

**PRODUCCION DE UN INSECTICIDA BIOLÓGICO A BASE DE
AISLAMIENTOS DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* PARA
EL CONTROL DE “CHISAS” O “GUSANO MOJOJOY” (Coleoptera:
Scarabaeoidea, Melolonthidae).**



ERIKA MARIA DUEÑAS SUAREZ

**CORPORACION UNIVERSITARIA AUTONOMA DE OCCIDENTE
DIVISION CIENCIAS BASICAS
ADMINISTRACION DEL MEDIO AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS
NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2003**

PRODUCCIÓN DE UN INSECTICIDA BIOLÓGICO A BASE DE AISLAMIENTOS DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* PARA EL CONTROL DE “CHISAS” O “GUSANO MOJOJOY” (Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae).

ERIKA MARIA DUEÑAS SUAREZ

Proyecto de grado para optar al título de Administrador Ambiental y de los Recursos Naturales

**Asesor
MARCELA NAVARRETE PEÑUELA
Biólogo**

**Asesor
LUIS FERNANDO VALLEJO ESPINOSA
Biólogo**

**CORPORACION UNIVERSITARIA AUTONOMA DE OCCIDENTE
DIVISION DE CIENCIAS BASICAS
ADMINISTRACION DEL MEDIO AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS
NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2003**

Nota de aceptación:

Trabajo aprobado por el comité de grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Corporación Universitaria autónoma de Occidente para optar al título de Administrador Ambiental y de los recursos Naturales.

MARTHA LUCIA PALACIOS PEÑARANDA

JURADO

Santiago de Cali, Noviembre 29 del 2002

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes personas e institución, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido lograr.

Dr. Luis Fernando Vallejo Espinosa, Asesor de Proyecto de Grado.

Dra. Elizabeth Muñoz, Director del Plan de Administración del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales.

Corporación Universitaria Autónoma de Occidente, Facultad de Administración del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	8
INTRODUCCION	10
1. ANTECEDENTES	13
2. JUSTIFICACION	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
4. MARCO REFERENCIAL	22

5.	MARCO TEORICO	26
5.1	TAXONOMIA DEL INSECTO BLANCO	26
5.2	CICLO DE VIDA PHYLLOPHAGA spp	26
5.3	DINAMICA DE POBLACION DE LA Phyllophaga spp.	33
6.	METODOLOGIA	35
7.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	40
8.	PRESUPUESTO	41
9.	ETAPAS PARA EL DESARROLLO DE UN BIOINSECTICIDA A BASE DE AISLAMIENTOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	43
9.1	Desarrollo de los inóculos de producción.	43
9.2	Preparación del medio de cultivo	44
9.3	Fermentador	44

9.4 Realización del bioensayo de superficie	45
10. CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48

RESUMEN

Este trabajo pretende la producción de un bioinsecticida, cuyo proceso de elaboración a partir de *Bacillus thuringiensis* pretende la optimización de la producción de esporas, de biomasa y la toxicidad de ésta contra el insecto deseado (larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard).

Para la producción de un insecticida biológico a partir de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, se realizará el seguimiento de la producción de biomasa y esporas, mediante técnicas de espectrofotometría y plateo en el medio de cultivo de Luria Bertani (LB), respectivamente. Además se medirá la toxicidad del producto final contra larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (*Coleoptera, Scarabaeoidea: Melolonthidae*) por medio de un bioensayo de superficie, el cual se realizará según la técnica de Padidam (1992) con las modificaciones hechas por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB, 1996); además de hacer las variaciones respectivas en cuanto a la dieta que se le suministrará a las “chisas” o “gusano mojoyoy”, y la forma como se suministrará la dosis de la concentración de ingrediente activo a las larvas de tercer instar de esta especie.

Este trabajo permitirá la obtención de un medio de cultivo que a nivel de fermentador de un litro y bajo las condiciones óptimas de la fermentación, producirá unos resultados en cuanto a la cantidad de esporas y biomasa, y esta última, se confía que tenga la ventaja de ser muy tóxica para larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard.

Como resultado final se espera obtener una mortalidad entre 70% y 100% del ingrediente activo del insecticida biológico.

INTRODUCCION

El uso de insecticidas microbianos se inicia con el descubrimiento *Bacillus thuringiensis*, el primer insecticida formulado sobre microorganismos, registrado en Estados Unidos hace más de 50 años (Aguilar, 1999).

En 1901 en Japón, *Bacillus Thuringiensis* fue aislado por primera vez de larvas enfermas del gusano de seda (*Bombix mori*). Luego en 1911 se nombró como *Bacillus Thuringiensis* (Swadener, 1994).

En Estados Unidos los productos disponibles de *Bacillus thuringiensis* abarca cinco variedades,; *Kurstaki* y *morrisoni*, que causan enfermedad en orugas de la polilla y de la mariposa; *israelensis* que controla mosquitos y larvas de moscas; *aizawai* que controla a las orugas de la polilla de la cera; y *tenebrionis*, también llamados variedad San Diego, que controla larvas de escarabajos (*Tenebrionidae*) (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS UNIDOS. Servicio Nacional de Estadística agrícola . 1994).

Las propiedades entomopatógenas de esta bacteria están dadas por la capacidad de producir delta endotoxinas las cuales se almacenan en forma de inclusiones cristalinas junto con la espora (Aguilar, 1999). Este cristal es el componente tóxico de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

La delta endotoxina paraliza el tracto digestivo de las larvas inhibiendo el peristaltismo, el insecto pronto para de alimentarse y muere de hambre (Willie B., 1993).

Los bioinsecticidas entomopatogenos como *Bacillus thuringiensis* ofrecen una alternativa importante para el control de plagas en substitución de los insecticidas químicos, ya que tienen las siguientes características: no afectan al hombre ni a otros mamíferos, no generan resistencia, son adaptables a muchos tipos de formulación, presenta probabilidad de hacer formulaciones más potentes y a un menor costo, alta probabilidad de seleccionar cepas y desarrollar ingeniería genética, no afecta a vegetales, son biodegradables en el medio ambiente, implican menos riesgo de operación que los insecticidas químicos, por sus características y seguridad pueden ser desarrollados y registrados rápidamente, y por último su alta especificidad lo hace altamente deseable para un manejo integrado de plagas (Aguilar, 1999).

Como resultado de la búsqueda de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* en Colombia, se descubrió *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. Esta subespecie es una de las posibles candidatas para ser industrializada y comercializada en el control biológico de insectos plaga de importancia en salud pública. La proteína de 94KDa producida por *Bacillus thuringiensis* presenta una toxicidad individual contra larvas de dípteros más alta que las producidas por otras cepas hasta ahora descritas (Orduz, 1996).

El proceso de elaboración de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* pretende la optimización de la producción de esporas, de biomasa y la toxicidad de ésta contra el insecto deseado (Couch y Ross, 1980; Kang *et al.* 1992; Avignone-

Rossa y Mignone 1993). Tanto la producción de esporas, como la de biomasa y la toxicidad, están afectados por el medio de cultivo como por las condiciones y métodos de producción (Dulmage 1989; Mummigati y Ranghuathan 1990; Salama *et al.* 1983; Kang *et al.* 1993; Avignone-Rossa *et al.* 1992).

Para la producción de un insecticida biológico a partir de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, se realizará el seguimiento de la producción de biomasa y esporas, mediante técnicas de espectrofotometría y plateo en el medio de cultivo de Luria Bertani (LB), respectivamente. Además se medirá la toxicidad del producto final contra larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (*Coleoptera, Scarabaeoidea: Melolonthidae*) por medio de un bioensayo de superficie, el cual se realizará según la técnica de Padidam (1992) con las modificaciones hechas por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB, 1996); además de hacer las variaciones respectivas en cuanto a la dieta que se le suministrará a las “chisas” o “gusano mojoyoy”, y la forma como se suministrará la dosis de la concentración de ingrediente activo a las larvas de tercer instar de esta especie.

Este trabajo permitirá la obtención de un medio de cultivo que a nivel de fermentador de un litro y bajo las condiciones óptimas de la fermentación, producirá unos resultados en cuanto a la cantidad de esporas y biomasa, y esta última, se confía que tenga la ventaja de ser muy tóxica para larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard.

Como resultado final se espera obtener una mortalidad entre 70% y 100% del ingrediente activo del insecticida biológico.

1. ANTECEDENTES

En los territorios continentales comprendidos desde México hasta Argentina y Chile se han registrado cerca de 300 géneros de coleópteros de la familia Melolonthidae cuyos adultos se alimentan con tejidos o productos vegetales. Aunque se desconocen los hábitos alimenticios de las larvas en un 70% de esta familia, se estima que cuando menos 2,500 especies de ellas se desarrollan en el suelo consumiendo materia orgánica en distintas etapas de humificación y los tejidos subterráneos de las especies vegetales incluidas en 80 familias. Cuando las poblaciones de larvas de Melolonthidae edafícolas se encuentran en equilibrio, el número de especies representadas en un área pequeña es alto, mientras que la densidad de larvas es proporcionalmente baja, su actividad estimula el crecimiento y la renovación de raíces y tallos subterráneos, al mismo tiempo que favorece la aireación y remoción del suelo, incorporan una cantidad considerable de compuestos nitrogenados asimilables y mantiene o incrementan las poblaciones de microorganismos celulolíticos. Al ocurrir un desequilibrio, disminuye la diversidad y se acentúa el predominio de las especies rizófagas, dando lugar a densidades elevadas de larvas que constituyen uno de los problemas agrícolas más comunes en América, donde según las regiones se les conoce con los nombres populares de “White grubs”, “nixticuilu”, “gallinas ciegas”, “jobotos”, “chisas”, “mojojeyes”, “pao de galinha”, “torresmo”, “pololos”, “isocas” o “gusanos blancos”. En México, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Brasil, Uruguay y Chile se han registrado 170 especies de 42 géneros establecidas en terrenos cultivados (Morón, Aragón y Salvador Hernández, 1994).

En trabajos realizados por King (1984), King y Saunders (1984) y Coto (1993) se

definen 17 especies de Phyllophaga con mayor frecuencia que ocasionan problemas agrícolas en América Latina. La proporción entre las especies registradas para el área y el número de especies dañinas es de 110:17, o sea de un 15.4%. Por otra parte, sólo se conocen las larvas de un 10% de las especies de Phyllophaga y una cifra parecida sobre sus ciclos vitales y los hábitos de los adultos.

Con las cifras anteriormente indicadas, se puede inferir que el complejo de especies de Phyllophaga está "invirtiendo" solamente entre 10 y 17% de su potencial adaptativo. Por su parte, las 51 especies dañinas registradas desde Estados Unidos hasta Panamá representan a seis de los ocho sub-géneros reconocidos y, únicamente los miembros de *Phyllophaga Listrochelus* y *Phyllophaga Chirodines* no han sido relacionadas con cultivos anuales (King, 1984).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre las plagas más importantes que atacan los granos básicos en las zonas semi-áridas de la región centroamericana y, en diferentes etapas fenológicas. Entre estas plagas se encuentra la chisa o gallina ciega, *Phyllophaga* spp. como la plaga más importante del suelo en Centroamérica, porque ataca plantas de valor agrícola y forestal (Andrews y Quesada, 1989).

Según Metcalf y Flint (1988), Mancía y otros (1990), las larvas de *Phyllophaga* atacan las semillas desde que comienzan a germinar; posteriormente se alimentan de las raíces (el ataque puede prolongarse de 20 a 30 días como máximo). Las áreas afectadas se observa mala germinación, plantas con poco desarrollo y marchitas. Las plantas atacadas detienen su desarrollo, ya que el daño en las

raíces reduce la capacidad para absorber nutrientes. Las plantas presentan una coloración amarillenta y en los días soleados mueren. En campos severamente afectados puede ocurrir pérdidas totales entre 7 y 10 días (Escobar, 1984).

Estudios recientes en América Central indican que la “gallina ciega” constituye una de las plagas principales que atacan los cultivos alimenticios. Aunque los gusanos tienen un amplio rango hospedero, incluyendo tanto cultivos como malezas, el daño es más frecuente y de importancia económica en maíz, sorgo y frijol.

La distribución de *Phyllophaga* es irregular, por lo que los agricultores casi nunca consideran justificable tomar medidas de control. En maíz y sorgo tierno, los cuales son hospederos particularmente susceptibles y preferidos, los ataques causan marchitez, esta se caracteriza por un color morado que se inicia en las hojas, seguido de la muerte de las plantas pequeñas y, con una reducción en el vigor o debilitamiento de las mas grandes. El daño al café, aunque mucho menos evidente, ha recibido mucha atención en toda Centroamérica (Morales, 1966). Algunas especies centroamericanas tienen un ciclo de vida de uno o dos años de duración (Reinhard, 1940; Ritcher, 1940). En este sentido, Thiem (en Ritcher, 1958) trabajando en Europa encontró que la longitud del ciclo está determinado por la tasa del desarrollo larval temprano. Mientras que para Centroamérica, se detectó una relación entre las temperaturas promedio y el ciclo de vida.

Mientras que los ciclos de dos años pueden ser una adaptación al corto período de crecimiento, seis meses, las especies con un ciclo de un año, son capaces de completar el tercer estadio larval durante este período.

Además de las lluvias esporádicas, las regiones central y pacífica de los países del

norte de Centroamérica, son frecuentemente afectadas por un período de sequía durante julio o agosto, conocido localmente como "canícula". Bajo estas condiciones, un largo período de pre-oviposición y una pausa durante la segunda fase larval pudieron haberse convertido en mecanismos de supervivencia de *Phyllophaga* (de dos años) a estas regiones (Ayala Morán, 1997).

Dentro del orden Coleoptera, tradicionalmente considerados como el grupo de seres vivos más diversificados en el ambiente terrestre o aéreo, encontramos que se han citado 120 géneros y 537 especies de la superfamilia Scarabaeoidea para Colombia (catálogo de Blackwelder, 1994). Esta cifra requiere una actualización, puesto que la labor de los taxónomos en Coleoptera ha incrementado cuando menos en un 20% los registros nacionales y ha adicionado un 10% de nuevas taxa en los últimos 40 años (SOCOLEN, 1995).

Colombia debido a su topografía y situación geográfica, reúne una proporción muy importante de la diversidad de escarabajos del extremo norte de América del Sur (Morón, 1984), debido a las características ecológicas derivadas de la extensión y orientación de las principales cordilleras, que pueden actuar como corredores o barreras para la dispersión de los escarabajos.

Las diferentes formas adultas de los insectos coleópteros de la familia Melolonthidae (Sensu Endrodi, 1966, 1985) son conocidas popularmente en Colombia con el nombre de "cucarrones marceños", debido a que emergen como tales en esta época del año. Muchos son plagas importantes que atacan el follaje de numerosas plantas frutales, forrajeras y ornamentales. Según Morón (1995), aunque estas cifras no reflejen una idea real de la proporción de la diversidad de las especies Colombianas, por lo menos pueden hacer una aproximación de la

representatividad de cada uno de los diferentes grupos, en especial por el gran número de nuevas publicaciones basadas en descripciones del material Colombiano. De otro lado, de las especies citadas hasta 1994, el 68% corresponde a grupos cuyas larvas y adultos tienen hábitos fitófagos y de éstas, un 60% se desarrollan en el suelo, por lo que se cree que el complejo chisa en Colombia está conformado por un mínimo de 225 especies que habitan todo tipo de suelo. Dentro de este complejo es necesario diferenciar las especies cuyas larvas sólo se alimentan de raíces (rizófagas), de las que consumen humus o restos vegetales (saprófagas) y las que pueden tener hábitos facultativos.

Dos localidades próximas en el Valle del Cauca y Cauca; en donde un muestreo de escarabajos rizófagos practicado en la localidad de Pance (Valle) ubicada a 1.400 m.s.n.m, con la formación bosque húmedo subtropical, 1.600 m.m de precipitación, entorno boscoso permitió reunir durante 17 meses: 18.090 ejemplares de Scarabaeoidea pertenecientes a 60 especies (Pardo, 1994). Los muestreos en la rizósfera de yuca no aportaron larvas rizófagas y al consultar la opinión de los agricultores sobre síntomas de marchitez, muerte de plántulas, etc por chisas, la respuesta fue negativa y se consideró que ese problema no lo tenían los cultivos de la región. En la misma Cordillera Occidental a pocas horas se localiza San Antonio (Cauca), un sitio con gran tradición en la producción de yuca para rayandería (almidones), en un transecto de 1.100-1.400 m.s.n.m correspondiente a bosque seco tropical y bosque húmedo premontano, con 1.200 m.m al año de precipitación y entorno ausente de cobertura arbórea, con muy poca extensión silvestre, se logró coleccionar, por medio de trampas de luz instaladas durante 18 meses, 34.857 ejemplares de Scarabaeoidea pertenecientes a 29 especies de escarabajos, de los cuales cinco representaron poblaciones que abarcaron la mayoría de lo colectado (Pardo, 1994).

2. JUSTIFICACION

Las larvas de coleópteros de la familia Melolonthidae (*sensu* Endrödi, 1996); (Morón, 1984); (Morón y col.,1997), conocidas popularmente en Colombia con el nombre de “chisas” o “gusanos mojoy”, han despertado el interés de autoridades fitosanitarias, debido al daño que causan a grandes extensiones agrícolas, no solo de Colombia, sino del mundo entero. Su carácter subterráneo implica entre otros, hábitos alimenticios que incluyen raíces, tallos, bulbos y/o tubérculos de plantas, hojarasca, humus orgánico del suelo y troncos y tocones de árboles en descomposición, cuyas cavidades están llenas de detritus. Los adultos conocidos por los agricultores por el nombre de “cucarrones marceños” o “cuaresmeros”, se alimentan de las hojas y las flores de árboles frutales y cultivos ornamentales para proveerse de energía durante su vida adulta (Vallejo, 1995).

En Cajamarca, municipio localizado sobre la cordillera central de Colombia a 38 Km de la ciudad de Ibagué en el departamento del Tolima; región hortícola por excelencia, se viene observando un incremento en el daño de chisas (larvas de coleópteros) al cultivo de arracacha, llegando a registrarse, al momento de la cosecha, hasta un 40% de pérdidas, sin contabilizar los costos de resiembra y de control químico (ICA - SINTAP, 1990).

El uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes, el mal empleo de métodos de control y de rotación, han permitido el establecimiento de las chisas como plaga de importancia primaria para los cultivos de arracacha en el municipio de Cajamarca.

El ataque se inicia desde la siembra cuando las larvas dañan el colino produciendo retraso en el desarrollo y aumento de los costos por resiembra; cuando la raíz de absorción se convierte en raíz de acumulación, el daño impide la formación de arracachas comerciales, por esto, cuando el cultivo está próximo a cosecha, el daño de la chisa puede ocasionar la pérdida total del producto destinado al mercado (ICA - SINTAP, 1990). Provocando pérdidas estimadas en 15.000 t/año de la producción, equivalentes a \$7.200 millones/año (1994). El control de esta plaga se ha llevado a cabo mediante el uso de insecticidas de categoría toxicológica uno, cuyas dosis según estudios realizados por el laboratorio de control biológico de Corpoica, CI Tibaitatá, representan una descarga negativa en el ambiente de 16 t/año de ingrediente activo, que pone en riesgo de intoxicación a 32.000 personas del municipio de Cajamarca. Los costos destinados a insecticidas para el control de la chisa representan un 22% de los costos totales de producción/ha de arracacha. (Corpoica Creced Tolima, 1994).

Por otro lado, con el uso de insecticidas de origen biológico se contribuye al mejoramiento ambiental ya que se reduce la aplicación de insecticidas químicos. El mejoramiento ambiental se logra por la reducción del volumen de ingrediente activo de insecticidas vertido al ambiente por año, disminución de la presión de la población de la plaga, del riesgo de intoxicación, e incremento del control natural.

Consecuentemente, los genéricamente llamados bioinsecticidas son una alternativa prometedora si se les compara con los plagicidas químicos, ya que a diferencia de éstos, los bioplagicidas son altamente específicos (Deacon 1983), el desarrollo de resistencia por parte de los insectos a estos productos es reducido (Whalon y McGaughey 1993; Siegel y Shadduck, 1990) y son inocuos para el medio ambiente, los animales y el hombre (Siegel y Shadduck 1990; Aronson et. Al., 1993).

Entre los bioinsecticidas se destaca la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) (Eubacteriales: Bacillaceae), cuyos productos representan del 90% al 95% del mercado global de bioinsecticidas (Feitelson *et al.*, 1992). Las proteínas tóxicas de *Bt* se emplean comercialmente hace más de cuarenta años; representando hoy 98% de los bioinsecticidas. Esta preferencia es debida principalmente a su amplio rango de actividad, a la facilidad de producción y a la rapidez en el control de la plaga (Deacon, 1983); Por lo tanto sus efectos son rápidos, fuertes y su persistencia escasa. Además numerosos estudios han demostrado la ausencia de riesgo para los mamíferos y para el consumidor (Le Cirad, 2001).

Por consiguiente, en Colombia, la utilización masiva de los bioinsecticidas, tal como el *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), debe estar apoyada por productos que puedan competir en precio y disponibilidad con los insecticidas químicos (Orduz y Vallejo L. F., 1996), igualmente las normas que se establecen en un mercado cada vez más abierto y competitivo exigen que los productos agrícolas tengan el sello de natural (sello verde), situaciones en la cual los insecticidas biológicos encajan perfectamente.

Posteriormente, las investigaciones realizadas para producir *Bt* se han encaminado a la búsqueda de sustratos económicos y de alta disponibilidad (Burgess 1982; Vandekar y Dulmage, 1982), al estudio de diferentes métodos de producción (Avignone - Rossa y Mignone 1993; Kang *et al.*, 1992, 1993) y de las variables de operación que afectan el desarrollo de *Bt* (Avignone - Rossa *et al.* 1992; Foda *et al.*, 1985).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Producir un insecticida biológico a base de *Bacillus thuringiensis* berliner (Bt) (Eubacteriales: Bacillaceae) en laboratorio, para el control de “chisas” o “gusano mojoyoy” (*Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae*).

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar el escalado para la producción de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* hasta un volumen de 1100L.
- Analizar la cinética de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* en las diferentes escalas de trabajo, cuantificando sus velocidades de crecimiento y los rendimientos.
- Evaluar el comportamiento de las diferentes variables del proceso (Biomasa, concentración de esporas, concentración de ingrediente activo).
- Evaluar la calidad del producto por medio de electroforesis de proteínas, y bioensayos.

4. MARCO REFERENCIAL

Se denomina plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal (INE; México, D.F., 1996).

La llamada “Revolución Verde” pretendió dar al mundo una alternativa de mayor producción de alimentos para acabar con el flagelo del hambre. Sin embargo, el costo social y ambiental resultante de la aplicación de este paquete tecnológico ha sido altísimo, entre otras razones, porque favoreció el desarrollo de los monocultivos, con el efecto del uso creciente de agroquímicos. La cosecha de este modelo ha sido la destrucción y contaminación de los ecosistemas, a la vez que se han agudizado las condiciones de hambre y pobreza en amplios sectores de la población.

Pese a lo anterior, este tipo de producción agrícola se sigue aplicando, por varias razones. La primera de ellas es económica. En efecto, el comercio mundial de estos productos es un gran negocio para la industria química, radicada fundamentalmente en Europa, Estados Unidos y Japón. A ella se suman, la industria de maquinaria agrícola, la industria de la biotecnología y otras cuyas ganancias dependen de la continuación de este modelo de agricultura (INE; México, D.F., 1996).

Por otro lado, en América Latina no existe una adecuada información sobre los impactos del control químico, ni programas de educación que muestren los efectos negativos que pueden tener estos venenos sobre la salud de agricultores, sobre los consumidores de productos tratados con los mismos y menos aún, sobre los suelos, flora, y fauna.

Así mismo, tampoco se impulsa el desarrollo de técnicas alternativas, ecológicamente sustentables y económicamente viables, que faciliten la apropiación de las mismas por parte de los agricultores que se ven atados a estas prácticas tradicionales con controles químicos.

A lo anterior se suma la falta de decisión política por parte de los gobiernos para promover un modelo alternativo de agricultura y a su vez para disminuir la disponibilidad de plaguicidas en el mercado e imponer regulaciones estrictas a la importación, producción y uso de los productos; dificultando así, la innovación y el desarrollo de tecnologías ecológicas competitivas (Carrere, 1995).

Los plaguicidas tienen la capacidad inherente de provocar efectos adversos en los seres vivos, de dañar su estructura o funciones, y de provocar su muerte. Su toxicidad depende, entre otros aspectos, de:

- a) Factores (tales como absorción, distribución, almacenamiento, activación, detoxificación) que influyen en la reacción de su forma tóxica final con el sitio “blanco” (ya sea molécula, célula, tejido, órgano o sistema).
- b) Reacción (reversible o irreversible) con los sitios blanco.
- c) Consecuencias bioquímicas o fisiológicas.
- d) Expresión clínica de su toxicidad (efectos agudos y crónicos).

Tales efectos están en función, además, de la magnitud y duración de la exposición al plaguicida, así como de su vía de ingreso al organismo (oral, dérmica, o inhalación). En teoría, los organismos son capaces de tolerar pequeñas dosis de los plaguicidas gracias a la existencia de mecanismos de homeostasis o compensación fisiológica, que incluyen la detoxificación metabólica, la adaptación celular y la reparación. Otros factores que influyen también en la toxicidad de los plaguicidas, son la edad, el sexo, el estado nutricional y de salud de los individuos expuestos (INE; México, D.F., 1996).

Cuando los plaguicidas son empleados a cielo abierto, su difusión en los distintos medios (aire, agua, suelo) y la contaminación de fuentes de alimento para los organismos silvestres, producen efectos adversos que afectan a poblaciones enteras y ponen en riesgo la supervivencia de las especies en peligro de extinción, dañando también a organismos depredadores y polinizadores, entre otros. Entre los efectos más notables se encuentran los que alteran la capacidad reproductiva de los organismos expuestos y los que ocasionan la muerte (INE; México, D.F., 1996).

Se llama “control biológico” a la acción de parásitos depredadores o patógenos que mantienen la densidad de la población de un organismo plaga en un promedio menor del que ocurriría en su ausencia (DeBach, 1964). Como ha sido practicado, el control biológico puede ser autosostenido y se diferencia de otras formas de control porque actúa dependiendo de la densidad de la población de plagas. De esta manera, los enemigos naturales aumentan en intensidad y destruyen una gran parte de la población de plagas, en la medida que ésta aumenta en densidad y viceversa (DeBach y Rosen, 1991).

El control biológico de plagas realizado por la acción de patógenos como son virus, bacterias y hongos, generalmente matan a sus hospederos. Los más conocidos son los virus y las bacterias por su relativa facilidad de reproducción y, comparado con los hongos, por ser relativamente menos dependientes de las condiciones ambientales (humedad, temperatura) (Nicholls y Altieri, 1994).

El control microbiológico aplicado o artificial, tiene dos orientaciones: el “control temporal” o de “corto término” en el que se logra destruir una sola generación de la plaga, y el “control permanente” o de “largo término” que se obtiene al introducir al ecosistema un patógeno con la capacidad de establecerse y mantenerse infectivo por mucho tiempo (Nicholls y Altieri, 1994).

El control biológico, ya sea por medio de la importación, incremento y/o conservación de los enemigos naturales, puede proveer una regulación de plagas a largo plazo, asumiendo que se dé un apropiado manejo cultural de los agroecosistemas (descartando prácticas agrícolas destructivas e incrementando la diversificación de los sistemas de cultivo), garantizando así un ambiente apropiado para incrementar la abundancia y la eficacia de depredadores potencialmente autoperpetuante, que garantice un control a bajo costo y con un mínimo o inexistente impacto ambiental (Flint y Roberts, 1989).

5. MARCO TEORICO

5.1 TAXONOMIA DEL INSECTO BLANCO

GRUPO:	Coleoptera.
SUPERFAMILIA:	Scarabaeoidea.
FAMILIA:	Melolonthidae.
GENERO:	Phyllophaga Harris, 1827.
ESPECIE:	<i>Phyllophaga obsoleta</i> Blanchard.

5.2 CICLO DE VIDA PHYLLOPHAGA spp

5.2.1 **ETAPA DE HUEVO.** El huevo recientemente depositado es blanco, opaco, alargado y de aproximadamente 2.5 mm de ancho. Después de siete días, los huevos fértiles toman una forma ovalada, casi esférica y aumenta de tamaño hasta cerca de los 3 mm en su eje más ancho y se vuelven blanco-traslúcido, casi perlado. Los contenidos del huevo se mantienen bajo presión. Los huevos rebotan cuando caen. Los huevos son depositados individualmente, de 5-15 cm de profundidad, dependiendo de las características del suelo. Generalmente, son depositados muy cerca unos de los otros; cada uno es cubierto por partículas de suelo, las cuales se unen para formar un nido. Después de una oviposición inicial de unos 10-20 huevos, que la hembra deposita durante un período de 2 a 4 días, se requiere que el segundo grupo de

huevos, haya madurado en los ovarios, para continuar depositando más huevos. Este proceso requiere de alimentación regular de parte de las hembras. Es probable que el desarrollo de los huevos dependa de la cantidad y calidad de la comida ingerida.

El período de pre-oviposición de las hembras adultas es de 1-2 semanas, pudiendo extenderse por más tiempo. El período de oviposición varía entre los 50 – 100 días y entre 0-140 huevos. Se ha detectado la preferencia de las hembras por poner los huevos en suelos ricos en humus y bajo gramíneas (King, 1994).

5.2.2 ETAPA LARVAL

- Ciclo de vida de un (1) año (*Phyllophaga obsoleta*).

Las larvas aparecen después de 12-14 días luego que el huevo ha sido depositado. Se requieren temperaturas ambientales de más o menos 26°C.

Las larvas son blancuzcas o cremosas, tipo escarabeiforme (forma de "C" y recurvadas), con la cabeza de color café o rojiza. Las patas torácicas y las mandíbulas son fuertes y bien desarrolladas. La cabeza es grande, densamente esclerizada y con mandíbulas poderosas y expuestas (King, 1994).

La larva al emerger del huevo, excava el suelo y comienza a alimentarse de materia orgánica, pelos radiculares y raíces pequeñas.

Esta etapa es extremadamente vulnerable a condiciones ambientales ligeramente desfavorables, lo que causa rápidamente su muerte.

A lo largo de un período de 21-32 semanas, las larvas pasan por tres etapas, de las cuales sólo la tercera tiene importancia económica (King, 194). Todas las etapas larvales (instars) se desarrollan en el suelo. Las especies fitófagas se alimentan de raíces de plantas vivas, ingiriendo al mismo tiempo, algunas cantidades de suelo y materia orgánica muerta.

Las especies no-fitófagas viven casi completamente sobre material vegetativo decadente y en otros residuos orgánicos.

En general, las larvas de tercer instar aparecen entre finales de junio y octubre. Una vez alcanzado el desarrollo completo, pueden tener una longitud de unos 40 mm.

Una vez completada su alimentación, éstas cavan el suelo y forman una celda, en la primera capa compacta que encuentran, generalmente a una profundidad de 20-30 cm. Posteriormente, la larva entra en un período de descanso obligatorio (diapausia) antes de convertirse en pupa. Esto ocurre de agosto a noviembre. Previo a esta etapa, la mayoría de los contenidos del intestino han sido expulsados y los cuerpos grasos se llenan, dando al gusano una apariencia blanco-cremosa.

En el campo, el paso a pupa normalmente ocurre de febrero a marzo. La etapa de pupa dura 34.4 días, a una temperatura de 23°C. Esta temperatura está muy próxima a la temperatura del suelo a 30 cm debajo de la superficie, sobre todo si no ha sido laborado en esta época del año. El adulto madura y permanece inactivo hasta que la celda se rompe artificialmente o se induce la emergencia debido a la filtración de la lluvia. La emergencia es sincronizada siguiendo las primeras lluvias de mayo/junio.

- Ciclo de vida de dos (2) años (*Phyllophaga elegans*).
Esta es posiblemente la especie más común de un ciclo de vida de dos años.

En esta especie, un período prolongado de pre-oviposición hace que el número de huevos que concluyen la incubación antes de julio sea reducido y que las larvas alcancen el final del segundo estadio no antes de setiembre. Por lo tanto, las larvas que alcanzan el final de su segundo estadio (alrededor de agosto-septiembre período seco), construyen celdas en la tierra en las que permanecen inactivas hasta abril o mayo del siguiente año, para pasar al tercer estadio.

La larva en el tercer estadio deja su celda probablemente como respuesta a la humedad del suelo y se alimenta vorazmente de raíces de plantas hasta agosto o septiembre.

Posteriormente, la alimentación cesa y la larva construye una celda a

mayor profundidad para entrar en un descanso obligatorio. La etapa de pupa dura cerca de un mes y el adulto permanece en su celda hasta la madurez fisiológica y es estimulada a emerger con la humedad del suelo.

En algunas partes de Costa Rica y Panamá con un ambiente de mayor humedad, en donde la época seca es menos severa, algunas larvas pueden completar su desarrollo en un año. En estos casos se detectó que el período de oviposición y el descanso de la larva en el tercer estadio eran menores. Se desconocen los factores ambientales o de otro tipo que causan que la larva en su segundo estadio entre en diapausia y de este modo determine un ciclo de dos años.

5.2.2.1 Emergencias de las Larvas. La emergencia de las larvas de *Phyllophaga* se da de forma masiva y ocurre en un período corto de tiempo, por lo general posterior a las primeras lluvias y al inicio del desarrollo de los cultivos. La emergencia es crítica para las larvas, ya que encontrarán un ambiente húmedo y abundantes alimentos. De otra forma, la emergencia se daría en época seca.

La presencia de raíces vivas y un suelo ligeramente ácido y bien drenado parece ser crucial para la supervivencia de la mayoría de larvas jóvenes (Wolcott, 1936, 1954). La cantidad de raíces fibrosas y las condiciones favorables del suelo, proporcionadas por algunas posturas y la caña de azúcar, favorecen la supervivencia de los gusanos (Chamberlain y Callenbach, 1943; Douglas, 1972; Fluke y otros, 1932;

Shorey et al. 1960; Wilson, 1969).

5.2.2.2 Daños. Los daños producidos por las larvas se caracterizan por su irregularidad y aparición esporádica, de manera que raramente se aprecia su presencia hasta que se ha producido el daño. Una vez en el suelo, el control de las larvas grandes es difícil y costoso, de manera que sólo resulta realmente viable la adopción de medidas preventivas. Esto significa que resultaría altamente útil poder contar con un método que permitiera predecir cuáles son los campos o ubicaciones de mayor riesgo.

El daño de la larva se manifiesta en el campo en forma de parches o manchas, generalmente en los meses de Junio a octubre y con ciertas variaciones.

Se ha determinado que los cultivos más afectados en Colombia en zonas cultivadas en el Oriente Antioqueño, Sabana de Bogotá, Costa Atlántica, Llanos Orientales y Zona Suroccidental del país, por el “complejo chisa”, han sido en su orden papa, frijol, maíz, pastos, hortalizas y flores. Además se observó que *Phyllophaga obsoleta* Blanchard, es la especie cuyas larvas y adultos están mejor adaptadas cualitativa y cuantitativamente a la mayoría de estos cultivos (Vallejo, L.F., 1997)

5.2.2.3 Mortalidad. Los principales factores que afectan la mortalidad de las

larvas son:

Condiciones desfavorables del suelo.

Falta de materia orgánica adecuada y de raicillas vivas que sirvan de alimento a las larvas en sus primeras etapas.

Encharcamiento del suelo.

Enfermedades, probablemente *Micrococcus* spp y cepas de *Metarhizium anisopliae* (King, 1994).

5.2.3 ETAPA DE ADULTO

5.2.3.1 Daño. El adulto no es tan dañino como la larva, pero ocasionalmente daña las inflorescencias del maíz. Para el control de los Scarabeidae se recomienda la destrucción de malezas algunas semanas antes de la siembra (Kings y Saunders, 1979), así como el uso de trampas de luz.

5.2.3.2 Vuelo. Se han registrado dos tipos de vuelo: uno ondulado local o vuelo de búsqueda, asociado con el apareamiento y: otro más directo o intencionado, de 1-3 metros sobre el suelo. En suelo en declive, *P. Menetriesi* tendió a volar hacia arriba, buscando la línea del cielo; por lo que se encontraron mayores concentraciones de larvas en la cresta. Pareciera que tales vuelos estuvieran asociados con la oviposición.

5.3 DINAMICA DE POBLACION DE LA *Phyllophaga* spp.

Con respecto al ciclo de vida de las *Phyllophaga* en América Latina, dos variantes son comunes:

5.3.1 ESPECIES DE CICLO ANUAL (univoltinas). En las especies que tienen ciclos de un año, los adultos emergen del suelo cuando se inician las lluvias; se alimentan del follaje de arbustos, árboles y ciertas plantas anuales. Copulan en estas plantas durante las primeras horas de la noche.

Los adultos regresan al suelo durante el día donde las hembras ovipositan. Las larvas a las dos semanas eclosionan de un huevo blancuzco. Los primeros dos instares se alimentan de materia orgánica y raíces tiernas por unas 4 a 6 semanas. El tercer instar dura 6 a 8 semanas y es durante este período (últimos días de junio a octubre) que ocasionan los mayores daños, alimentándose vorazmente de las raíces.

La larva forma una celda en el suelo, a una profundidad de 20 a 30 cm en donde permanece como pupa hasta diciembre-enero. El período pupal tarda unas 2 ó 3 semanas. Los adultos están listos en enero o febrero en regiones tropicales y permanecen en la celda hasta que las lluvias de mayo-junio penetran el suelo y deshacen la pelota de tierra que las envuelve (King y Saunders, 1984).

5.3.2 ESPECIES DE CICLO BIANUAL (bivoltinas). En las especies con ciclo de vida de dos años, el ciclo inicial es similar a las especies de ciclo anual,

pero al terminar su segundo instar, la larva entra en una fase de latencia (diapausa) en el suelo, permaneciendo inactivas hasta el comienzo de las lluvias (mayo-junio del siguiente año); a continuación se produce la ecdisis (el cambio de instar o estadio larval) y vuelve a iniciarse la alimentación como larvas del tercer estadio. De esta forma se inicia el daño a los cultivos antes que las especies con un ciclo de un año, sean predominantes. La sincronización de los ciclos vitales explica la aparición de las especies cada dos años.

Figura 1. Etapas de desarrollo de *Phyllophaga obsoleta*



(Imagen cortesía de Vallejo, 1997).

6. METODOLOGIA

La cepa a utilizar para este trabajo será la denominada HDI, que será aislada del producto comercial Dipel 2X de Laboratorios Abbott. Esta cepa corresponde a *B. Thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), la cual presenta toxicidad específica para insectos del orden Lepidoptera (Vallejo y Orduz, 1996).

Para estudiar los diferentes nutrientes, provenientes de desechos agroindustriales para la producción del *B. Thuringiensis*, se tomará como fuente proteica el suero de leche y tortas de carne y pescado. Como fuente de carbono se utilizará melaza y como fuente de minerales el cloruro de calcio (CaCl_2) (CIB, 1996). Por estudios ya realizados por la Corporación para Investigaciones Biológicas - CIB de Medellín se determina eliminar los medios de cultivo con un solo nutriente, sólo melaza o torta de carne, ya que los rendimientos en biomasa fueron más bajos que en cualquiera de los medios de cultivo que tenían mezcla de nutrientes (CIB, 1996).

Para el desarrollo de los inóculos de producción en el laboratorio, se necesitarán erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 125 ml de MI, inoculados al 5% con la suspensión madre de esporas y ampicilina hasta una concentración final de 50 mg/ml. El inóculo de producción se incubará con agitación por 16 h, a 200 r.p.m. y 30°C, y luego se medirá la absorbancia a 600 nm y la concentración de esporas. Posteriormente se procederá a inocular, al 5%, el medio de cultivo a utilizar (torta de carne, con melaza y CaCl_2) y cada uno de los corridos del fermentador (Orduz y Vallejo, 1996).

La suspensión madre de esporas de *Btk* se obtendrá de 400 ml de un cultivo completo final (CCF) de *Btk* incubado por 48 h a 200 r.p.m. y 30°C. El CCF se centrifugará a 8,000 r.p.m. y 4°C, por 20 minutos, descartándose el sobrenadante. El sedimento se suspenderá en 40 ml de NaCl IM y se agitará a 125 r.p.m. y 37°C, por 30 minutos y se centrifugará de nuevo bajo las condiciones antes descritas. El sedimento obtenido se suspenderá en agua destilada y nuevamente se centrifugará. Este proceso se realizará dos veces. Finalmente, el sedimento obtenido se suspenderá en 200 ml de una solución de PBS y glicerol al 20% v/v. Esta suspensión se colocará al baño maría, a 80°C por 10 minutos y se almacenará a -70°C hasta el momento de utilizarlo como punto de partida para el desarrollo del inóculo de producción de la totalidad de las fermentaciones (Orduz y Vallejo, 1996).

Fermentación: En el fermentador el rango de temperatura que se estudiará estará entre 28 y 32°C. El sistema será aireado mediante un Sparger tipo flauta. Las velocidades de aireación respecto al volumen de medio, corresponderán a un rango entre 0,76 a 1,52 vvm.

El rango de agitación que utilizará, variará entre 250 y 450 r.p.m.. El medio de cultivo se agitará mediante una turbina de seis paletas planas; mejorando la turbulencia del sistema con dos placas deflectoras colocadas a 180° (Orduz y Vallejo, 1996).

Al mezclar los nutrientes, la fuente proteica y la melaza, esta mezcla se estudiará por medio de un diseño central compuesto, en donde se mostrará la influencia de la composición y de la cantidad total de nutrientes del medio de cultivo sobre las

variables de respuesta: biomasa total producida y concentración de esporas.

Para el estudio del efecto de las variables de interés sobre las diferentes variables de respuesta se utilizará un diseño experimental del tipo 2^3 (2 individuos x 3 repeticiones) con experimento central. Los valores operacionales de las diferentes variables serán mostradas para cada una de las fermentaciones por medio de una segunda tabla. Se utilizará un litro de medio de cultivo, pH= 7,2 como volumen operacional (Orduz y Vallejo, 1996).

Para medir la concentración de esporas se tomarán 0.5 ml de cultivo cada 5 horas durante una semana. De este se realizaran diluciones seriadas en PBS. Dos de estas dos diluciones se sembrarán por triplicado en Luria Bertani (LB), teniéndose en cuenta las que, en promedio, mas se acerquen a 100 UFC (Orduz y Vallejo, 1996).

En el estudio de el medio de cultivo (torta de carne, con melaza y CaCl_2) se medirá la absorbancia de las diluciones seriadas de la muestra, 1/10 y 1/50 a 600 nm, con el fin de medir la biomasa producida. Con los datos obtenidos se realizarán curvas de crecimiento celular, absorbancia contra tiempo.

En la etapa de fermentador se medirá la absorbancia de las diluciones seriadas de la muestra, 1/10 y 1/50, a 600 nm y este valor se correlacionará con el de la biomasa producida mediante una curva de calibración. Con los datos que se obtengan se realizarán curvas de crecimiento celular, biomasa contra tiempo (Orduz y Vallejo, 1996).

Una vez se logre el ingrediente final (bioplaguicida) se hará un bioensayo de toxicidad contra larvas de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (*Coleoptera, Scarabaeoidea: Melolonthidae*), por medio de la metodología de Padidam (1992) con las modificaciones realizadas en 1996 para el mismo fin, por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) (Anexo 1); además de hacer las variaciones respectivas en cuanto a la dieta que se le suministrará a las “chisas” o “gusano mojoy”, y la forma como se suministrará la dosis de la concentración de ingrediente activo a las larvas de tercer instar de esta especie.

En el laboratorio se establecerá una cría masiva de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard, cuyas larvas de tercer instar se alimentarán de las raíces de trigo, previamente sembrado en unas canastillas (53 x 36 x 30) en donde se depositarán de 100 a 150 chisas por canastilla. La germinación del trigo se da en un tiempo de dos semanas, y el crecimiento de las raíces de éste necesitará de una semana más, para que tengan un tamaño adecuado, para que las chisas se alimenten de éstas.

En cuanto a la forma como se suministrará el ingrediente activo a las larvas de tercer instar, será vía oral por medio de una jeringa de tuberculina, 0.1 ml por chisa.

De los liofilizados obtenidos se pesarán 50 mg y se suspenderán en 4,5 ml de PBS; de dicha suspensión se realizarán diluciones sucesivas también en PBS, en las cuales la concentración de ingrediente activo producirá sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard una mortalidad entre 0 y 100%.

La exposición de las larvas a las diferentes dosis se prolongará por 3 días, al cabo de los cuales se contabilizará el número de larvas muertas. Con estos resultados se realizará un análisis Probit para obtener la concentración letal media (LC_{50}), en mg/cm^2 de la biomasa obtenida en cada una de las fermentaciones. Este procedimiento se realizará por triplicado y en días diferentes.

8. PRESUPUESTO

PRESUPUESTO								
MATERIALES			MESES					
ELEMENTOS	UNIDAD	COSTO UNITARIO	M1	M2	M3	M4	M5	TOTAL
Elenmayer 250MI	Unidad	7,656	30,624					30,624
Ampicilina 250MI	Unidad	13,700	13,700	13,700				27,400
Agua destilada 500MI	Caja (24 unid)	74,820	74,820	-	74,820	-	74,820	224,460
Melaza	500MI	2,000	-	4,000				4,000
Cloruro de Calcio (CaCl)	Kilo	2,088	-	2,088				2,088
Glicerol al 20%	500MI	5,336	5,336					5,336
Pipetas 5MI	Unidad	6,960	13,920					13,920
Pipetas 10MI	Unidad	10,962	21,924					21,924
Asa de 0,01	Unidad	15,660	15,660					15,660
Alcohol 750 MI	Botella	2,250	2,250	2,250	2,250	2,250	2,250	11,250
Cubreobjetos de Vidrio	Caja (100 Lam)	4,640	4,640			4,640		9,280
Micropipetas (0.01)	Caja	147,668	147,668					147,668
Pinzas Tubos de Ensayo	Unidad	17,980	35,960					35,960
Pinzas Elenmayer	Unidad	26,100	26,100					26,100
Probeta de 10 MI	Unidad	12,064	12,064					12,064
Tubos de ensayo 13x100	Unidad	1,021	5,104					5,104
Tubos de ensayo 16x100	Unidad	557	2,784					2,784
Tubos de ensayo 16x150	Unidad	1,508	7,540					7,540
Matraz de 1 litro	Unidad	59,508	59,508					59,508
Phillophaga Obsoleta Blanchard	Unidad	75					90,000	90,000
Trigo	Kilo	1,210				42,350		42,350
Canastillas 60x40x41	Unidad	22,715				227,151		227,151
Jeringas de tuberculina	Caja (20 Unid.)	3,775					7,550	7,550
Guantes quirurgicos	Caja (40 pares)	44,000	44,000					44,000
Contador manual de colonias	Unidad	336,400	336,400					336,400
Gradilla de 40 tubos	Unidad	27,869	27,869					27,869
Termómetro ambiental (0° - 40°C)	Unidad	37,700	37,700					37,700
Termo Neveras	Unidad	14,920				89,520		89,520
Algodón	Rollo	5,916	5,916		5,916		5,916	17,748
Dipel 2X	500 Gramos	28,350	56,700					56,700
<i>Subtotal</i>			988,187	22,038	82,986	365,911	180,536	1,639,658
Otros 10%			98,819	2,204	8,299	36,591	18,054	163,966
TOTAL			1,087,006	24,242	91,285	402,502	198,590	1,803,624

LABORATORIO															
PERSONAL			MESES												
CARGO	TIEMPO	VALOR	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	TOTAL
Asesor	Mensual	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	7.200.000
Auxiliar	Mensual	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	497.500	5.970.000
Gastos Administrativos	Mensual	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	219.500	2.634.000
TOTAL			1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	1.317.000	15.804.000

LABORATORIO			MESES												
EQUIPOS	CANT.	TO./HOR.	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	TOTAL
Hardware y Software															
Centrifuga															
Hemocitómetro															
Incubadora															
Estufa															
Congelador (-70°C)															
Sistema de Aireación (Turbina de 6 paletas)															
Microscopio binocular (40x)															
Pesa															
<i>Subtotal</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros 10%			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Al ítem "Otros" se le ha asignado un 10% del total del valor mensual de los costos de los materiales a utilizar por la variación que pueda existir en el precio al momento de comprarlos.
- El tiempo de la asesoría ha sido estimado en dos (2) horas diarias, cinco (5) días a la semana durante seis (6) meses.
- El auxiliar estará trabajando tiempo completo.
- Los gastos administrativos, que se calcularon en un 20% de la sumatoria del costo del auxiliar y el asesor, corresponden a los costos ocasionados en el laboratorio tales como labores secretariales, mensajería, legales, energía, teléfono, uso de espacio, papelería, etc.
- El costo de los equipos a utilizar en el laboratorio deberán de ser proporcionados por el laboratorio.

9. ETAPAS PARA EL DESARROLLO DE UN BIOINSECTICIDA A BASE DE AISLAMIENTOS DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

ACTIVIDADES PARA LA PRODUCCION DEL BIOINSECTICIDA

9.1 *Desarrollo de los inóculos de producción.*

1. En elenmeyers de 250 ml de capacidad con 125 ml de MI, se inoculará el inóculo de producción al 5% con la suspensión madre de esporas y ampicilina hasta una concentración final de 50 mg/ml.
2. Incubación del inóculo de producción con una agitación a 200 r.p.m. y 30°C, por 16 horas.
3. Medición de la absorbancia del inóculo de producción.
4. Medición de la concentración de esporas.
5. Procedimiento de inoculación al medio de cultivo.
6. Inoculación a cada uno de los corridos del fermentador.
7. Obtención de un cultivo completo final (CCF) de *Btk*.
8. Incubación por 48 horas del CCF.
9. Centrifugación del CCF a 8000 r.p.m. y 4°C, por 20 minutos.
10. Suspensión en agua destilada del sedimento que se obtiene en la centrifugación en 200ml de NaCl IM.
11. Se repite el proceso de centrifugación.
12. Suspensión del sedimento obtenido en 200 ml de una solución de PBS y glicerol al 20% v/v.
13. Agitación de la suspensión a 125 r.p.m. y 37°C, por 30 minutos.
14. Colocación de la suspensión al baño maría por 10 minutos.
15. Almacenamiento de la suspensión a -70°C.

16. Utilización de la suspensión como punto de partida para el desarrollo del inóculo de producción de la totalidad de las fermentaciones.

9.2 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo a utilizar será la torta de carne como fuente de nitrógeno, mezclada en diferentes proporciones con melaza, como fuente de carbono y CaCl_2 en concentración 1g/l, porque se obtienen mayores rendimientos (Vallejo Y Orduz, 1996).

17. Preparación de la torta de carne: =>Transferir a un matraz de un litro, 100 gr de torta de carne con 400 ml de agua
=>Mezclar.
=>Ebullición por 2 minutos.
=>Aforación.
=>Filtración.

18. Preparación de la melaza: =>Pesar 100 gr de melaza.
=>Completar el volumen a un litro con agua destilada.

19. Preparación de la solución media de CaCl_2 (20g/l).

20. Realizar las diluciones necesarias en la preparación de los medios, en los que se utilizarán en una concentración de 1g/l.

21. Mezcla de los nutrientes (la torta de carne mezclar en diferentes proporciones con melaza y CaCl_2).

9.3 Fermentador

22. Fermentación de un medio de cultivo en un rango de temperatura entre 28 y 32°C.

23. Aireación el sistema mediante Sparger tipo flauta, con velocidades de aireación en un rango entre 0,76 a 1,52 vvm.
24. Agitación del medio de cultivo mediante turbina de seis paletas planas en un rango entre 250 y 450 r.p.m..
25. Realizar estudio de la influencia de la composición y de la cantidad total de nutrientes del medio de cultivo sobre las variables de respuesta: biomasa total producida y concentración de esporas. Se utilizará el diseño experimental del tipo 2³ con experimento central.
26. Medición de la concentración de esporas cada 5 horas.
27. Realizar curvas de crecimiento celular, biomasa contra tiempo, con los datos obtenidos en el estudio de los medios de cultivo.
28. Pesar el producto final de la fermentación (procedimiento que se realizará por triplicado), el valor de biomasa producida se deducirá de la diferencia de los dos pesos.

9.4 Realización del bioensayo de superficie

29. En el laboratorio se establecerá una cría masiva de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard. El tiempo de crecimiento del trigo en las canastillas será aproximadamente de tres semanas
30. Pesar 50 mg de los leofilizados obtenidos y se suspenderán en 4,5 ml de PBS.
31. Realizar diluciones sucesivas en PBS de la suspensión.
32. De cada dilución se tomaran cuatro alícuotas de 0,1 ml que por medio de una jeringa de tuberculina se suministrará vía oral a las larvas de tercer instar de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard.
33. Depositar las larvas que se les haya suministrado la solución vía oral en la canastilla respectiva.
34. La exposición de las larvas a las diferentes dosis se prolongará por 3

días.

35. Realizar un análisis probit para obtener la concentración letal media (LC_{50}), en mg/cm^2 de la biomasa obtenida en cada una de las fermentaciones.
36. Realizar el procedimiento anterior por triplicado en días diferentes.

10. CONCLUSIONES

El desarrollo de este proyecto pretende contribuir en forma permanente con el desarrollo sostenible del sector agrícola. Con el fin de permitir a nuestros agricultores, el obtener una mayor productividad y rentabilidad en sus cultivos, que ofrecerá una alternativa importante para el control de plagas en substitución de los insecticidas químicos, a unos costos favorables, y que generará de manera simultánea una menor contaminación y mejor calidad de vida.

Dado lo anterior, la autora de este proyecto de grado, a partir del mes de Mayo del 2003 iniciará el desarrollo del bioinsectisida descrito en el presente trabajo, el cual se realizará en la ciudad de Medellín bajo la tutoría del Dr. Luis Fernando Vallejo y dirección del Dr. Sergio Orduz.

BIBLIOGRAFIA

CARRERE, Ricardo. Red de Acción Contra Plaguicidas de América Latina (1995: Palmira, Colombia). [en línea]. En : Revista del Sur. Palmira, 1995. [citado: 23 Octubre del 2002]. Disponible por Internet: [Http://www.revista del sur.org.uy/revista.049/Ecologia02.html](http://www.revista-del-sur.org.uy/revista.049/Ecologia02.html).

CORPOICA. Proyecto de validación y ajuste de tecnología para el control microbiológico de chisa, en el municipio de Cajamarca. Ibagué. Editorial Tecnimpresos, 1995. 84 p.

CORPOICA. Taxonomía e Identificación de Larvas y Adultos de Coleoptera: Scarabaeoidea, Plagas en cultivos de importancia económica. Subdirección de Investigación estratégica - Programa de Entrenamiento Avanzado. En: Il Curso Nacional Sobre Plagas Rizófagas. Santafé de Bogotá D.C. Editorial Piloto S.A. 1995. 44 p.

HERNANDEZ, J.; ORTIZ, R.; WALSCHBURGUER, T. y HURTADO, A. Estado de la Biodiversidad en Colombia. Volumen Especial. En: Acta Zoológica Mexicana (nueva serie). [en línea]. Xalapa, México. 1992. [citado: 17 de Septiembre del 2002]. <http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/proyectos/escalado.htm>.

Instituto Nacional de Ecología; Secretaría de Medio Ambiente, recursos Naturales

y Pesca. Todo lo que usted debe saber sobre plaguicidas. Folleto 2. México, D.F.; INE. CEPIS. 1996. 37 p.

KING, A.B., SAUDERS, J.L. Las Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en América Central. Administración de Desarrollo Extranjero (ODA), Londres. 1984. 182 p.

LECIRAD, *Bacillus thuringiensis* y la lucha contra los insectos. [en línea] París, Francia. 1995. [citado: 18 de Junio del 2002]. <http://www.cirad.fr>

LOCARNO, P.C., FRANCO, M.P. y VELASQUEZ, J.G. Informe preliminar de determinación de adultos de coleópteros del suelo obtenidos de larvas de yuca en veredas del norte del Cauca. Proyecto Manejo de Plagas para Pequeños Agricultores en el Norte del Cauca. CETEC. En: II Curso Nacional Sobre Plagas Rizófagas. Santafé de Bogotá D.C. Editorial Piloto S.A. 1995. 80 p.

LOS E.E.U.U: Departamento de la agricultura. Servicio Nacional de Estadística Agrícola. Uso químico agrícola. Sumarios. [en línea]. Washington, C.C. 1993. [citado: 28 de Junio del 2002]. <http://www.mindfully.org>

MORON, Miguel Angel. *La Diversidad de Coleópteros Scarabaeoidea o Lamellicornia en Colombia, y su Repercusión en el Complejo de Plagas Subterráneas*. En: II Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología. En: II Curso Nacional Sobre Plagas Rizófagas. Santafé de Bogotá D.C. Editorial Piloto S.A. 1995. 130 p.

ORDUZ, Sergio y GONZALEZ, Andrés F. Escalado de *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* con base en la transferencia de oxígeno. [en línea]. Resumen. En: Corporación para Investigaciones Biológicas. CIB. Medellín. 1996. [citado: 8 de Julio del 2002]. www.colciencias.gov.co

PARDO, Locarno Luis Carlos. Escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola en Colombia. En: XXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología – SOCOLEN. 1994: Medellín. 178 p.

ROMERO, G., VELASQUEZ, J.G. Y MUNOZ, C.A. Cuantificación preliminar del daño causado por coleópteros del suelo al cultivo de la yuca en el norte del Cauca. Proyecto de Manejo Integrado de Plagas para Pequeños Agricultores en el Norte del Cauca. CETEC. Editorial Piloto S.A. 1993. 132 p.

SANCHEZ, Guillermo y VASQUEZ, Norma C. Manejo de Plagas en el Sistema de Producción de Arracacha en el Departamento del Tolima. Boletín. Ibagué. Tolima. Tecnimpresos. 1996. 43 p.

SWADENER, Carrie. Diario del insecticida Bacilo thuringiensis (Bt). Diario de la reforma v.14, n.3. [en línea]. Washington, C.C. 1994. [citado: 12 de Febrero del 2002]. <http://www.mindfully.org/GE/Bacillus-thuringiensis-Bt.htm>.

VALLEJO, Fernando, MORON, Miguel Angel. ORDUZ, Sergio. *Primer Registro y Descripción de Phyllophaga obsoleta Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae) Una Especie Plaga del Complejo Chisa de Colombia*. Revista

Colombiana de Entomología. Vol.23 Nos. 1-2, p. 1-7. Medellín. Editorial Tecnimpresos. 1997.

VALLEJO, Luis Felipe. ORDUZ, Sergio. Producción de un Plaguicida a Base de *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Kurstaki*, a nivel de laboratorio. Revista Colombiana de Entomología. Vol.22 No. 1, p. 61-67. Editorial Tecnimpresos. 1996. 80 p.

VALLEJO, Luis Fernando. Contribución al Conocimiento de las Plagas Subterráneas (Chisas) (Coleoptera, Scarabaeoidea: Melolonthidae) del Oriente de Antioquía - Colombia. Tesis de Maestría de la Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Colombia. 1997. 257 p.

WILLIE, Bonnie. The insect pathogen *Bacillus thuringiensis* bacterial pathogens used for insect [en línea]. Protocolo. 1995. Washington, C.C. [citado: 7 de Marzo del 2002]. <http://www.entomology.wise.edu/mbcn/fea207.html> - 14k.