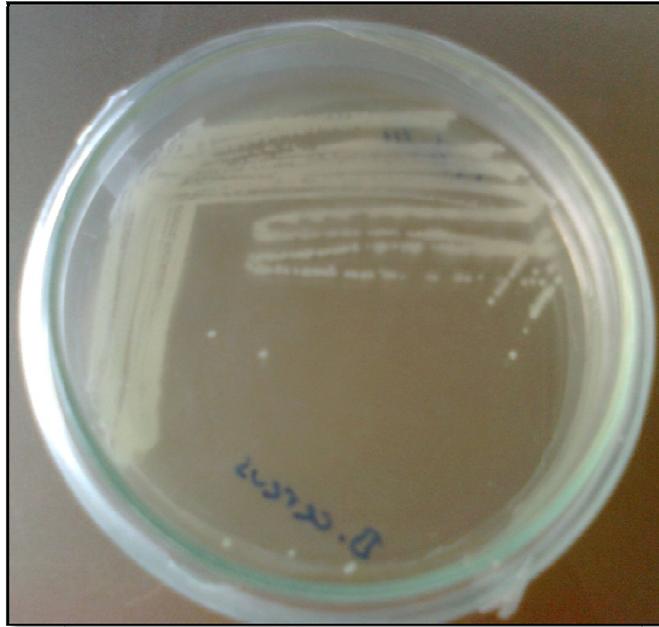


Figura 5. 4. Fotografía del crecimiento de cultivo por rayado en medio LB con 24 horas de incubación a 33°C, de las colonias puras de *B. cereus*. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN.

5.2 Identificación microscópica de los microorganismos aislados

Para la identificación y selección de los aislados obtenidos se realizaron tinciones de Gram, Schaffer-Fulton (tinción de esporas) y con azul de Coomassie para visualizar cristales. A través del microscopio óptico a 100x se pudieron observar las características que estos presentaron, observándose cocos y bacilos Gram positivos, así como presencia esporas en algunos aislados y en otros no, en las tinciones con azul de Coomassie no se observaron cristales (Figura 5.5).

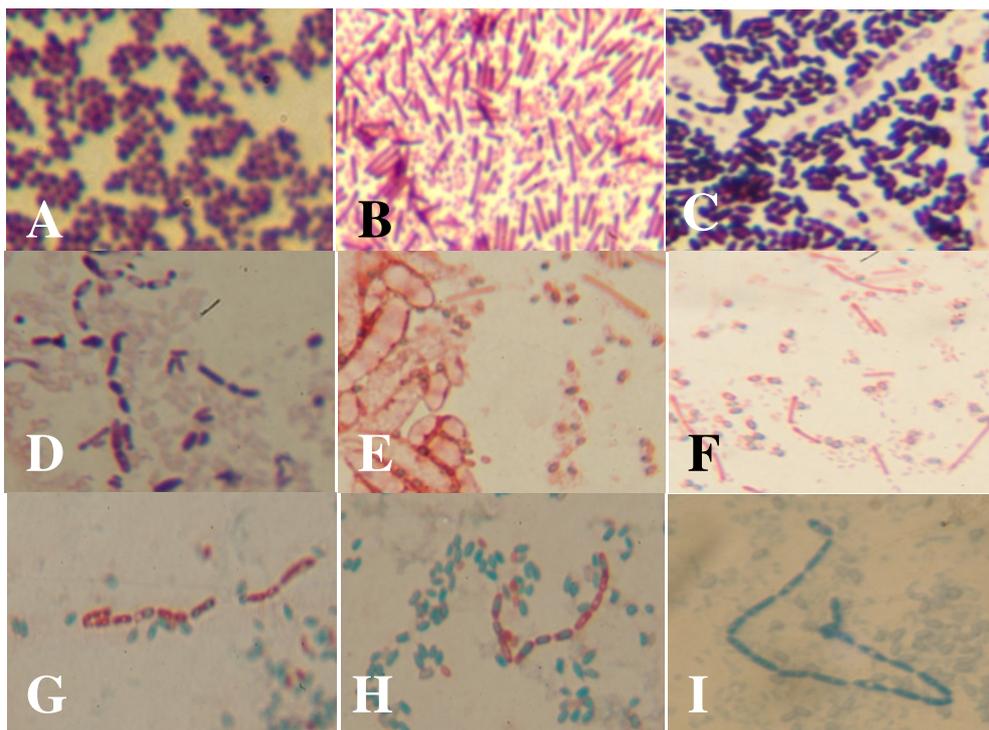


Figura 5. 5. Fotografía de las tinciones de los aislados obtenidos a partir de larvas de *Stomoxys calcitrans*, con 6 días de incubación a 33 °C. A, B, C, D: Tinción de Gram. E, F, G, H: Tinción Schaeffer-Fulton. I: Tinción con azul de Coomassie. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN.

A partir de las tinciones realizadas a los aislados puros, se pudo distinguir la morfología y características que presenta *B. cereus* al microscopio óptico a 100x (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Características microscópicas de *B. cereus* con 6 días de incubación a 33 °C, observadas al microscopio óptico a 100x.

Características microscópicas			
Bacteria	Tinción de Gram	Espora	Presenta cristales
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilos Gram positivos	Oval-central	No

En la figura 5.6 se puede observar que la especie bacteriana *B. cereus* está constituida por bacilos Gram positivos, con endosporas (vistas de color verde).

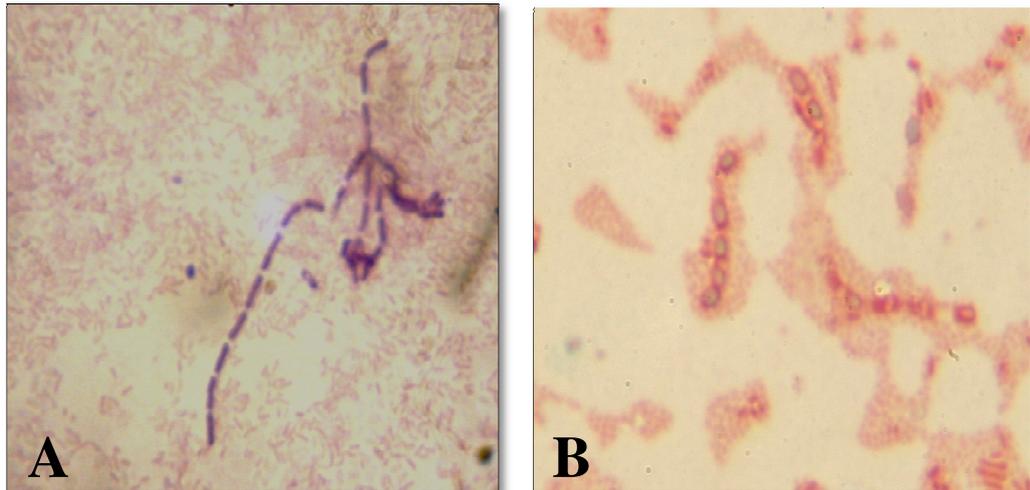


Figura 5. 6. Fotografía de las observaciones al microscopio de luz a 100X de *B. cereus* con 6 días de incubación a 33 °C. A: Tinción de Gram, B: Tinción Schaeffer-Fulton. Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN.

5.3 Identificación bioquímica de los microorganismos aislados

En las galerías bioquímicas del sistema API 50CHB, se inocularon 7 muestras bacterianas de los microorganismos aislados que presentaron las características más semejantes a los buscados, tanto por sus características macroscópicas en medio selectivo, como la presencia de esporas y coloración Gram positivas, después de su incubación 24 y 48 horas los resultados proporcionados por el programa APIWEB™ V4.0 se muestran a continuación:

REFERENCIA

12.1

FECHA

2/11/11

BUENA IDENTIFICACION						
Galería	API 50 CHB V4.0					
Perfil	- + - + + + + - - + + + + - - - + - - + + + + + + + + + + - - + + + - - - + - - - - + - -					
Nota						
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Paenibacillus lautus</i>	98.3	0.7	TUR 97%	TAG 6%		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus circulans</i>	1.0	0.63	DARA18%	TUR 85%	TAG 1%	

REFERENCIA

FECHA

1 1.2		1/11/11	
IDENTIFICACION ACEPTABLE EN EL GENERO			
Galería	API 50 CHB V4.0		
Perfil	- + - ? - + + - - + + + - - - - - + - + - - + - + - - ? + - - - - - + ? -		
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Bacillus thuringiensis</i>		
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Bacillus cereus 2</i>	54.2	0.23	GLY 11% DXYL 1% GAL 3% GNT 20%
<i>Bacillus mycoides</i>	42.8	0.2	GLY 20% DXYL 1% ARB 80% SAL 80% GNT 12%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Bacillus anthracis</i>	1.4	0.06	DXYL 1% GAL 0% ARB 79% GNT 14%

REFERENCIA

FECHA

1 3.1		2/11/11	
PERFIL INACEPTABLE			
Galería	API 50 CHB V4.0		
Perfil	- + + - - + + - - + + + + - - - - - + - - + - - + + - - + + - - - - - - + - -		
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Bacillus thuringiensis</i>		
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Bacillus coagulans</i>			DARA 4% ARB 76% SAL 76% CEL 76% MEL 100% AMD 95% GLYG 23%
<i>Bacillus cereus 1</i>			DARA 1% DXYL 1% GAL 8% ARB 99%
<i>Bacillus lentus</i>			SAL 88% CEL 88% AMD 83% GEN 3% DARA 1% DXYL 10% ARB 82% SAL 75% CEL 75% LAC 82% RAF 75% AMD 75%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Bacillus cereus 2</i>			GLY 11% DARA 0% DXYL 1% GAL 3% MNE 1% GEN 0% GNT 20%

REFERENCIA

1 1.1

FECHA

2/11/11

BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO						
Galería		API 50 CHB V4.0				
Perfil		- + - ? - + + - - - + + + - - - - - ? - - + - - + - - + + - - - + + - - - - - - - - + - -				
Nota		POSIBILIDAD DE <i>Bacillus thuringiensis</i>				
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus mycooides</i>	53.4	0.3	GLY 20%	DXYL 1%	ARB 80%	SAL 80%
			GNT 12%			
<i>Bacillus cereus 2</i>	44.1	0.31	GLY 11%	DXYL 1%	GAL 3%	GNT 20%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus cereus 1</i>	1.3	0.16	DXYL 1%	GAL 8%	ARB 99%	SAL 88%
			CEL 88%			

REFERENCIA

3 1

FECHA

2/11/11

PERFIL INACEPTABLE						
Galería		API 50 CHB V4.0				
Perfil		- + + - + + - - - + + + + - - - - - + - - + - - - - - + - - - - - - - - - - - - - - + - -				
Nota		POSIBILIDAD DE <i>Bacillus megaterium</i> POSIBILIDAD DE <i>Bacillus thuringiensis</i>				
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus firmus</i>			DARA 0%	RIB 20%	DXYL 7%	GAL 1%
			MNE 11%	MAL 92%	SAC 77%	GNT 7%
<i>Brevibacillus laterosporus</i>			DARA 0%	DXYL 20%	GAL 0%	ARB 88%
			SAL 79%	MAL 88%	GNT 1%	
<i>Bacillus cereus 1</i>			DARA 1%	DXYL 1%	GAL 8%	ARB 99%
			SAL 88%	CEL 88%	MAL 100%	AMD 83%
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>			DARA 0%	MAL 100%	GNT 0%	
<i>Bacillus cereus 2</i>			GLY 11%	DARA 0%	DXYL 1%	GAL 3%
			MNE 1%	MAL 100%	GNT 20%	

REFERENCIA

34

FECHA

2/11/11

PERFIL INACEPTABLE	
Galería	API 50 CHB V4.0
Perfil	- + + - - + - - - + + + + - + + + - - - + + + + + - + + - - - + + - - + + - + - - - - + + + - -
Nota	

REFERENCIA

35

FECHA

2/11/11

PERFIL INACEPTABLE	
Galería	API 50 CHB V4.0
Perfil	- + + - + + - - - + + + + - + + + - - - + + + + - - - + + - - - + + - - + + - - - - - - + + + + -
Nota	

Como se observó, de las tres bacterias buscadas, el perfil API mostró la presencia de *B. cereus* como identificación aceptable en el género, y como no se observaron cristales paraesporales, se descartó que la especie encontrada fuera *B. thuringiensis*. La galería de identificación API para *B. cereus* después de 48 horas de incubación se puede observar en la figura 5.7, donde el cambio de color de rojo a amarillo (la reacción # 25 pasa de rojo a negro) demuestra reacciones positivas.

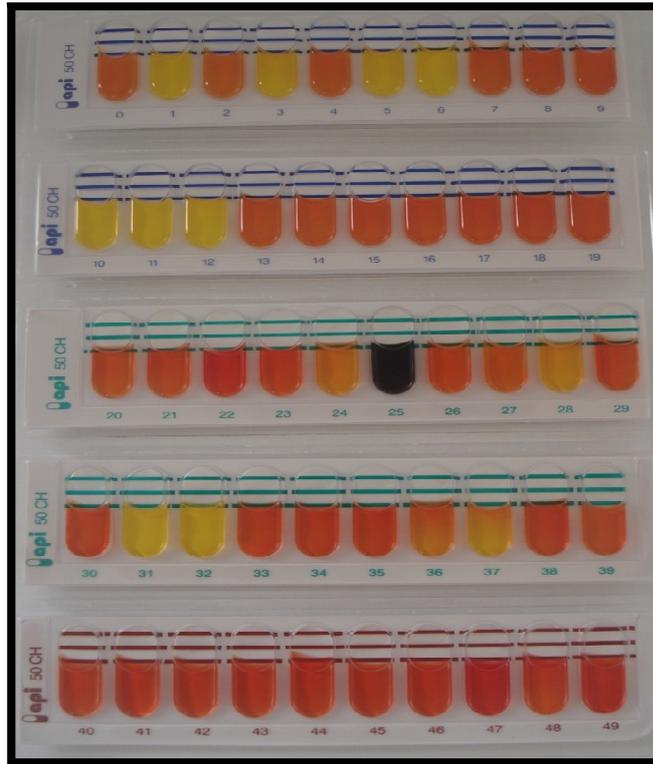


Figura 5. 7. Fotografía de la galería de API 50CHB de *B. cereus* con 48 horas de incubación a 33 °C.
Fuente: Laboratorio de Biocontroladores. Fundación PROAGROIN.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Identificación macroscópica de los microorganismos aislados

Como sugieren los resultados obtenidos en este trabajo, las larvas de *Stomoxys calcitrans* son una gran fuente de microorganismos, independientemente del ambiente de donde provengan. Así lo recalca el ensayo de aislamiento de enterobacterias de Gomes y colaboradores (2008) donde aislaron a partir de esta mosca 159 especies, de las cuales identificaron 28 diferentes. Estos autores también sugieren que se deben realizar más estudios sobre el papel de estas bacterias para el control biológico de *S. calcitrans*, ya que otros investigadores hacen referencia a su uso para el control de dípteros.

Al igual que en este ensayo, Gomes y compañía (2007) aislaron a partir de segmentos de *S. calcitrans* bacterias del género bacillus, identificándose especies como *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. alvei*, *B. megaterium* y *B. coagulans*, de las cuales *B. megaterium*, *B. coagulans* y *B. cereus* fueron identificadas por el API 50CHB en este estudio.

Así se comenzó con la observación de la morfología colonial de los aislados en agar PEMBA, selectivo para *Bacillus cereus*, donde *Bacillus thuringiensis* presenta las mismas características, dado su parentesco con *B. cereus*; *B. subtilis* muestra también morfología fácil de distinguir con colonias amarillo-pajizo, sin halo de precipitación (Martínez, 2008; Oxoid, 2011).

En el medio agar PEMBA, la polimixina B se usó como el agente selectivo primario para la inhibición del crecimiento de las bacterias Gram-negativas. Por su parte, la presencia de yema de huevo, manitol y azul de bromotimol (indicador colorimétrico) permitieron la diferenciación de *B. cereus*, ya que al contrario de muchas especies del género, *B. cereus* no fermenta el manitol por lo que se presenta de color azulado debido al pH básico, pero produce fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina, siendo positiva para la actividad lecitinasa y dando como resultado la formación de un halo de precipitación (Martínez, 2008; Córdoba, 2009; Oxoid, 2011).

Las características anteriormente descritas se observaron en una de las placas, con lo que se pudo distinguir presuntivamente la presencia de *B. cereus*, confirmada luego por las demás pruebas empleadas.

Así mismo, la cepa identificada como *Bacillus cereus* creció fácilmente en medio LB después de 24 horas, las características obtenidas se pueden comparar con el estudio realizado por Córdoba (2009), quién observó que *B. cereus* es una bacteria de color beige no brillante, irregular y conserva el color amarillo del medio de cultivo. Los mismos resultados fueron obtenidos por Vitelli y colaboradores (2010) quienes utilizaron el método de diluciones seriadas y siembra en medio LB para el aislamiento de bacterias del grupo "*Bacillus cereus*".

6.2 Identificación microscópica de los microorganismos aislados

En las observaciones al microscopio, se pudieron distinguir morfologías de distintos tipos, desde bacterias Gram positivas y negativas, como cocos y bacilos con y sin esporas. Para esto, se utilizaron distintas tinciones, las cuales se caracterizan por la aplicación de colorantes básicos como el cristal violeta, safranina y verde de malaquita, ya que estos son más efectivos para unirse a las estructuras internas y superficie celular de las bacterias, debido al pH cercano a la neutralidad y la carga negativa que poseen respectivamente esas estructuras (Vázquez *et al.*, 2010).

De este modo, primeramente se realizó tinción de Gram, que como lo indica Vázquez y colaboradores (2010) proporciona una información esencial sobre la forma, tamaño, agrupación celular, tipo y composición de la pared que presentan las bacterias. Permitiendo así seleccionar de los aislados obtenidos, los bacilos Gram positivos, que según Ragazzo y compañía (2011) es una de las principales características de las bacterias del género *Bacillus*.

La tinción de Schaeffer-Fulton fue la segunda tinción usada para seleccionar las bacterias buscadas, dado que esta permite poner de manifiesto la endospora bacteriana, la cual debido a sus características no se tiñe con procedimientos habituales. Para lograr su visualización la suspensión de microorganismos se tiñó en caliente con verde malaquita. El calor modifica la permeabilidad de la endospora y permite la entrada del colorante a

través de las capas externas de la endospora. A continuación, el lavado con abundante agua produce la decoloración de las formas vegetativas, que se tiñen por último con safranina que funciona como colorante de contraste (Ragazzo *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2010).

Estas tinciones permitieron seleccionar entre todos los aislados a las bacterias del género *Bacillus*, que presentaron morfología de bacilos Gram + con endosporas.

No se encontró asociado a las esporas ningún cristal paraesporal teñido de azul, el cual tuvo que verse así por la capacidad que tiene el azul de Coomassie de teñir proteínas mediante el acoplamiento a ciertos aminoácidos básicos como arginina, tirosina, lisina e histidina (Simpson, 2003), por lo que se descartó la presencia de *B. thuringiensis*, ya que la aparición de este es una característica distintiva de la especie, la cual como indica Carreras (2009) y Vitelli y colaboradores (2010) permite separarla de otras especies cercanas filogenéticamente como *Bacillus cereus*.

Haciendo uso del carácter selectivo del agar PEMBA, y las tinciones diferenciales, en este estudio se logró el aislamiento de *B. cereus*. *B. thuringiensis* y *B. subtilis* no se alcanzaron aislar con éxito para ser identificadas.

6.3 Identificación bioquímica de los microorganismos aislados

De acuerdo al procedimiento de aislamiento utilizado, se obtuvieron 36 placas con crecimiento, de las cuales luego de los subcultivos sucesivos por rayado en el medio selectivo y la observación al microscopio, se reconocieron 7 cepas con las características más semejantes a las bacterias buscadas en este ensayo, las cuales fueron usadas para la identificación a nivel de especie.

Para esta distinción se utilizó el sistema API 50 CHB, que según Martínez (2008) es uno de los métodos más empleados para la identificación a nivel de especie. Cada una de las 7 muestras inoculadas en la galería API presentaron características específicas frente a la presencia de diferentes hidratos de carbono y después de un tiempo de incubación se dio el cambio de color debido a la fermentación (Córdoba, 2009).

El sistema usado brinda una serie de valores que para comprender su significado se explican a continuación; según apiwebTM (2003) un taxón puede ser una especie, un biotipo o un grupo de especies que no pueden ser diferenciadas por pruebas de la galería. Para identificar un organismo, los perfiles obtenidos son comparados con los perfiles de los taxones de la base de datos. Para cada perfil obtenido se calcula: Su proximidad relativa a los diferentes taxones de la base de datos (%id) y su proximidad al perfil más típico en cada taxón (Índice T). El taxón más típico es el que no tenga pruebas en contra de la identificación, en relación al porcentaje mostrado en la base de datos para el taxón en cuestión.

Según apiwebTM (2003) y Almuzara (2006) un resultado de “buena identificación” se da cuando el %id \geq 90.0 y T \geq 0.25, el cual se obtuvo en este caso para *P. lautus*, cuando el sistema indicó que el biocódigo obtenido correspondía a una "identificación aceptable en el género" o “buena identificación en el género”, quiere decir que se han seleccionado 2, 3 o 4 taxones pertenecientes al mismo género como resultado y que es necesario el uso de pruebas adicionales para su identificación, como en este caso lo fue el medio selectivo y la microscopia, lo que permitió identificar a *B. cereus*, y descartar la supuesta cepa de *B. mycoides*. Por último, un “perfil inaceptable”, se da si el número de selecciones propuestas es 0, todas las frecuencias brutas son inferiores a un valor umbral o el perfil se aleja de todos los taxones de la base de datos, este fue obtenido por 4 de las muestras, siendo dos de ellas *B. coagulans* y *B. firmus* sin porcentaje de identificación y las otras dos ni siquiera arrojaron algún taxón significativo.

Además, el perfil puede estar acompañado de pruebas en contra de la identificación, seguidas del porcentaje de positividad, es decir que la frecuencia de la reacción observada es $< 0,25$ (apiwebTM, 2003).

Según el estudio realizado por Córdoba (2009) las reacciones bioquímicas que más destacan en *B. cereus*, bacteria buscada en este estudio, son la fermentación de la glucosa, fructosa, ribosa, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, trehalosa, acetil glucosamina y Gluconato potásico.

Vitelli y colaboradores (2010) rescatan que el aislamiento de *B. thuringiensis* es una tarea difícil debido, fundamentalmente, a la baja proporción en que se encuentra ésta

especie en relación a otras especies del grupo *B. cereus* que comparten el mismo hábitat, como lo fue en este caso la bacteria *B. cereus*, la cual si se logró aislar, un caso similar pudo haber pasado con *B. subtilis* y por eso no fue encontrada durante este estudio

En cuanto a la microbiota aislada del tracto digestivo de la mosca de los establos Gomes y colaboradores (2007) comentan que es preciso estudiarla más detenidamente, procurando realizar aislamientos de moscas criadas en laboratorio para evaluar la influencia de esa microbiota sobre los procesos metabólicos.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El uso del agar selectivo PEMBA para el aislamiento de *B. cereus*, resultó muy efectivo y permitió un fácil reconocimiento a nivel macroscópico de esta especie. No así para *B. subtilis*, donde su morfología fue difícil de distinguir en este caso, por lo que se recomienda el uso de otro tipo de medio o pruebas para el aislamiento de *B. subtilis*.

El análisis microscópico de aislamientos por medio de tinciones diferenciales reflejó un resultado positivo, puesto que permitió la visualización de morfología tipo bacilos Gram+ con presencia de esporas y así permitió una selección de cepas hasta el nivel de género buscado, es decir, *Bacillus*.

El sistema de identificación bioquímica API 50 CHB permitió una identificación de las cepas seleccionadas, aunque se recomienda siempre que esté acompañado de pruebas confirmatorias.

Se recomienda realizar más estudios de aislamiento y de patogenicidad de bacterias aisladas a partir de *Stomoxys calcitrans*, para su mismo control y así poder alcanzar una opción de control biológico efectiva que permita disminuir el uso de insecticidas sintéticos contaminantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

Almuzara, M. N., De Mier, C., Rodríguez, C. R., Famiglietti, A. M. R., Vay, C. A. 2006. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*. 38(4): 197-201.

ApiwebTM V4.0. 2003. Identificación numérica. BioMérieux S. A.

Carmona, A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioagro*. 14 (1): 3-10.

Carrera, M. 2009. “Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner, a nivel de laboratorio”. Tesis Dr. Riobamba, EC. Escuela Superior Técnica de Chimborazo. 87 p.

Carreras, B. 2009. Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de cuba. *Fitosanidad*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. 13(2): 109-115.

Castañeda, L.; De La Torre, M.; Casas, S.; Islas, M. 2009. Regulación del inicio de la esporulación e histidina cinasas: un análisis comparativo entre *Bacillus subtilis* y el grupo *Bacillus cereus*. *Interciencia*. 34 (5):315-321.

Córdoba, M. 2009. Desarrollo de un medio de cultivo óptimo con diferentes fuentes de carbono, para *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, presentes en suelos que contienen hidrocarburos (TPH), provenientes de Petroamazonas S.A., ubicado en la provincia de Sucumbíos. Tesis Ing. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 103 p.

Cruz, C.; Martínez, S.; Vitela, I.; Ramos, M.; Quintero, M.T.; García, Z. 2000. Variación anual de la infestación por *Stomoxys calcitrans* (L) (Díptera: Muscidae) en tres establos lecheros de Aguas Calientes, México. *Técnica Pecuaria en México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, MEX. 38(2): 135-142.

Domínguez, M.; Domínguez, M. 2009. El *Bacillus anthracis* como agresivo. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XVI. Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo. 493-631pp.

- Gomes, B.; Moreira, M.; Bittencourt, A. 2007. Aerobic bacterial microbiota in *Stomoxys calcitrans*: Preliminary studies in Brazil*. Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria. 16 (4): 193-197.
- Gomes, B.; Moreira, M.; Bittencourt, A. 2008. Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. Ciência Rural. Santa María 38 (9): 2654-2657.
- Gutiérrez, J.G.; Gutiérrez, O.; Nieto, D.; Téliz, D.; Zavaleta, E.; Delgadillo, F.; Vaquera, H. 2003. Evaluación *in vitro* de agentes biológicos y físicos para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Ciudad Obregón, MEX. 21 (2): 199-206.
- Handelsman, J.; Raffel, S.; Mester, H.; Wunderlich, L.; Grau, C. 1990. Biological Control of Damping-Off of Alfalfa Seedlings with *Bacillus cereus* UW85. Applied and Environmental Microbiology. 56 (3): 713-718.
- Hiroiuki, F.; Arantes, C. 2010. Populational outbreak of the stable fly *Stomoxys calcitrans*, Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) at the Municipality of Planalto, SP. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. 3 (1): 145-159.
- Lagunas, J.; Zavaleta, E.; Osada, S.; Aranda, S.; Luna, I.; Vaquera, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 19 (1): 57-65.
- Martínez, J.F. 2008. Desarrollo de métodos rápidos para el control del *Bacillus cereus* en alimentos. Tesis Dr. Valencia, Es. Universidad de Valencia. 212 p.
- Marquéz, F.J. 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis Lic. Valdivia, CHL. Universidad Austral de Chile. 74 p.
- Masmeatathip, R.; Ketavan, C.; Duvallet, G. 2006. Morphological Studies of *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae) in Central Thailand. Kasetsart Journal. (Natural Science) 40 (4): 872 - 881.

- Molina, M.P. 2008. Efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en cuyes (*Cavia porcellus*) de engorde. Tesis Ing. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 139 p.
- Oxoid. 2001. *Bacillus cereus* selective agar base. Disponible en <<http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0617&org=9&c=UK&lang=EN>> (17 noviembre, 2011).
- Paucar, A. 2011. Optimización de la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo para la producción de un bioacaricida a partir de *Bacillus thuringiensis* en un bioreactor discontinuo a escala piloto. Tesis Ing. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 81 p.
- Ragazzo, J.A.; Robles, A.; Lomelí, L.; Luna, G.; Calderón, M. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. Revista Chapingo Serie Horticultura. 17(1): 5-11.
- Reinoso, Y.; Casadesús, L.; García, A.; Gutiérrez, J.; Álvarez, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Fitosanidad. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. 10 (3): 187-191.
- Rodrigues, A.; Pinheiro, V.; Bittencourt, A. 2010. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* sobre estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*. Ciência Rural. Santa María. 40 (8): 1802-1807.
- Rojas, T.; Calvo, B.; Porras, S.; Chavarría, A. 2003. Problemática de la mosca del establo, *Stomoxys calcitrans*, originada por los desechos del cultivo de la piña (*Ananas comosus*) en la Región Huetar Atlántica de Costa Rica. I Parte. Boletín de parasitología. 4 (3): 3-4.
- Ruíz, I.; Ibañez, I.; Padilla, M.A.; Carnero, A.; Caballero, P. 2004. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Bol. San. Veg. Plagas. 30: 703-712.
- Salas, C.; Larraín, P. 2008. Moscas asociadas a la producción pecuaria. INIA Tierra Adentro. Julio-Agosto: 45-47.

- SFE. 2006. Procedimientos en el manejo de desechos orgánicos para el control de *Stomoxys calcitrans* L. Actualidad Fitosanitaria. 28: 2-3.
- SFE y SENASA. s.f. Plan de acción conjunto SFE/SENASA para el combate de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) (L.). Costa Rica. 18 p.
- Simpson, R. 2003. Protein and Proteomics. A laboratory manual. CSHL Press. 190pp.
- Skovgard, H., Steenberg, T. 2005. Actividad de Parasitoides Pupales de la Mosca del Establo *Stomoxys calcitrans* y prevalencia de hongos entomopatógenos en la Mosca del Establo y en Mosca domestica en Dinamarca. Boletín de Parasitología. 6 (2): 1-2.
- Sosa, M., Castillo, C., Scorza, J. 2004. Actividad inhibitoria de cepas del género *Bacillus* spp. contra dermatofitos. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 24 (1-2): 59-64.
- Universidad De Buenos Aires. 2010. Microbiología e Inmunología. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 75 p.
- Vázquez, C., Martín, A., Silóniz, I., Serrano, S. 2010. Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3 (5): 15-38.
- Venegas, E.; Ciampi, L.; Collado, L.; Costa, M.; Fuentes, R.; Nissen, J.; Schobitz, R.; Schoebitz, M. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *Bacillus Cohn* antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium Link.* en cala. Agro Sur. 33(2): 1-12.
- Vilas, G.T.; Peruca, A.; Arantes, O. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 53: 673–687.
- Villegas, N. 2004. Reconocimiento de especies del Complejo Chisa (Coleóptera: Melolonthidae) asociados al cultivo de cebolla y pasto en la localidad de la Florida, Risaralda. Tesis Ing. Caldas, COL. Universidad de Caldas. 109 p.
- Vitelli, J., Gajardob, R., Lagea, L., Fajardoa, Y., Dortab, B., Rodríguez, V. 2010. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la region nororiental de Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 30:90-96

9. ANEXOS

9.1 Medios de cultivo

Preparación de 1 Litro de medio LB

15g Agar bacteriológico

10 ml NaCl

5g Extracto levadura

10g Peptona

pH: 7, diluir en agua destilada hasta 1 litro y autoclavar.

Preparación de 1/2 Litro de medio Agar PEMBA

20,5 g de Agar PEMBA

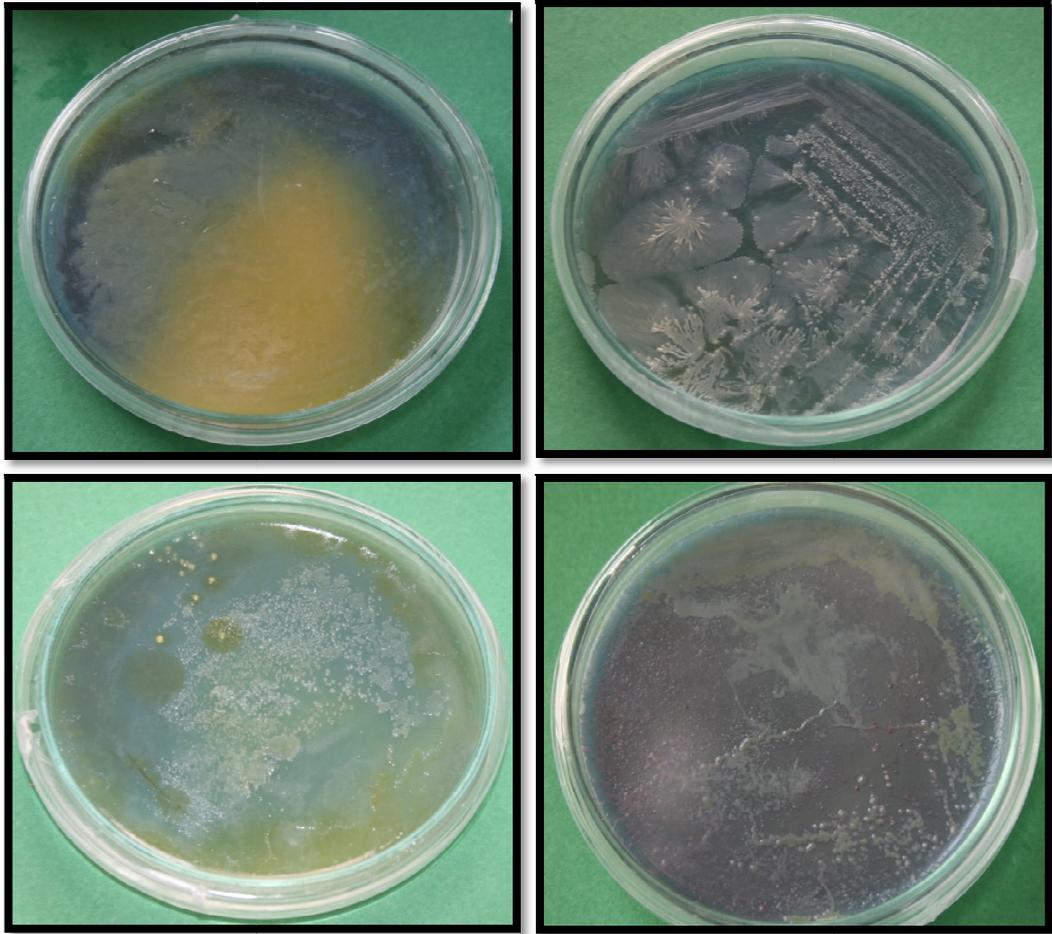
1 vial de suplemento polymyxin B

25 mL emulsión yema de huevo

pH: 7.2, diluir el Agar en agua destilada hasta 475 ml y autoclavar.

Agregar a 50 °C el suplemento y la emulsión yema de huevo y agitar.

9.2 Aislamientos en medio selectivo descartados



9.3 Galería API recién inoculada



9.4 Hoja de Información

Información del estudiante:

Nombre: Yarenis Chinchilla Ballesteros.

Cédula o No. Pasaporte: 206550672.

Carné ITCR: 200839201.

Dirección de su residencia en época lectiva: Barrio Asís, 325 m sur de las Ruinas de Cartago.

Dirección de su residencia en época no lectiva: 400 m sur, 150 m este y 25 norte del salón comunal de Pital.

Teléfono en época lectiva: 83290898.

Teléfono época no lectiva: 83290898.

Email: ychinch89@gmail.com

Fax: ---

Información del Proyecto:

Nombre del Proyecto: “Aislamiento e identificación bioquímica y microscópica de bacterias representativas del género *Bacillus* con potencial insecticida contra *Stomoxys calcitrans*”.

Profesor Asesor: William Rivera

Horario de trabajo del estudiante: 8am – 6pm

Información de la Empresa:

Nombre: Fundación Proagroin

Zona: Pital, San Carlos

Dirección: 500 m noreste de la Escuela Clemente Marín, Cuatro Esquinas de Pital, San Carlos.

Teléfono: (506) 2473-3496/(506) 2473-3800

Fax: (506) 2473-3534

Apartado: 38-4477.

Actividad Principal: Agroindustrial-Comercial