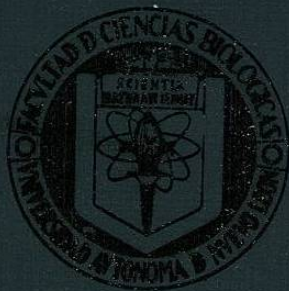


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Bacillus thuringiensis COMO UN HABITANTE DEL SUELO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1989

TM

75320

FEB

1989

18



1020066508

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



Bacillus thuringiensis COLONIA HABITANTE DEL SUELO

**TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

Q.B.P. HUGO ALBERTO LUNA OLYERA

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1989

20
19
19



161901

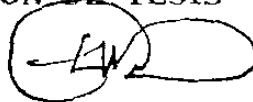
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
- FACULIAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTRADO

Bacillus thuringiensis COMO UN COMPONENTE DEL SUELO

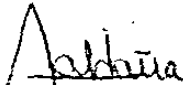
TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
PRESENTA

Q.B.P. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA

COMISION DE TESIS



PRESIDENTE: M.C. LUIS JESUS GALAN WONG



SECRETARIO: M.C. JORGE MIGUEL SALDANA ACOSTA



VOCAL: M.C. NABOR GONZALEZ GARZA

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1989

INTRODUCCION

Los métodos para el control de insectos plaga han evolucionado a través de la historia de la agricultura y continúan evolucionando en el presente. En años recientes se ha centrado un considerable interés en el uso de microorganismos entomopatógenos para este propósito y una gran atención ha sido captada por *Bacillus thuringiensis*; una especie entre las bacterias grampositivas formadoras de espora, que produce un discreto cristal glicoprotéico intracelular durante la esporulación y el cual contiene una δ -endotoxina que resulta tóxica para larvas de lepidópteros y algunas especies de dípteros (Pendleton 1969; Schesser y Bulla 1978; Luthy 1980).

B. thuringiensis es ahora el origen de la entera aceptación de los insecticidas biológicos que se están utilizando en muchos países. En la actualidad, más de dos millones de kilogramos del bioinsecticida son usados cada año para controlar plagas de importancia agrícola y forestal. Diversas razones, entre las que destacan especificidad, virulencia y potencia contra insectos blanco, han convertido a estos agentes microbianos en candidatos cada vez más atractivos para el desarrollo comercial. Incluso, tales preparaciones son compatibles con muchos insecticidas químicos, propiedad especialmente útil en programas de control integrado (Somerville 1973; Couch y Ross 1980; Rowe y Margaritis 1987).

A la fecha, existe una cuantiosa información concerniente al metabolismo de *B. thuringiensis*, sus toxinas, genética y otros puntos importantes. Sin embargo, no se ha hecho pública una detallada descripción ecológica. El comportamiento y distribución de *B. thuringiensis* en los ecosistemas, son aspectos poco conocidos pero que sin lugar a duda, es esencial entenderlos para el esclarecimiento del o los factores involucrados en el uso apropiado del organismo.

Bajo condiciones naturales *B. thuringiensis* raramente desempeña un papel significativo en la regulación de poblaciones. Sin embargo, el aislamiento de ciertos serotipos a partir de insectos infectados, indica el potencial entomopatogeno de la bacteria y la posibilidad de que represente para sus hospederos solo un factor enzootico.

Una parcial explicación para las escasas epizootias generadas por *B. thuringiensis* es la inhabilidad de las esporas para sobrevivir en superficies expuestas a la luz. Estudios realizados sobre su perseverancia nivel foliar, han revelado que mueren muy pronto bajo luz ultravioleta y visible. De igual modo, al incidirles luz solar directa la vida media se ha reducido a menos de 24 horas. En contraste, el cristal paraesporal conserva su actividad tóxica cuando se sujeta a similares condiciones (Ignoffo y García 1978; Griego y Spence 1978).

La persistencia de esporas en follaje difiere marcadamente de su permanencia en suelo. La información referente al mantenimiento (Saleh et al. 1970 a; Pruett et al. 1980; West et al. 1984 b), así como los datos obtenidos al investigar los factores que gobiernan su desarrollo en tal ambiente (Saleh et al. 1970 b; West y Burges 1985; West et al. 1985 b), hacen suponer que *B. thuringiensis* puede ser un miembro estable de la comunidad microbiana. No obstante, un hecho contradictorio es la baja frecuencia de aislamientos a partir de este hábitat (De Lucca 1981). Esta última aseveración puede resultar inexacta. Debido a que no se ha concertado un verdadero esfuerzo para determinar su ocurrencia normal, es probable que *B. thuringiensis* se encuentre mas ampliamente distribuido de lo que imaginamos. Al abordar este argumento, es inevitable considerar dos planteamientos surgidos de la contraposición de resultados obtenidos cuando se estudia la sobrevivencia de *B. thuringiensis*. Por un lado, la aspersión de

formulados comerciales en distintas regiones, quizás implique una condición alóctona de los serotipos seleccionados (West et al. 1984 a; West et al. 1984 b). Por otro, la continua recuperación de la variedad aplicada (De Lucca et al. 1981) y la predominancia de ciertas cepas en determinadas localidades (Ohba et al. 1979), sugiere que diversos aislados son capaces de proliferar en suelo bajo condiciones propicias.

Ciertamente, se desconoce si *B. thuringiensis* puede acumularse en suelo, y si lo hiciera, no se tiene idea de la función que pudiese desempeñar. En un punto de vista, su acumulación reduciría la frecuencia de aspersiones en el sistema. En una perspectiva diferente, su integración y desarrollo en el ambiente implicaría la posibilidad de una perturbación en la biocenosis. Por lo cual, en el interés de un uso responsable del patógeno y un control predecible de plagas, se requiere estudiar la factibilidad de que la bacteria se establezca como miembro activo de la comunidad.

OBJETIVOS:

- 1.- Determinar el comportamiento en suelo de diversas cepas de Bacillus thuriangiensis.
- 2.- Seleccionar cepas con mayor capacidad para desarrollarse en este ambiente.
- 3.- Medir la respuesta del organismo a modificaciones ambientales de suelo.

ANTECEDENTES

Es importante enfatizar que en la incorporación de *Bacillus thuringiensis* al suelo, el organismo entra a un sistema dinámico cuya supervivencia depende tanto del tipo como la condición del suelo al cual se aplica, así como de su habilidad para competir con otros microorganismos presentes en el ambiente. De esta forma, los suelos son importantes para la persistencia y distribución de *B. thuringiensis* en la naturaleza, por lo que a continuación se consideraran algunos datos básicos sobre la investigación relacionada con este sujeto.

Uno de los primeros trabajos que permitió el estudio cuantitativo de *B. thuringiensis* en suelo, se ha atribuido a Saleh et al. (1969), quien desarrolló la técnica de frecuencia por dilución en placa, para determinar la presencia del organismo en suelo, al usar como modelo *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. El crecimiento competitivo de la bacteria se favoreció por el enriquecimiento de agar nutritivo con sulfato de polimixina B a 5 ppm y penicilina G a 4 ppm. La confirmación de colonias típicas se obtuvo al examinar frotis de las mismas para detectar presencia de cristales paraesporales después de 48 horas de incubación a 37 grados centígrados. Los límites de detección que se obtuvieron por este método fueron de 600 a 1000 propágulos por gr, dependiendo del tipo de suelo y la proporción al número total de organismos presentes. A partir de esta investigación es posible reconocer el efecto que ejerce este ambiente incluyendo la fracción biótica, sobre la distribución de *B. thuringiensis*.

Los mismos autores (Saleh et al. 1970 a) han utilizado la técnica de frecuencia por dilución en placa desarrollada por ellos, para evaluar el destino de *B. thuringiensis* en suelo, después de aplicar los productos comerciales Thuricide y Biotrol a cultivos de repollo y lechuga. A partir de tales ecosistemas, *B. thuringiensis* se recuperó en números que fluctuaron de 7,800 a

170,000 propágulos, principalmente en forma de esporas, por gr de un suelo limo-arcilloso y de dos suelos limosos, pero de un suelo orgánico, no se lograron recuperar estas estructuras bacterianas. Bajo condiciones de laboratorio, la viabilidad de esporas inoculadas al suelo, muestra poca tendencia a disminuir después de tres meses de inoculación en los suelos limo-arcilloso con pH 7.3 y limoso con pH de 5.2. En cambio en el suelo orgánico, resultaron viables por un mes. En base a estos resultados, los autores han especulado que las esporas de *B. thuringiensis* pueden permanecer viables sin germinar, por largos periodos de tiempo en suelos de cultivo con diversas texturas y pH.

Se ha investigado la distribución natural de *B. thuringiensis* en literas de granjas para sericultivos y suelos de Japón (Ohba y Aizawa 1978; Ohba et al. 1979). Los aislados cristalíferos mas frecuentemente encontrados, pertenecen a los serotipos 3a, 4a:4b, 7 y 8. Mientras que los serotipos 1, 3a:3b, 4a:4c y 11 se aislaron raramente. En la prefectura de Ehime donde se realizaron ulteriores estudios sobre distribución de la bacteria, los serotipos mas comunes resultaron ser el 4a:4b, 4a:4c, 7 y 10. En este último caso, fué ecológicamente notoria la presencia del serotipo 4a:4c, encontrado escasamente en Japón, y del serotipo 10 que no había sido aislado de otras regiones. De los anteriores resultados se sugiere que la predominancia en serotipos de *B. thuringiensis*, difiere considerablemente dependiendo de la localidad, lo que permite entrever la posibilidad de que bajo condiciones permisivas del suelo, el organismo sea capaz de mantenerse viable por largos periodos de tiempo y quizas de proliferar.

De Lucca et al. (1981), también han indicado que el "status varietal" de *B. thuringiensis*, es una característica estable en el suelo. En un estudio que involucró dos años de trabajo, estos investigadores colectaron muestras de suelo de 115 campos de

cultivo que no habían sido tratados previamente con formulados de la bacteria y los cuales estaban muy alejados de cualquier tipo de insectario para lepidópteros o áreas de almacenamiento de granos. Se examinaron un promedio de 400 aislados de cada suelo, y de un total de 20,873 aislados, solo 220 (0.001%), fueron identificados como *B. thuringiensis*, de los cuales, 124 (0.24 %) no pertenecieron a la variedad *kurstaki*, la única variedad que se ha usado comercialmente en Estados Unidos en casi 10 años. En este mismo trabajo, se ha notado que el cultivo presente en los cultivos de maíz, no jugó un papel determinante en la presencia de la bacteria, ya que esta se aisló aunque con distinta frecuencia, de campos sembrados con soya, algodón, cebada, avena, trigo y cacahuete en determinadas localidades, pero en otras áreas no se detectó, aun con los mismos cultivos plantados. De campos que se trataron con formulaciones de la variedad *kurstaki* y *galienae*, indistintamente la variedad aplicada se recuperó meses después. De la evidencia presentada aquí, es posible tratar de establecer un perfil de comportamiento de la bacteria en suelo, que puede resumirse de la siguiente manera: el organismo se encuentra naturalmente presente, quizás debido a la relativa capacidad para mantenerse viable. Es probable que la baja frecuencia de aislamientos, sea función de sus deficientes mecanismos de dispersión en tal ambiente.

Se ha intentado desglosar por Saleh et al. (1970 b), los factores intrínsecos de suelo que rigen el "status" poblacional de *B. thuringiensis*, así como los factores que norman la germinación de esporas y crecimiento competitivo de sus células vegetativas. Las interpretaciones resultantes a partir de enriquecimientos del suelo con materia orgánica y variaciones de pH en el mismo, han sido la factibilidad de que las esporas permanezcan viables por largos períodos de tiempo en ausencia de estimulantes de germinación. Cuando se ha favorecido el crecimiento de los bacilos del suelo, mediante la incorporación de materiales proteínicos y

ajuste del pH al rango neutro, *B. thuringiensis* es capaz de germinar, competir vegetativamente con organismos nativos y esporular de manera exitosa hasta alcanzar elevados niveles de población. En cambio, el anterior efecto no se ha observado si el organismo se coloca en condiciones desfavorables; el crecimiento de los bacilos se reduce.

Al utilizar la técnica de inmunofluorescencia, West et al (1984 c), encontró que las células vegetativas de *B. thuringiensis* desaparecen del suelo a tasas exponenciales; en este caso, las células vivas se autolizan, mientras que las células muertas por calor fueron digeridas por microorganismos de suelo. El número de esporas resultó inalterado durante 91 días de incubación a 25 grados centígrados y no se detectó germinación de las mismas en este período. En contraste a los anteriores resultados, Petras y Casida Jr. (1985), han incubado esporas de *B. thuringiensis* en suelos no estériles, bajo condiciones de laboratorio y campo, encontrando que la cuenta inicial de esporas decreció aproximadamente 1 logaritmo en las primeras 2 semanas, después de lo cual, el número se mantuvo constante durante 8 meses. En estos experimentos, se logró notar una sobrevivencia similar entre esporas provenientes de preparaciones comerciales y obtenidas de laboratorio. Sin embargo, un hallazgo interesante fue el hecho de que las esporas producidas en suelo mediante la multiplicación de células vegetativas añadidas, sobrevivieron poco tiempo. A excepción del rehumedecimiento y desecación del suelo, las variaciones de pH, pretratamiento de esporas, enriquecimiento nutricional y desecación, tuvieron poco o ningún efecto en la persistencia de la bacteria. Según los autores, es probable que la exitosa sobrevivencia de las esporas de *B. thuringiensis* después de la primeras 2 semanas de incubación, sea el resultado de la incapacidad para germinar en suelo. Asimismo, Pruett et al. (1980), ha encontrado que *B. thuringiensis* var. *galleriae*, inoculado a un suelo limo-arcilloso,

decreció gradualmente la densidad de esporas viables, hasta alcanzar un 24 % del número inicial después de 135 días. En el mismo período, la patogenidad del formulado disminuyó a menos del 1 %, lo cual sugiere que los cristales fueron degradados más rápidamente que las esporas por bacterias nativas de suelo. Lo anterior se apoya en la relación existente entre la actividad de potencia y el incremento en la densidad de esa fracción proteica.

Para conocer más acertadamente el efecto de los componentes del suelo, sobre la potencia y viabilidad de *B. thuringiensis*, se le añadieron cristales y esporas de mutantes resistentes para estreptomycin a suelos no esteriles y autoclaveados con pH de 5, una disponibilidad de agua de -0.10 MPa y una temperatura de incubación igual a 25 grados centígrados. Para este caso, la recuperación de células viables, se obtuvo en medios de cultivo conteniendo estreptomycin. En ambos tratamientos de suelo, las poblaciones de *B. thuringiensis* sufrieron tasas exponenciales de mortalidad, pero una mayor pérdida de organismos se registró en suelos naturales que en autoclaveados. Aunque este mismo efecto se observó para la potencia, pudo notarse una pobre correlación entre ésta y la tasa de mortalidad de *B. thuringiensis* quizás debido, a que la pérdida de potencia no fue una función exponencial. Los resultados sugieren que la presencia de organismos en suelos naturales, acelera la mortalidad y disminuye la potencia de la bacteria en cuestión (West et al. 1984 b).

A través de la técnica de producción de dióxido de carbono, West (1984), investigó la persistencia del cristal proteico paraesporal marcado radiactivamente con C-14, en un suelo arable con y sin suplemento orgánico. Mediante bioensayos con larvas de insectos susceptibles, midió la actividad insecticida residual en suelos suplementados orgánicamente con y sin carbonato de calcio.

El grado de descomposición microbiana del cristal paraesporal, se redujo significativamente por la adición al suelo de suplementos orgánicos solubles, ya que posiblemente estos actuaron como sustratos alternos para la población estabilizante del cristal. La actividad inoculada de *B. thuringiensis* creció a tasas exponenciales en todos los tratamientos de suelo. La tasa de pérdida de actividad no difirió significativamente entre suelos con y sin carbonato, pero sí entre los tratamientos con suplemento orgánico y carbonato + suplemento orgánico. Sin embargo, después de 23 días, la actividad había desaparecido casi totalmente.

En una serie de modificaciones ambientales, se ha investigado la influencia del pH, humedad, disponibilidad de nutrientes y presencia de microorganismos nativos en el suelo, sobre el crecimiento y sobrevivencia de *B. thuringiensis* y *E. cereus*. Bajo condiciones naturales, el factor más crítico fue la disponibilidad de nutrientes. *B. thuringiensis* no pudo crecer en muchas condiciones, a diferencia de *E. cereus* que se desarrolló lentamente. La esterilización del suelo y la adición de nutrientes, estimularon un rápido desarrollo de ambas especies inoculantes. A pH bajo (5.2) y con régimen de sequía (-0.10 a -1.00 MPa), se redujo el crecimiento de los *Bacillus*, en comparación a pH neutros (7.3) y condiciones de humedad alta (0 a -0.01 MPa). A partir de los anteriores datos, es claro que *B. thuringiensis* puede competir adecuadamente con organismos autóctonos de suelo. A diferencia de lo asentado por Saleh et al. (1970 a), en el sentido de que la exitosa persistencia de las esporas de *B. thuringiensis* radicaba en la falta de germinación, en este trabajo se sugiere que la muerte del organismo en suelos naturales, se debe a la inhabilidad de las esporas para germinar, más bien que a la incapacidad para obtener nutrientes después de la germinación (West et al. 1965 b).

MATERIAL Y METODO

Cepas bacterianas:

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* empleadas en la presente investigación, pertenecieron a distintas variedades y serotipos, entre las que se encontraban *aizawai*, 7; *sotto*, 4a4b; *tolworthi*, 9; *ostrinae*, 8a8c; *nig-riue*, 8a8d; *neolonensis*, 24. De dos cepas, solo se ha obtenido su serotipo (8a8b), mientras que de una, se desconocen ambas características. La morfología del cristal paraesporal, fue variable entre las mismas, de tal forma que se pudieron reconocer fácilmente estructuras bipiramidales rectangulares, circulares, cuadrangulares o de formas irregulares (Tabla 1). De la misma manera, existe diferencia en el origen de las diversas cepas de *B. thuringiensis*; todas han sido aisladas de suelo, aunque de distintas regiones fisiográficas en el país. Como organismos de referencia se utilizó la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* serotipo 3a3b, *Bacillus subtilis* (cepa BS-FCB-1), un bacilo heterótrofo aerobio (cepa NX) nativo de suelo tipo xerosol cuyo criterio de selección fue la predominancia en el mismo, así como una cepa asporogénica de *B. thuringiensis* (AS). Las cepas se mantuvieron en agar nutritivo inclinado hasta su uso en los diversos experimentos de esta investigación. A excepción del organismo nativo y la cepa asporogénica todas las cepas empleadas fueron obtenidas de la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, F.C.B., U.A.N.L.

Suelos:

Se emplearon los dos tipos de suelo mas representativos del estado de Nuevo León; xerosol (pH 7.3, 3.0 % de materia orgánica) y litosol (pH 7.5, 2.5 % de materia orgánica), cuya superficie conjunta constituye aproximadamente el 65 % de territorio (35 y 30 %) respectivamente. El suelo del primer tipo se colectó en campos de cultivo del municipio de Anáhuac, mientras que el segundo se obtuvo de Villa de Santiago. Características fisicoquímicas adicionales para ambos se consultaron de Buring, 1979.

Muestras de suelo para ambas localidades, se obtuvieron al coleccionar porciones del mismo a una profundidad de 3-15 cm en distintos puntos del área de muestreo y combinarlas entre sí, para formar una sola. Tales muestras se colocaron en bolsas oscuras de polietileno para transportarlas al laboratorio, donde se secaron al aire y colieron a un tamaño de partícula < 2 mm, para almacenarse en oscuridad a temperatura de refrigeración hasta su uso. Los análisis microbiológicos y fisicoquímicos de estos suelos, se hicieron utilizando métodos estándar (Soil Conservation Service, 1972; Jackson, 1978; Palmer y Trost, 1979).

Unidades experimentales:

Se utilizaron como sistemas experimentales frascos de vidrio transparentes de 10 ml de volumen, tapados con torunda de algodón y los cuales fueron preparados mediante la adición de 2 gr de suelo no estéril, de uno u otro de los tipos empleados. Sistemas estériles se obtuvieron al autoclavarlos por 20 min a 121 °C. La humedad captada por el suelo a través de este proceso, se eliminó al colocar los frascos de vidrio sin torunda en campanas de flujo laminar; para ajustarse posteriormente a los niveles deseados en los diversos experimentos. La esterilidad se verificó por cuentas en placa en agar nutritivo y Sabouraud.

Medios de cultivo:

Para ensayos con suelo estéril, se utilizó agar nutritivo pH 7 como medio de recuperación y conteo de las diversas cepas empleadas en los distintos experimentos. El uso de marcadores de resistencia a antibióticos permitió estimar en tratamientos con suelo no estéril, las densidades de población de 5 cepas (incluyendo GM-1, GM-4, HD-1, BS-FCB-1 y NX, seleccionadas a partir de experimentos con suelo estéril) en un medio a base de agar nutritivo suplementado con sulfato de estreptomina, penicilina G

y nistatina (como inhibidor fungico) a concentraciones de 50, 5 y 20 ugr/ml, respectivamente.

Inicialmente se utilizaron discos para probar la respuesta de las cepas seleccionadas a antibióticos. Se prepararon discos de papel filtro de 5 cm de diametro, impregnados con 5 μ l de la solución a 20 ugr/ml de uno u otro de los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico, amikacina, ampicilina, cloranfenicol, clorotetraciclina, estreptomina, gentamicina, y penicilina G. Con excepción de la penicilina G, que se disolvió en agua destilada, las soluciones antibióticas usadas para impregnación a papel o incorporación a medios de cultivo, se disolvieron o suspendieron en etanol al 95 % y se esterilizaron por filtración a través de membranas milipore (0.22 μ m de diametro de poro) antes de añadirse asepticamente a los discos de papel esteriles. La esterilidad de las soluciones se determinó por cuentas en placa.

La respuesta de los organismos seleccionados a los discos con antibiótico, se determinó al distribuir con hisopo estéril, células en fase de crecimiento, provenientes de un cultivo en caldo nutritivo (entre 10^{-7} a 10^{-8} células/ml) sobre placas del mismo agar, antes de depositar los discos. Las placas se incubaron a 37 °C hasta que hubo una cantidad de crecimiento moderado; normalmente, y dependiendo de la cepa, se requirió de 1 día, pero se mantuvieron hasta 3 bajo incubación. El diametro de la zona de inhibición (si es que la hubo), se midió en mm con relación al borde del disco, y se considero arbitrariamente ya fuera como sensible o resistente a un antibiotico, aquel organismo que mostrara un halo de inhibición en el crecimiento $>$ o $<$ 1 mm, respectivamente. Los antibiogramas se realizaron por triplicado para cada una de las cepas (Barry, 1976; Cole y Elkan, 1979).

Tomando como criterio los patrones de resistencia observados para las diversas cepas, y los trabajos de Saleh et al., 1969;

Danso et al., 1973; Kukeydanli y Weber, 1978; West et al. 1984 a, se escogió la penicilina G, estreptomocina y nistatina, como agentes selectivos a incluir en el medio, para obtener mutantes espontáneas de cada una de la cepas, resistentes a los mismos. Las pocas colonias de la cepas, que crecieron en el medio con antibiótico, fueron purificadas y propagadas en medio de la misma composición y entonces usadas en relaciones sucesivas para concentraciones incrementadas y combinaciones entre los 3 antibióticos, hasta alcanzar las proporciones previstas. Las bacterias heterotróficas aeróbicas del suelo, se estimularon en medio nutritivo adicionado con 100 ugr/ml de nistatina e incubando hasta por 5 días a 37 °C (West et al., 1985 a).

Tiempo de generación:

El inóculo para el primer caldo nutritivo procedio de cultivos patrón de cada cepa, sembrados en agar inclinado. Mediante dos asadas se transfirieron células a tubos de ensayo con 10 ml de caldo y se incubaron a 37 °C por 24 hrs. Una suspensión bacteriana de esta fase, fué removida y usada para inocular (al 1 % v/v) un segundo caldo, que involucró, 50 ml de medio contenidos en matraces de 250 ml de capacidad con torunda de algodón. Estos cultivos estuvieron creciendo en agitador rotatorio a 200 rpm y 37 °C, hasta alcanzar la fase estacionaria, (y en posteriores experimentos, la densidad óptica deseada), o bien, por 72 hrs, para obtener esporas y cristales. Determinaciones de densidad óptica a intervalos de tiempo regulares, fueron hechas a partir de los matraces, utilizando un fotocolorímetro Klett-Sumerson equipado con filtro rojo. Los datos obtenidos por éste procedimiento se graficaron en papel semilogarítmico de tres ciclos para conocer la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de cada cepa (Schlegel, 1979; Wang et al, 1979). Cuentas viables en placa se corrieron simultaneamente por el método modificado de Miles y

Misra (Somasegaran y Hoben, 1985). Al utilizar micropipetas, una gota de las diluciones seriadas con orden decimal, fue colocada en una de las divisiones de la placa con agar. Después de 8 a 12 hrs de incubación, se contaron las gotas cuyo número de colonias oscilara entre 20 y 30.

Preparación del inóculo:

Células vegetativas en fase logarítmica o esporas y cristales para usar como inóculos a suelo, fueron obtenidas a partir de matraces agitados con caldo nutritivo, en los respectivos tiempos de recolección, según las cinéticas de crecimiento previamente realizadas. Porciones de 10 ml del caldo con crecimiento, se distribuyeron asepticamente en tubos, para centrifugar a 2000 rpm durante 30 minutos. El paquete celular se resuspendió nuevamente y se lavó 3 veces con solución salina.

Inoculación de suelo:

Porciones de suelo se inocularon con células vegetativas o esporas y cristales de *B. thuringiensis*. El inóculo fue suspendido en solución salina a determinadas concentraciones y se añadió a suelo en volúmenes precisos para ajustar a 10^{-6} - 10^{-8} UFC/gr. La agitación manual de los frascos reservorios pretendió distribuir de forma homogénea los propágulos añadidos, advirtiéndose este efecto al mostrar el suelo una apariencia uniformemente húmeda. Para la mayoría de los experimentos (a menos que de otra forma se indicara) la suspensión celular agregada también ajustó la humedad disponible del suelo a la capacidad de campo. Periodicamente, el peso de los recipientes fue determinado, y agua destilada estéril se agregó cuando fue necesario compensar las pérdidas por evaporación. El suelo inoculado se incubó por distintos períodos de tiempo a temperatura ambiente en oscuridad.

Para estudios de sobrevivencia, cada una de las 20 cepas de *B. thuringiensis* se distribuyó en suelos autoclaveados de tipo litosol y xerosol, manteniéndose junto con sus respectivos controles hasta por 100 días, tiempo durante el cual, 7 muestras fueron removidas y analizadas para monitorear cambios en las densidades de población. Además del parámetro anterior, en la última fecha de muestreo, se determinó la capacidad de *B. thuringiensis* para producir cristales después de su permanencia en suelo. A partir de los conteos viables de la cepas introducidas, 10 colonias de las últimas diluciones fueron tomadas para preparar cultivos que se tiñeron con cristal violeta y se analizaron posteriormente para detectar las estructuras paraesporales.

Para estimar la tasa de esporulación de células vegetativas o germinación de esporas en suelo, se añadió a muestras de xerosol estériles y no estériles, cualquiera de estos propagulos provenientes de las cepas GM-1 o GM-4 (además de los controles). Después de una determinación inicial para enumerar poblaciones totales, diariamente (por lapsos de tiempo hasta de 8 días dependiendo de la cepa), muestras de suelo fueron obtenidas para someterlas a un proceso de pasteurización a 65 °C durante 30 minutos (West et al., 1984 a; West et al., 1985 a). Diferencias en la densidad de población entre suspensiones de suelo pasteurizadas y no pasteurizadas, se tomó como evidencia de esporulación de células vegetativas o germinación de esporas.

Enriquecimiento de suelo:

En una serie de experimentos con modelo multifactorial, se alteró al pH, nivel de humedad, disponibilidad de nutrientes y presencia de microorganismos nativos de suelo tipo xerosol. Agua destilada estéril fue añadida inmediatamente después de la inoculación de la cepas (GM-1, GM-4 y HD-1). a fin de ajustar la

humedad de suelo estéril o no estéril a 3 diferentes niveles. Suelos inundados se prepararon al adicionar suficiente agua para formar una capa de 1 cm sobre la superficie. Tratamientos de suelo con humedad ajustada a capacidad de campo, se obtuvieron al inocular la suspensión celular como procedimiento de la d. s. u. t. Para suelos secos, recipientes inoculados sin tratamiento se incubaron en campana de flujo laminar durante 2 hrs. aproximadamente, hasta que el suelo se mostró seco en apariencia. El contenido de agua en muestras húmedas se mantuvo constante mediante reposiciones, aunque el pesaje periódico durante los tiempos de incubación indicó insignificantes pérdidas. Los nutrientes disponibles fueron suplementados al añadir ya fuere, glucosa, residuos de follaje de maíz o de pasto en cantidades suficientes para igualar esta fracción a 6% en el ambiente. El primer suplemento se incluyó en el agua utilizada para ajustar la humedad, mientras que el segundo y tercero se agregaron como un polvo fino antes de adicionar el agua. El pH original del suelo fue modificado a los rangos ácido, neutro y alcalino (5.0, 7.0 y 9.0 respectivamente) mediante la incorporación de cantidades apropiadas de ácido clorhídrico o carbonato de calcio. El equilibrio de pH en las muestras con carbonato, se logró varios días después de la adición del mismo, por lo cual, antes de usarse en los ensayos, suelos tratados con cualquiera de los dos reactivos, se almacenaron por 8 días, minimizando la actividad microbiana de tratamientos no estériles al mantenerlos a temperatura de refrigeración. Aunque la adición de suplementos también alteró ligeramente el pH original del suelo, el efecto se tornó intrascendente debido a que la corrección de éste factor se llevó a cabo subsecuentemente al enriquecimiento orgánico. De la misma manera, la esterilización de suelos tratados hizo variar el pH previamente corregido. No obstante, las fluctuaciones observadas se consideraron dentro de un rango permisible (± 0.3 unidades). Al preparar combinaciones de 4 factores (cepas, humedad, suplementos orgánicos y pH), se tuvo para suelos estériles 81

tratamientos diferentes, de los cuales se seleccionaron algunas condiciones ambientales en las que *B. thuringiensis* fue capaz de proliferar, para probarlas posteriormente bajo condiciones no estériles y así conformar 12 tratamientos más. Invariablemente, los suelos enriquecidos se mantuvieron por 8 días en incubación, y durante ese tiempo, 5 muestras fueron tomadas para detectar la respuesta de *B. thuringiensis* a las condiciones impuestas.

Extracción de *B. thuringiensis* del suelo:

Para la recuperación de poblaciones inoculantes introducidas al suelo, 6 repeticiones de los tratamientos fueron removidas a intervalos geométricos de tiempo. El suelo contenido en las unidades experimentales se depositó en frascos con 18 ml de solución salina al 0.85 % y 5 gotas del detergente neutro Tween 80 fueron añadidas además de 1 gota de la mezcla antiespumante aceite mineral-alcohol isopropílico (1 : 1). La suspensión fue agitada en vortex durante 5 minutos a velocidad media. Diluciones seriadas fueron subsecuentemente preparadas para sembrar las muestras en los medios de cultivo previamente desarrollados para ese propósito, cuantificando las colonias resultantes por el método de Miles y Misra modificado como ya se ha descrito. Suelos control sin bacterias inoculantes también se incluyeron durante las extracciones. Para confirmar que la identidad de las colonias que crecieran en los medios selectivos fuera la misma que la de los inoculantes, se examinaron microscópicamente frotis tenidos con cristal violeta. En base a la experiencia, la morfología colonial de *B. thuringiensis* fue reconocida fácilmente. Sin embargo, ante la posible presencia en suelos inoculados de otras especies de *Bacillus* con morfología colonial semejante (lo cual podría sobreestimar la población viable del organismo bajo estudio), se descartó de la cuenta final el escaso número de tales colonias que apareció en muestras de suelo no inoculadas.

Analisis estadístico:

Los datos obtenidos por las metodologías utilizadas se sujetaron a los análisis de regresión y correlación (Spiegel, 1984), con una comparación de pendientes para las líneas de regresión mediante la prueba de "t" student, o bien, se validaron con los procedimientos de ANOVA y la prueba de rango múltiple de Games - Howell para separar las series de los tratamientos con diferencias significativas. Un adicional análisis de varianza para 3 factores fué realizado en ensayos con suelos enriquecidos (Zar, 1974). Todos los valores reportados en la presente investigación han sido calculados con intervalos de confiabilidad del 95 % y se han expresado como el logaritmo de bacterias viables con respecto al tiempo.

RESULTADOS DISCUSION

Tasa de crecimiento:

Bacillus thuringiensis exhibió tasas de crecimiento variables en medio de cultivo (tabla 2). Los valores extremos para el anterior parámetro correspondieron a las cepas GM-1 y GM-19 (0.322 y 1.500 hrs respectivamente), en tanto, el resto de las cepas probadas, incluyendo los controles HD-1, BS-FCB-1 y NX, se desarrollaron en un rango intermedio en relación a las primeras. Las velocidades de crecimiento encontradas para *B. thuringiensis* en este medio ambiente particular, han indicado la heterogeneidad fisiológica entre los organismos de prueba, lo que a su vez permite sugerir una diversidad en atributos ecológicos dentro de los mismos. Puesto que muchos aspectos de la ecología de las especies pueden ser deducibles de su comportamiento en cultivo puro, y al considerar que la sobrevivencia de éstas en hábitats naturales dependerá finalmente de su habilidad para crecer a una tasa lo suficientemente alta para balancear la muerte originada por diversas causas (Brock, 1971), podría esperarse que aquellas cepas de *B. thuringiensis* con tales características mostrarían la mayor tendencia a persistir y colonizar el suelo una vez introducidas. Sin embargo, la reducción de la tasa de crecimiento para *B. thuringiensis* en suelo, en comparación a la observada en medio de cultivo, implicaría también una eventualidad razonablemente factible en vista de la magnitud y diversidad microbiana en tal ambiente donde sus poblaciones resultan prominentes competidores por sustratos disponibles. De esta manera, Brock (1979) observó que el tiempo de generación de *Escherichia coli* se alarga de 20 - 30 minutos en cultivo puro a 12 hrs en el tracto intestinal, y *Leucothrix mucor*, una bacteria marina, presenta un tiempo de generación casi 6 veces mayor en la naturaleza. Belser y Schmidt (1978) compararon la tasa de crecimiento del nitrificante autotrófico *Nitrobacter winogradsky* en 14 hrs con cultivos puros y 140 hrs en suelo nitrificando activamente.

Sobrevivencia de *B. thuringiensis*

El efecto de los componentes abióticos del suelo sobre la persistencia de *Bacillus thuringiensis* fue medido al incubar diversas cepas del organismo hasta por 140 días en muestras estériles de xerosol y litosol (figs. 1-22). La sobrevivencia de *B. thuringiensis* en suelo graficada como el análisis de regresión lineal del log₁₀ de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco contra el tiempo, revela que GM-1 experimentó una drástica caída de población para el día 140, ya que en xerosol y litosol su viabilidad se redujo 0.94 y 0.97 veces (X) respectivamente, el nivel original (Fig. 1). De la misma manera que para GM-1, el subsecuente análisis de datos para las cepas restantes, incluye la comparación propia (expresada en número de veces) entre la magnitud de poblaciones al día 140 de incubación en los representantes edáficos, con respecto a la cantidad inicial. Manifestándose en el orden correspondiente los valores obtenidos para xerosol, seguidos de los encontrados en litosol. Así pues y a diferencia de GM-1, GM-2 respondió inversamente con incrementos netos del orden de 2.24 y 0.92X (Fig. 2). Un efecto poco perceptible pero con tendencia a aumentar ocurrió en el caso de GM-3 cuyos valores correspondieron a 0.44 y 0.73 X (Fig. 3). Conviene destacar para la cepa en cuestión, el hecho de haberse desarrollado mejor en el segundo tratamiento como sucedió escasamente entre los organismos probados. Una de las cepas examinadas más sobresaliente por su capacidad relativa para proliferar en las condiciones bajo estudio, estuvo representada por GM-4 que elevó decididamente su población 6.27 y 4.01 X respectivamente (Fig. 4). GM-5 que disminuyó casi uno y dos tercios (0.28 y 0.63 X respectivamente) su número inicial (Fig. 5). Mientras que para GM-6 (Fig. 6) apenas puede apreciarse un desarrollo (0.48 y 0.37 X). La situación más contrastante aconteció con GM-7 que creció favorablemente en un suelo (7.91 X) y decreció en otro (0.58 X), sucediendo algo similar con GM-10 (Fig. 10), pero en menor grado (4.14 y 0.75 X).

GM-8, GM-9 y GM-11 ostentaron números positivos en xerosol y litosol, que en el mismo orden correspondieron a 2.80 y 1.23 X (Fig. 8), 5.76 y 1.88 X (Fig. 9), 11.88 y 0.49 X (Fig. 11), resaltando en un grado de lo más significativo el último organismo en la primera variable ambiental que contrasta marcadamente con la segunda. El tercer organismo de los examinados en esta secuencia, que disminuyó sus poblaciones en los dos tipos de suelo fue GM-12, con 0.39 y 0.74 X haciéndose bastante notorio nuevamente como se vió para los anteriores que similares pérdidas (GM-1 y GM-5), un efecto menos favorable en lo que a persistencia se refiere en litosol. Todas las cepas de la siguiente disposición mostraron incrementos en las densidades celulares en comparación a los números iniciales: GM-13 (1.04 X, 0.23 X); GM-14 (8.12 X, 4.52 X); GM-15 (2.62 X, 1.14 X); GM-16 (1.65 X, 3.37 X), GM-17 (0.87 X, 0.06 X); GM-18 (0.30 X, 0.34 X); GM-19 (0.38 X, 0.60). Cabe destacar en este grupo, las proporciones alcanzadas por GM-14, que al igual que GM-4 y GM-11, demostraron habilidades adaptativas superiores sobre las demás cepas. Un comportamiento poco común entre las cepas *B. thuringiensis*, aconteció con GM-20, que contrariamente a las cepas que proliferaron en un suelo y decrecieron en otro (GM-7 y GM-10), expuso una ligera disminución en xerosol (0.01) e incremento en litosol (0.05). La cepa HD-1 usada intencionalmente como insecticida comercial mostró al igual que GM-1, GM-5 y GM-12 reducciones de población en los dos suelos, sin embargo, a diferencia de las anteriores, el xerosol restringió severamente la estancia del organismo, de tal modo que al día 140, 0.96 partes del inóculo habían desaparecido. Tal conducta no se apreció en litosol, que fue capaz de amortiguar en mayor grado la caída de 0.11 X. Sorprendentemente B.S. FCB-1 (*Bacillus subtilis*), un organismo cuyo hábitat por naturaleza es el suelo, presentó también una baja capacidad para desarrollarse (0.80 y 0.16 X).

La comparación de pendientes de la línea de regresión obtenidas para la sobrevivencia de *B. thuringiensis* en ambos suelos se

presenta en la tabla 3. En términos generales el tipo de suelo no fue un factor determinante para que *B. thuringiensis* incrementara o disminuyera su población, ya que, de las 21 cepas probadas, 19 se comportaron de manera similar en lo que respecta al anterior parámetro, y en solo dos (GM-7 y GM-10) se observó una influencia ambiental, particularmente de litosol que marcó una diferencia reductiva en relación al xerosol. Al utilizar el anterior criterio comparativo, sobresale la capacidad de la cepa GM-4 para incrementar su población, ya que presentó el valor promedio más alto de pendiente positiva ($m = 0.0054$), que contrasta con la GM-1 que exhibió el mayor promedio de pendiente negativa ($m = -0.0100$) seguida de las cepas de referencia HD-1 ($m = -0.0046$) y BS-FCB-1 ($m = -0.0020$).

Una baja relación ha sido encontrada entre la velocidad de crecimiento *in vitro* y la sobrevivencia de *B. thuringiensis* en suelo estéril. Organismos como la cepa GM-19, GM-12, GM-13 cuyas tasas de crecimiento fueron de las más elevadas (1.500, 1300 y 1.250 hrs) no mostraron consistencia con su habilidad para mantener altos números de población después de 140 días de incubación en los suelos. En cambio, cepas como la GM-4 alcanzaron los mayores niveles a pesar de crecer más lentamente en comparación a las primeras. Solo para el caso de GM-1 se estableció relación entre ambos parámetros cuestionados, ya que una tasa de crecimiento (0.322 hrs) quizás haya sido la causa de la menor capacidad observada para equilibrar la mortalidad entre las cepas de *B. thuringiensis*.

A partir del análisis de datos se manifiesta una importante tendencia de *B. thuringiensis* para sobrevivir bajo las condiciones ambientales del suelo, ya que de las 21 cepas 14 (67 %) fueron capaces no solo de mantenerse, sino de proliferar aunque con distinto grado durante el tiempo de prueba en los tipos de suelo estudiado. Por otro lado, 3 cepas (14 %) crecieron en un tipo de

suelo y en otro disminuyeron su viabilidad, e incluso algunas (4 cepas = 19 %) respondieron con una mortalidad definida cuando se inocularon en xerosol y litosol. De la misma manera, es posible distinguir una heterogeneidad en el comportamiento en suelo entre cepas de *B. thuringiensis*, por lo que la sobrevivencia dependerá finalmente de habilidades adaptativas o competitivas de las mismas.

Aunque no se han desarrollado estudios ecológicos de *B. thuringiensis*, utilizando una amplia variedad de cepas, como ha sido este caso, diversos autores apoyan de alguna manera los anteriores resultados. Akiba et al (1977) ha comparado la sobrevivencia de dos cepas de *B. thuringiensis* en muestras estériles de tres distintos suelos cultivados con moras. Cuando los organismos se inocularon bajo tales condiciones, los números celulares no decrecieron, sino que se incrementaron y permanecieron en altos niveles durante varios meses. Por el contrario, cuando Sekijima et al. (1977) hicieron una sola aplicación de *B. thuringiensis* a una diversidad de tipos de suelos y siguieron su persistencia, encontraron que los niveles de *B. thuringiensis* decrecieron gradualmente a distintas velocidades, dependiendo de la naturaleza del suelo y la cepa aplicada. Sin embargo, Aizawa (citado por Dulmage y Aizawa, 1982) al aplicar repetidas veces el organismo al suelo, no detectó acumulación del mismo, por lo que parece haber un límite en el nivel de *B. thuringiensis* que el suelo puede contener.

Un hallazgo por demás interesante que enfatiza por un lado el "status" poblacional de *B. thuringiensis* en suelo y por otro, la distribución natural del organismo en tal ambiente, proviene de los estudios De Lucca et al. (1981), quienes revelaron una baja proporción del organismo (0.5 %) en relación a los formadores de spora, pero que independientemente de esto lo aislaron tanto de suelos rocosos, vírgenes, forestales, no cultivados o plantados

con diversos cultivos. Se ha indicado que el suelo juega un importante papel para la distribución de la bacteria en la naturaleza (Dulmage y Aizawa 1982). Tal aseveración está de acuerdo en parte con los resultados encontrados en los anteriores experimentos, donde un alto porcentaje de cepas logro mantenerse viable durante varios meses sin perder la capacidad de producir el cristal tóxico después de recuperarse de éste ambiente (tabla 4).

Formación y Germinación de esporas

Un experimento fue desarrollado para conocer la capacidad de *B. thuringiensis* de permanecer como células vegetativas en el suelo tipo xerosol. Para lo cual una cinética de esporulación fue seguida. Datos contrastantes entre las cepas probadas fueron obtenidos. Mientras que GM-1 y HD-1 convirtieron casi en su totalidad las células vegetativas a esporas en un lapso de 1 a 2 días (figura 23 y 25 respectivamente), GM-4 pareció retardar el proceso ya que a los 4 días posteriores a su inoculación, un logaritmo cercano a 3.4 células/gr de suelo aún se mantenía como su inóculo original (figura 24). Un caso bastante interesante sucedió con *B. subtilis* (fig 26) que progresivamente formó esporas sin disminuir el nivel inoculado de células vegetativas. Es posible que el comportamiento diferencial observado entre *B. thuringiensis* y *B. subtilis* tenga su origen en los habitats que por naturaleza se les reconocen. Mientras que el primero es un patógeno de insectos, el segundo es un organismo típico de suelo quizás bastante bien adaptado a las presiones ambientales del mismo.

El efecto de la fracción biótica del suelo fue considerada sobre la habilidad de germinación de esporas fue considerada al comparar tratamientos estériles y no estériles con verificación de cuentas vegetativas y esporuladas. Una bien definida germinación de esporas ha ocurrido con GM-1 para ambos tratamientos, pero una

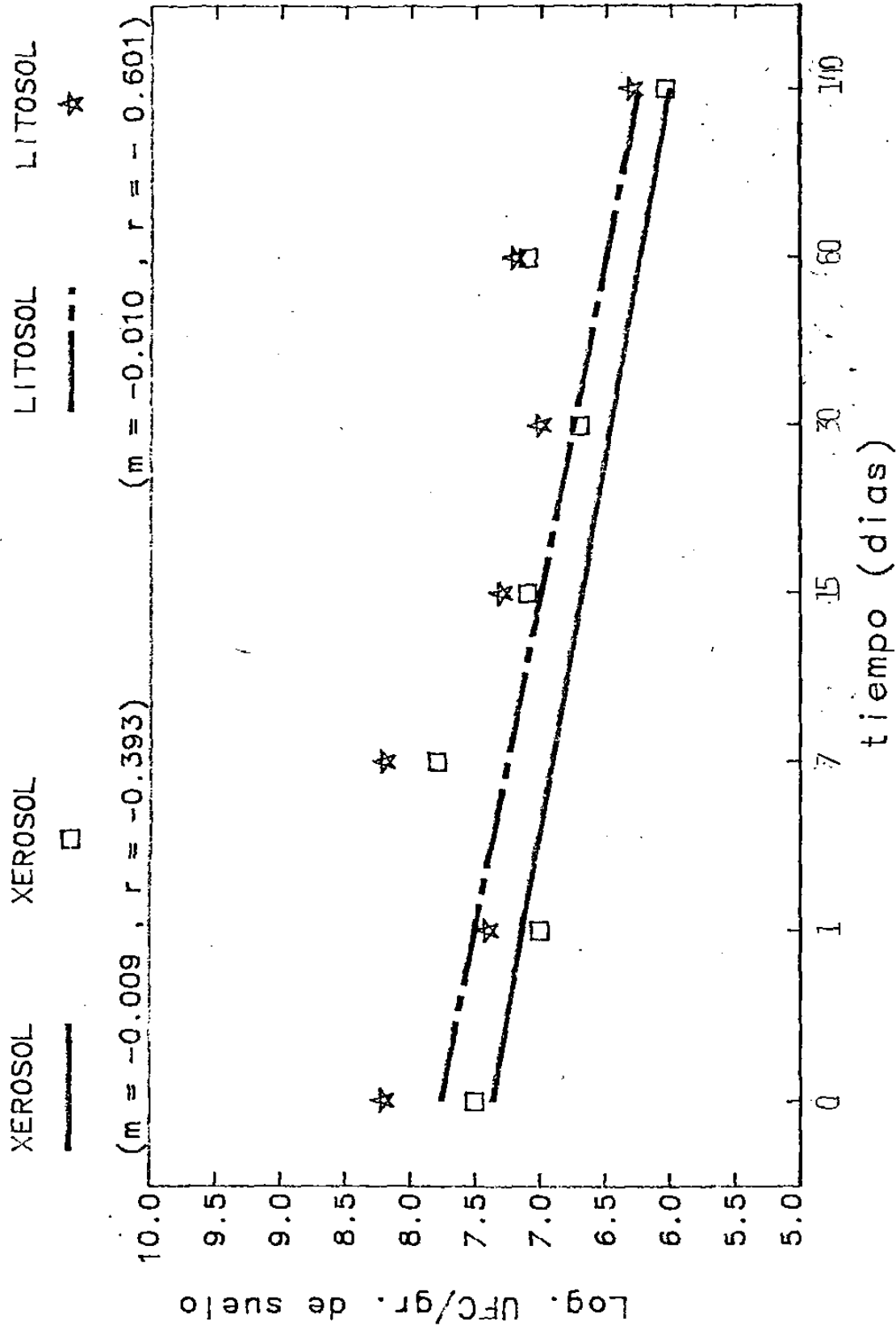
diferencia fue notada al no excluir los organismos nativos que ejercieron sobre este evento de la bacteria en cuestión. Tal efecto se hizo mas notorio en GM-4 cuya germinación inicial de esporas se disminuye drasticamente en este tratamiento y no así en la condición esteril donde importantemente se formaron células vegetativas a partir de esporas (figura 28). Solamente en HD-1 se pudo detectar durante el tiempo de muestreo un incremento en la cantidad de estos propágulos para el tratamiento esteril y curiosamente una mayor germinación en la condición no esteril (figura 29). En apariencia *B. subtilis* no fue afectada en lo que se refiere a la capacidad germinativa de sus esporas por la fracción biótica, ya que líneas de regresión casi paralelas han sido observadas en condiciones esteriles y no esteriles (figura 30). La relativa habilidad de las esporas de *B. thuringiensis* para germinar quizas tenga significancia ecologica. Se ha reconocido que las esporas responden pobremente o no a los germinantes óptimos para *B. subtilis* (Bulla et al. 1980). Dependiendo de la cepa, *B. thuringiensis* puede producir esporas que germinen ya sea lenta o rapidamente. En el intestino de la larva existe poca competencia con otros organismos, así que no se requiere una rápida germinación. Sin embargo, la situación es diferente en el suelo, donde Stahley et al (1978) han considerado que una rápida germinación puede conferirles ventajas en la sobrevivencia. Aunque en nuestro caso no pareció existir diferencias en la velocidad de germinación de esporas entre cepas, si fue evidente que todas germinaron, y esto particularmente fue cierto para HD-1.

CONCLUSIONES

- 1.- Existe diferencia entre la habilidad de las cepas de B. thuringiensis para sobrevivir en suelo.
- 2.- La rápida germinación y esporulación quizá represente un mecanismo de sobrevivencia.
- 3.- Factores ambientales de suelo determinan el " status " poblacional de B. thuringiensis en suelo.

FIG. 1

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-1 en suelo esteril



Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* capa GM-2 en suelo esteril

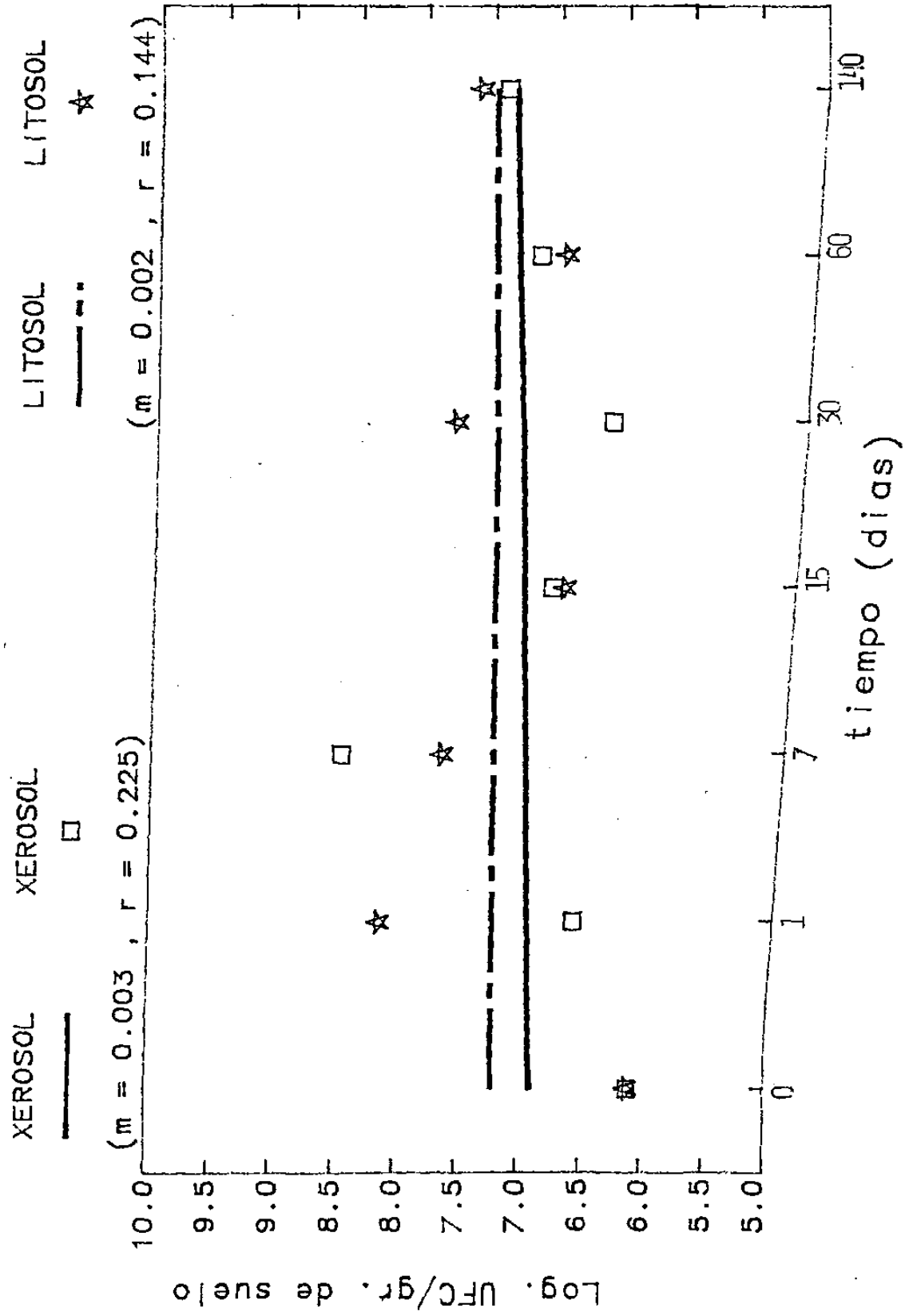


FIG. 3

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-3 en suelo esteril

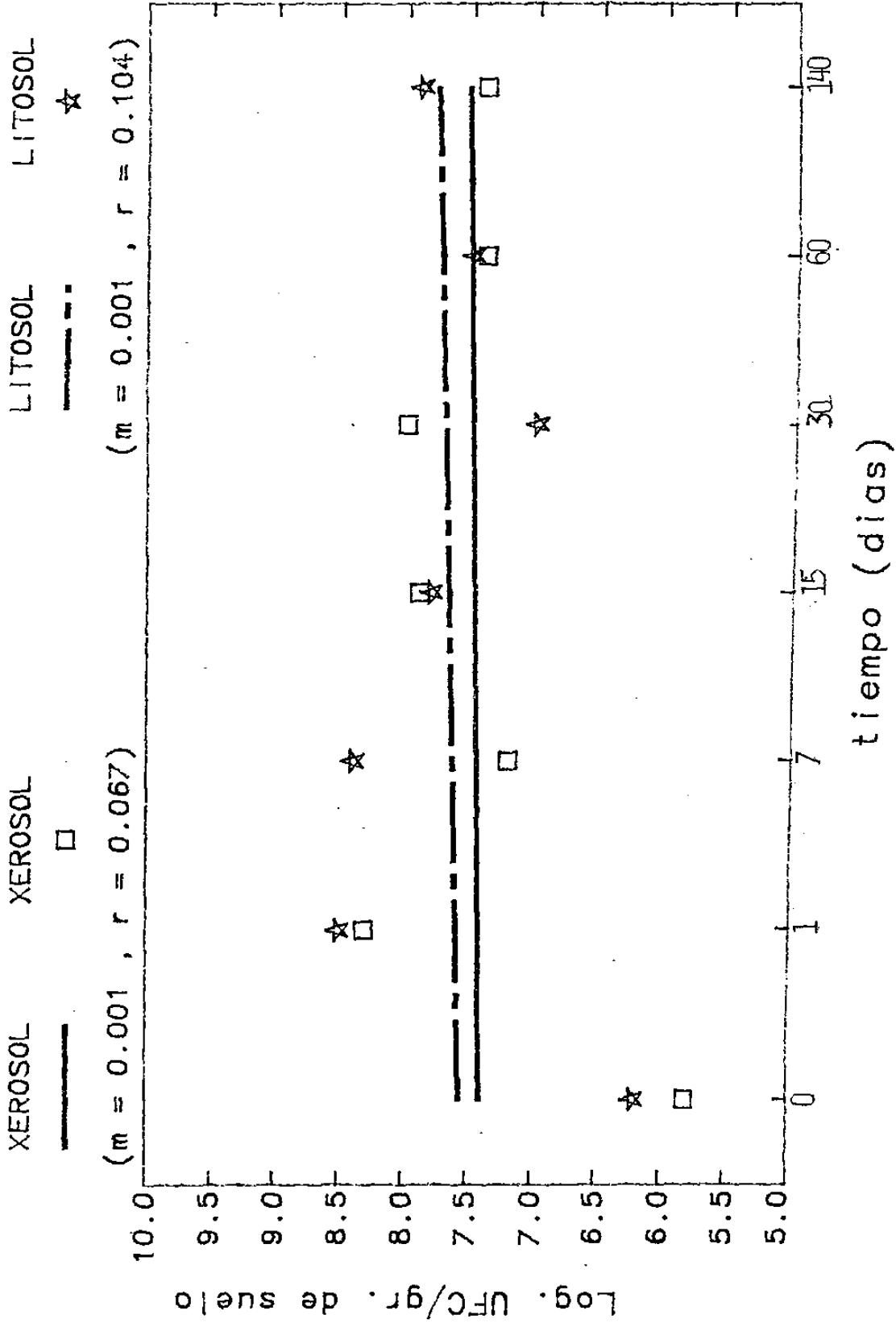


Fig. 4

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-4 en suelo esteril

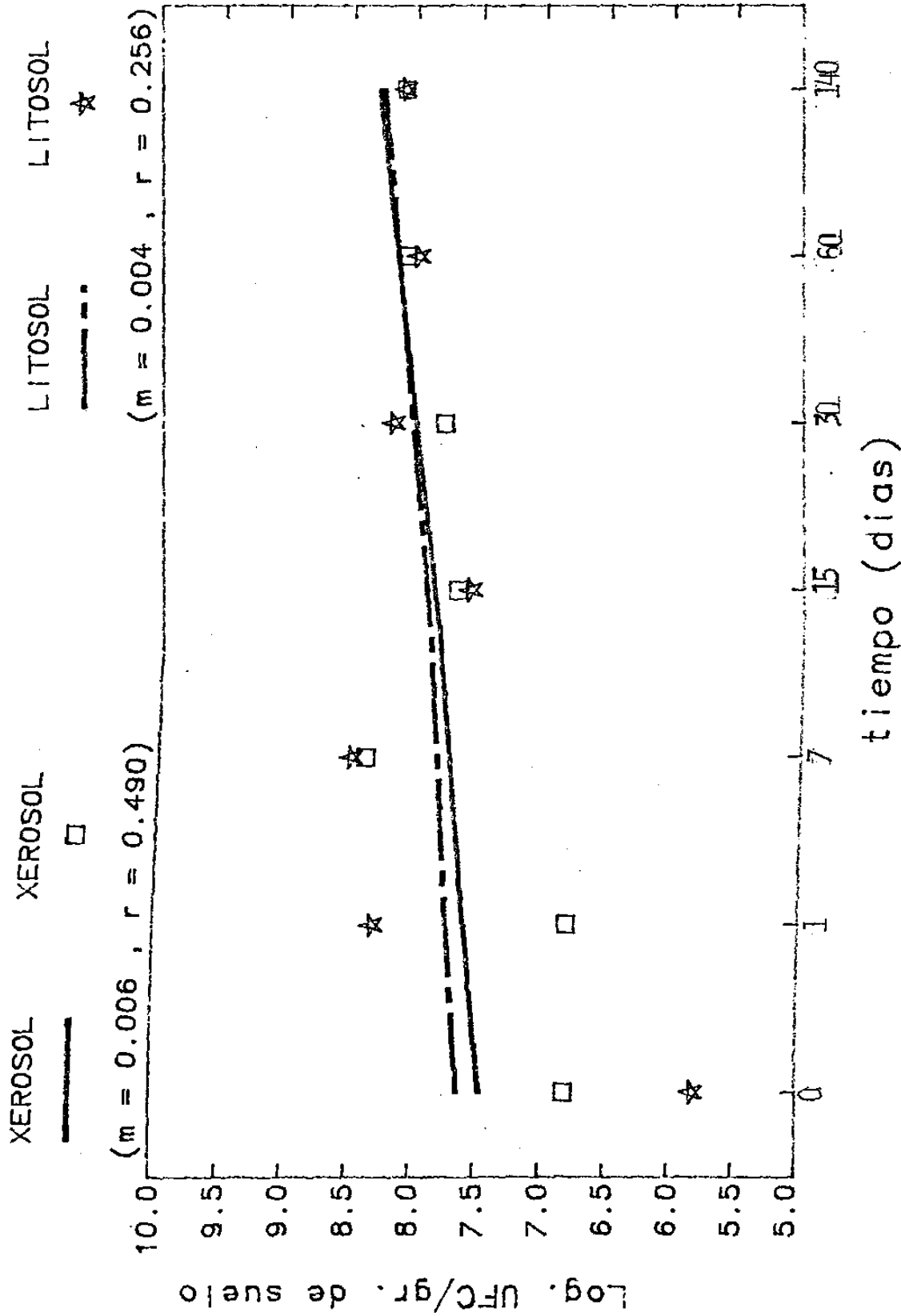


Fig. 5

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-5 en suelo esteril

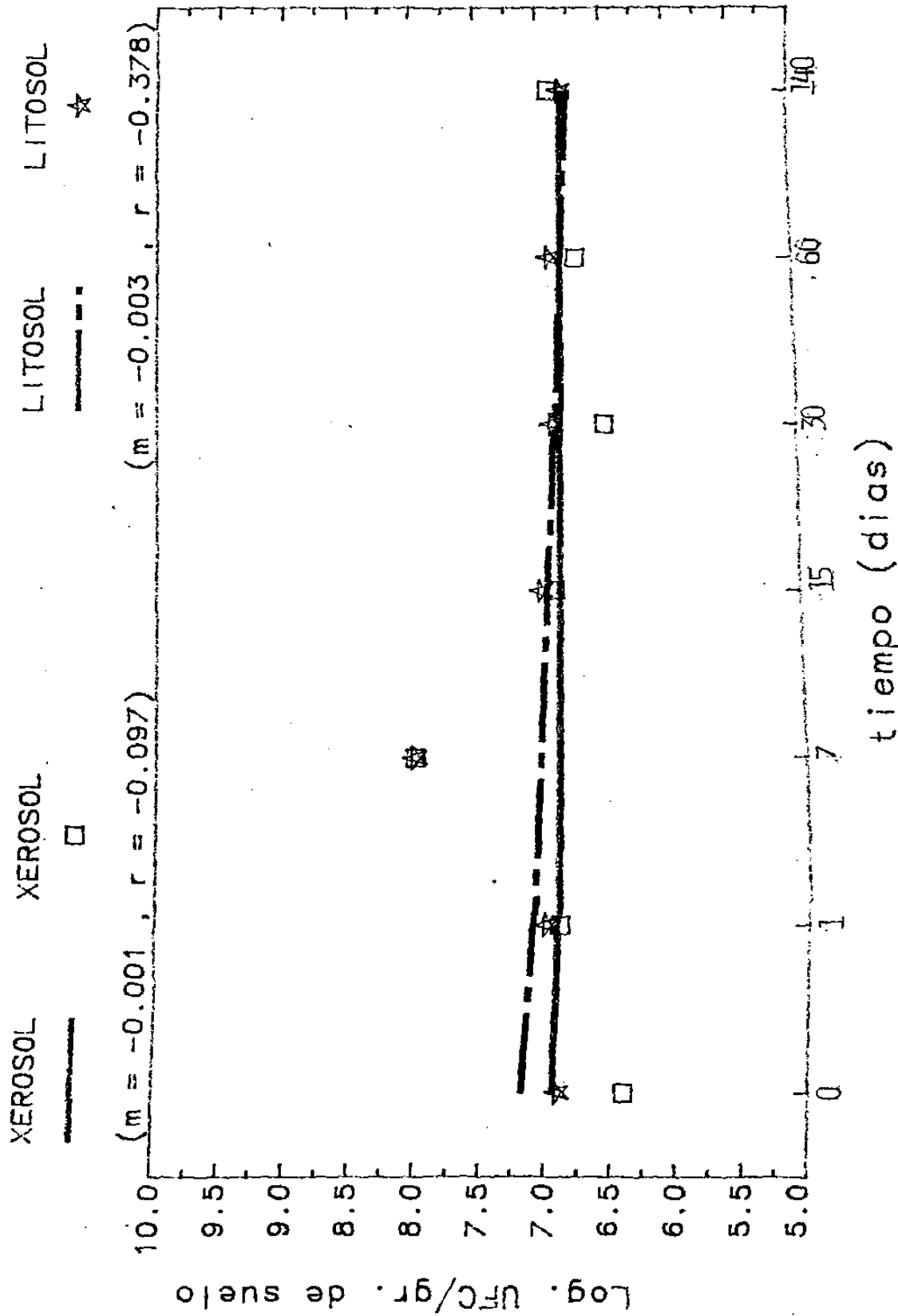


FIG. 7

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-7 en suelo esteril

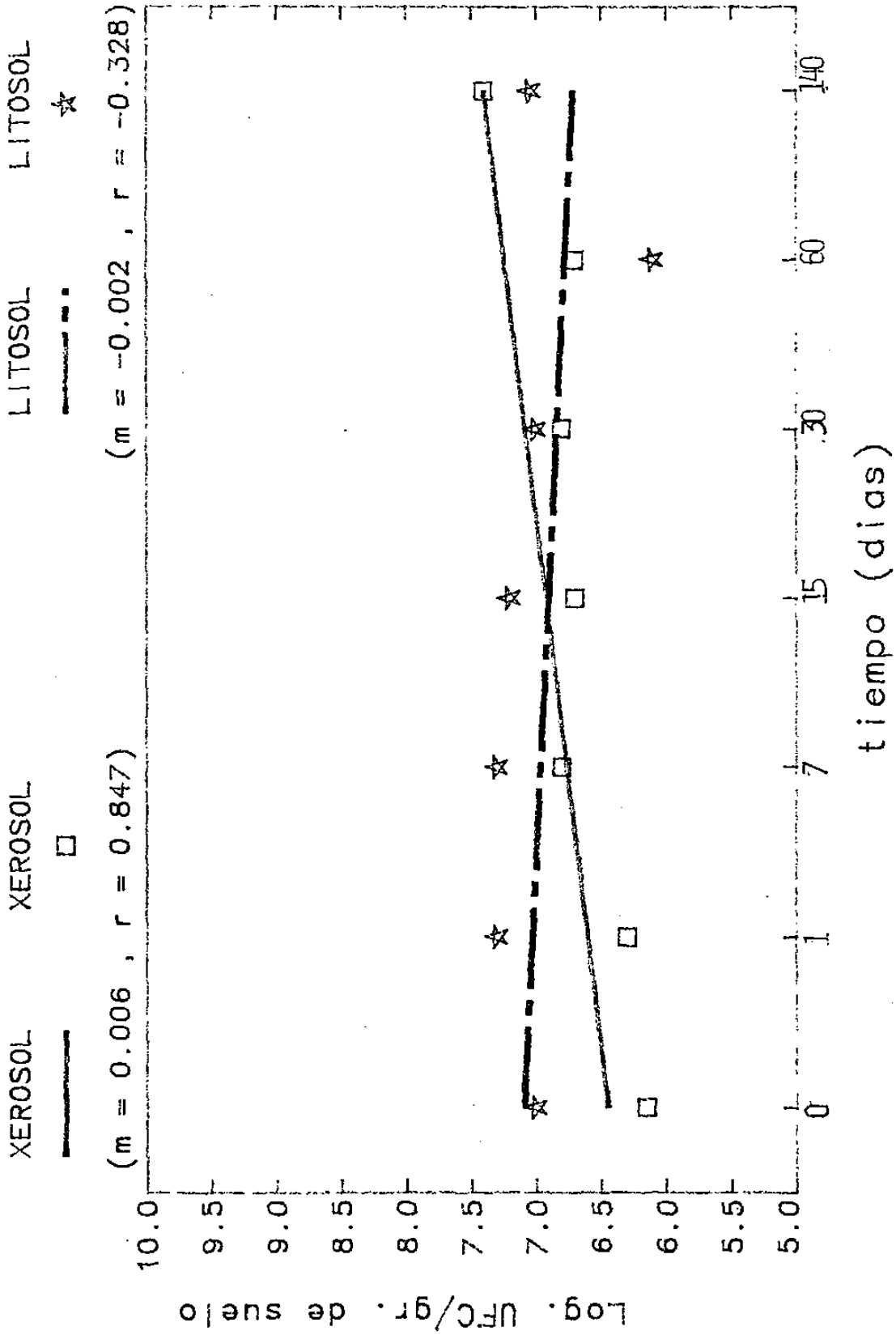


FIG. 8

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-8 en suelo esteril

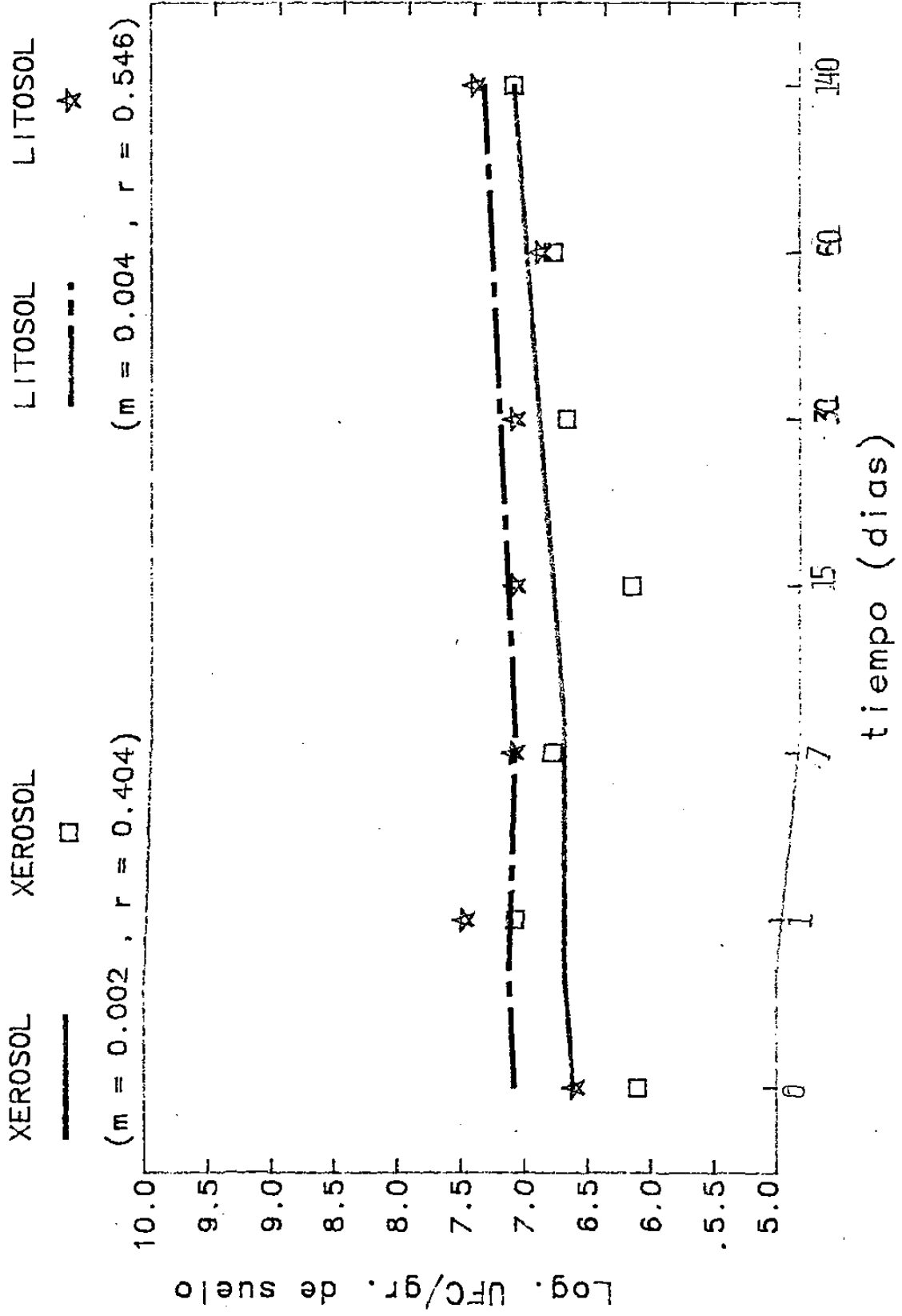


Fig. 9

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-9 en suelo esteril

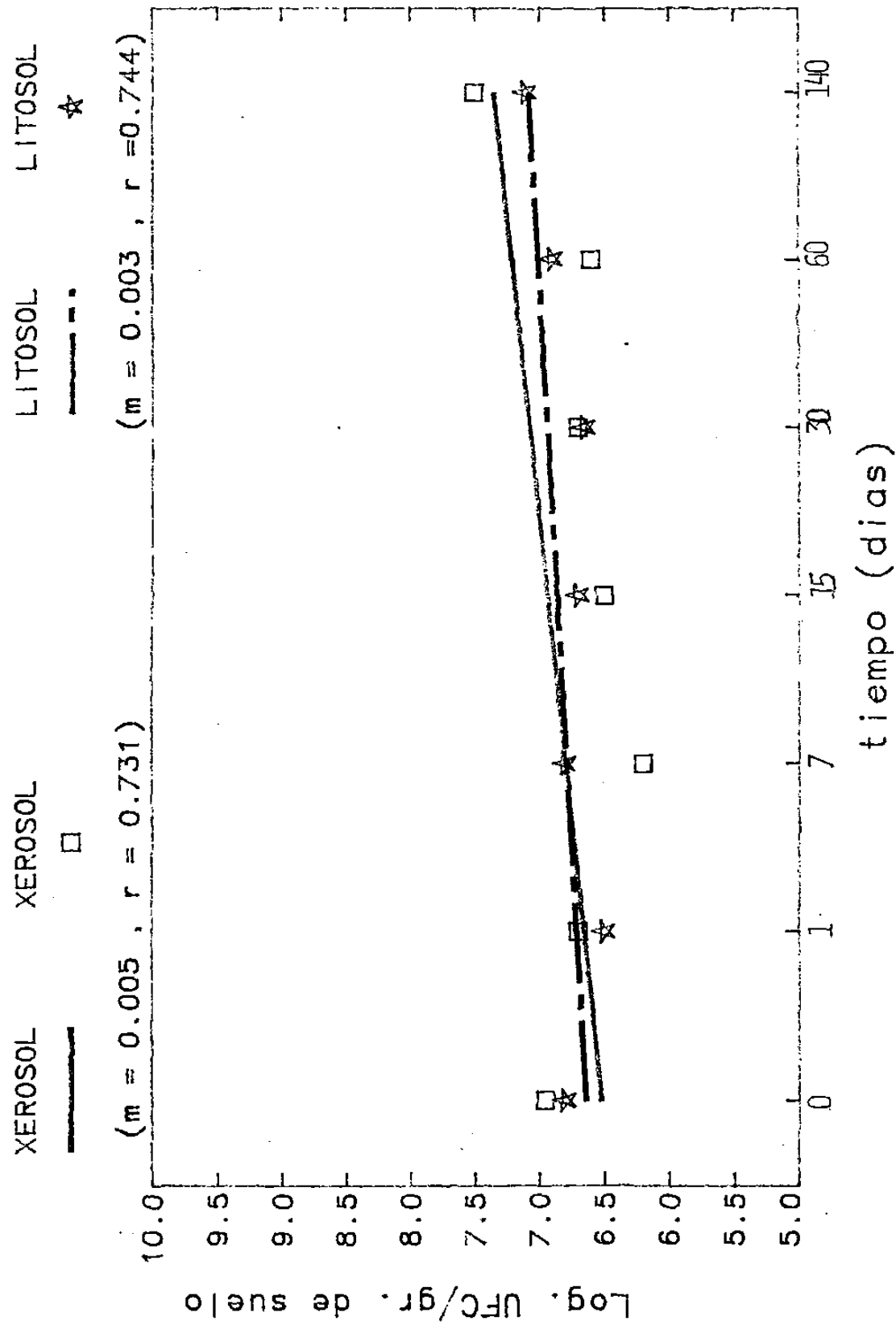


FIG. 10

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-10 en suelo esteril

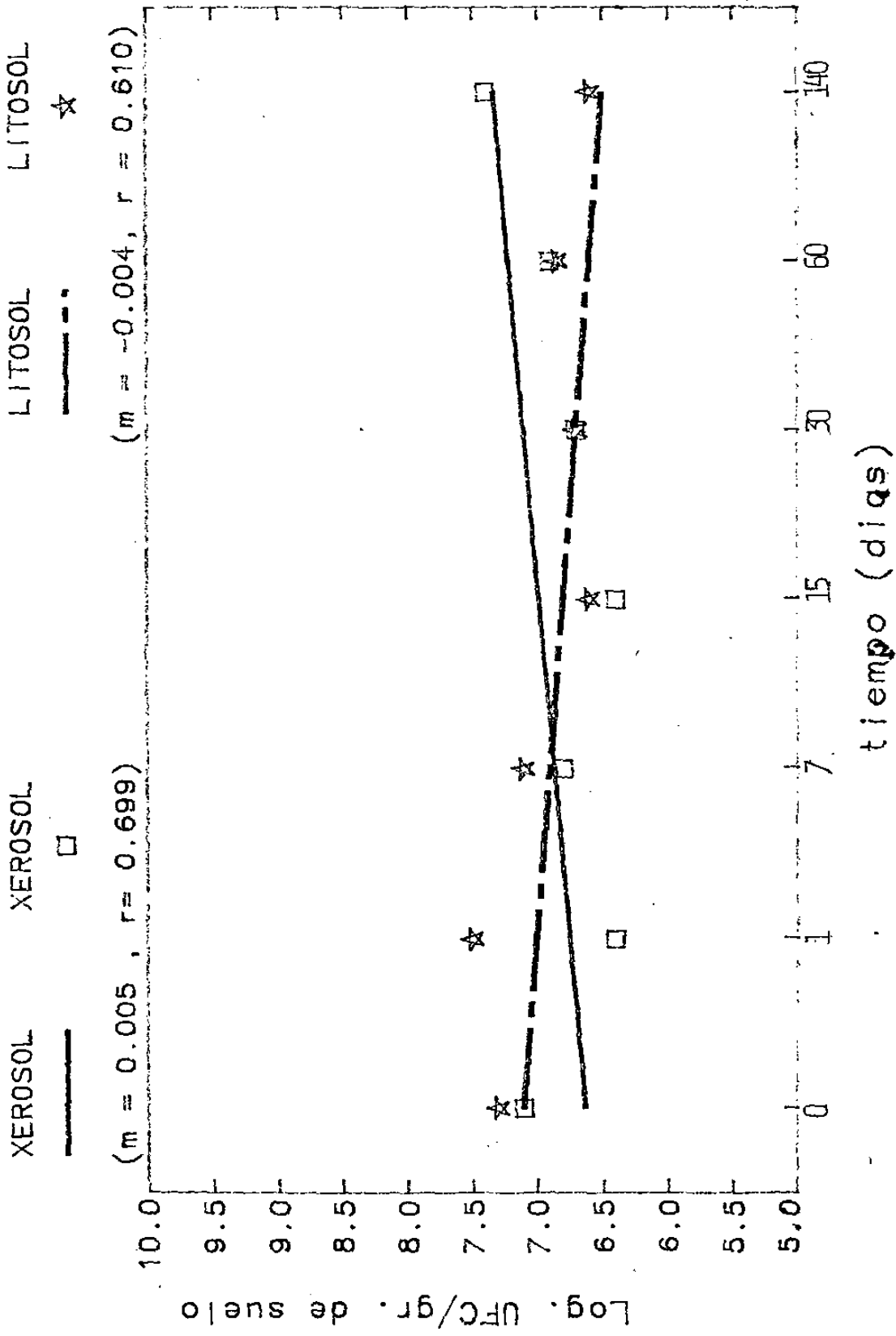


Fig. II

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de Bacillus thuringiensis cepa GM-11 en suelo esteril

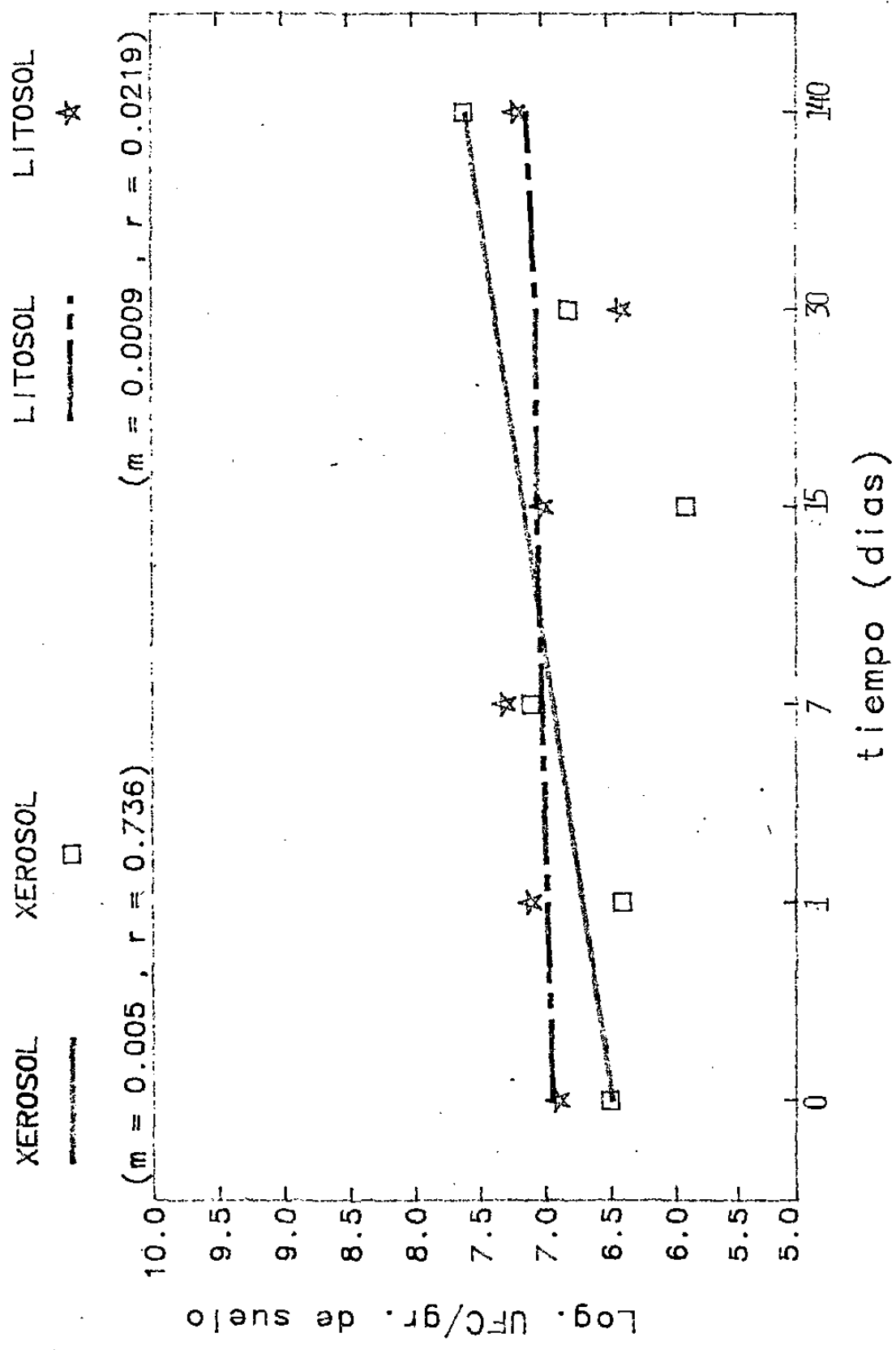
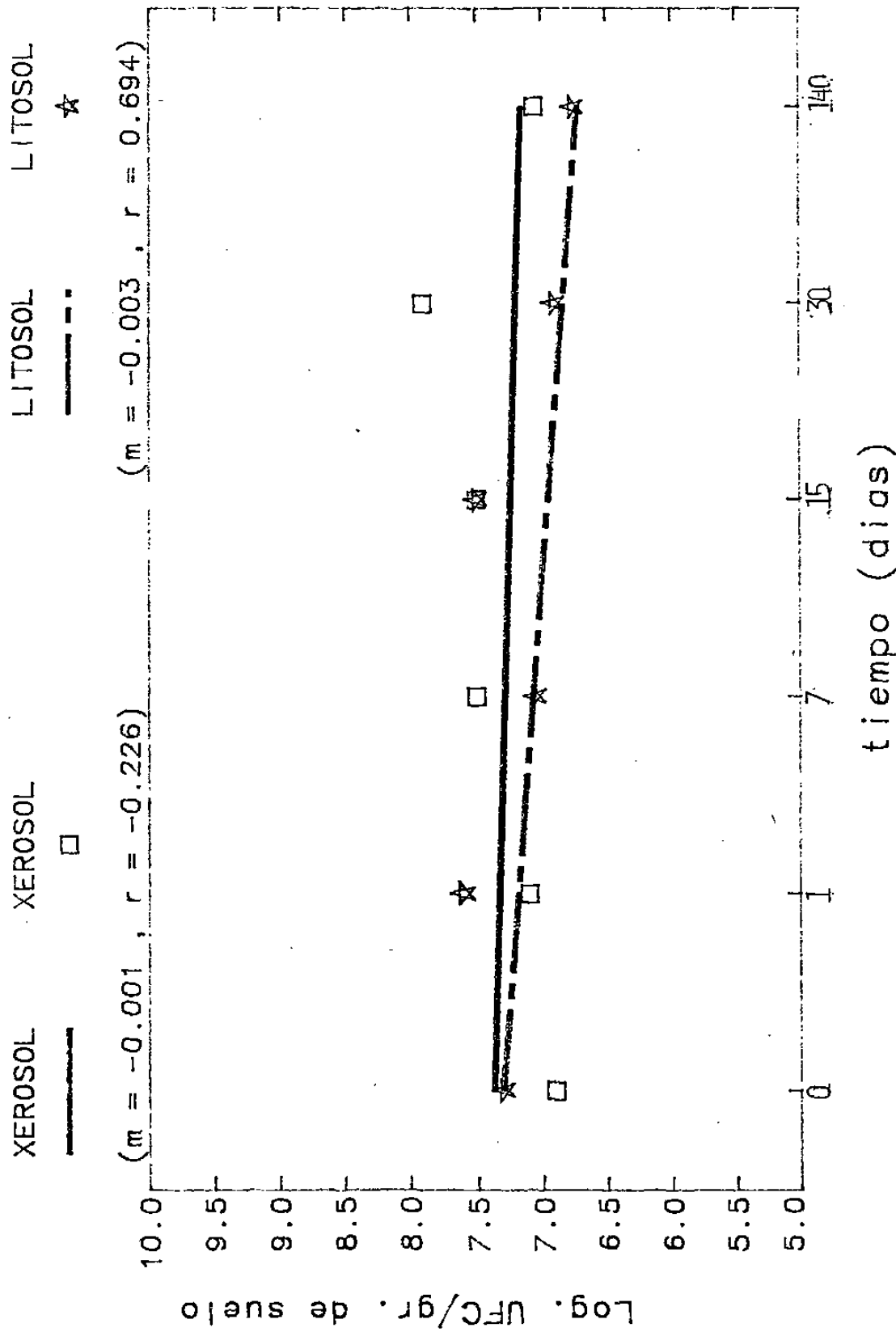


Fig. 12

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-12 en suelo esteril



Analisis de regresion lineal paraq la sobrevivencia de
Bacillus thuringiensis cepa GM-13 en suelo esteril

XEROSOL

XEROSOL
□

LITOSOL

LITOSOL

★

(m = 0.001 , r = 0.479)

(m = 0.0004 , r = 0.144)

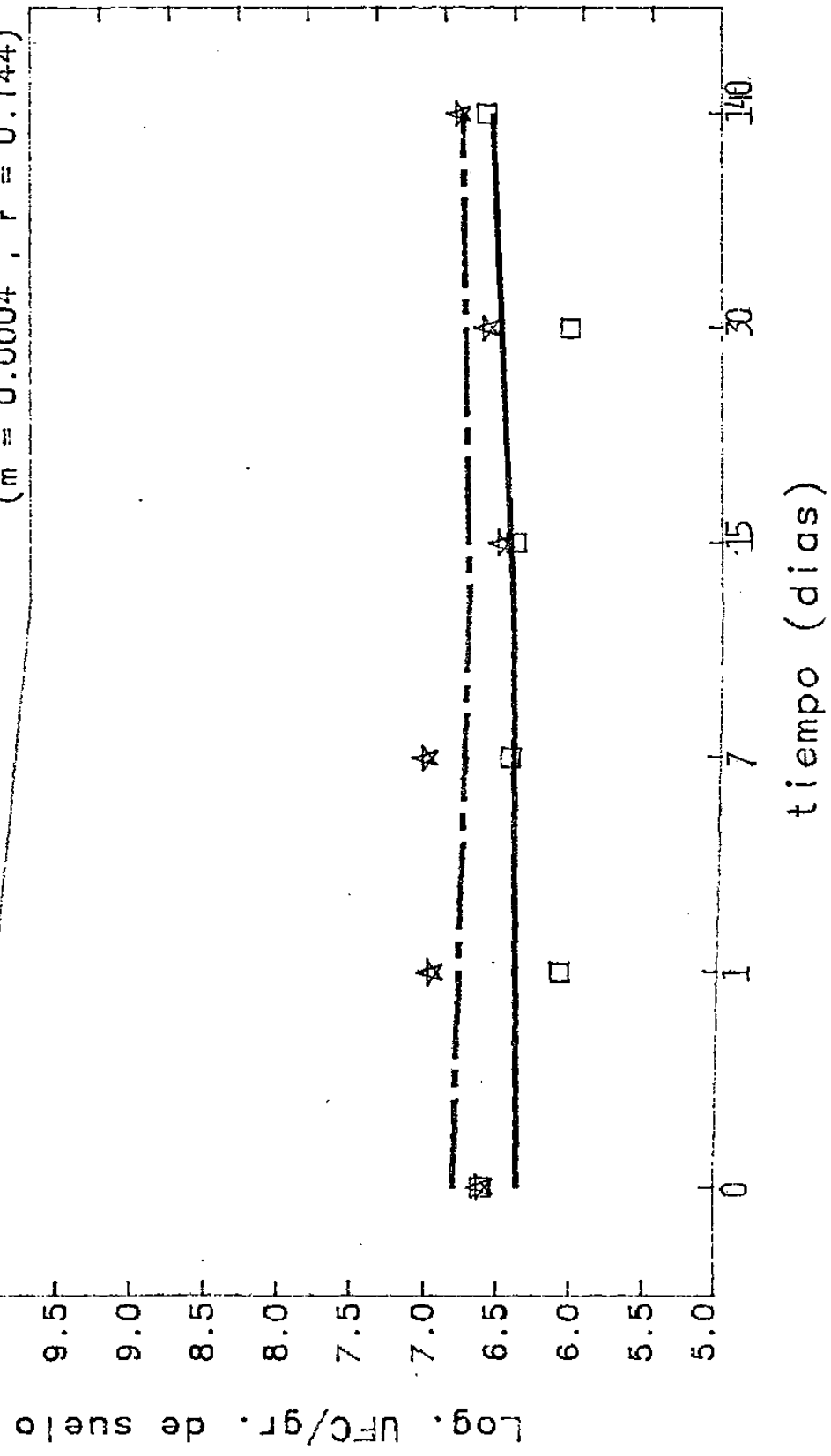
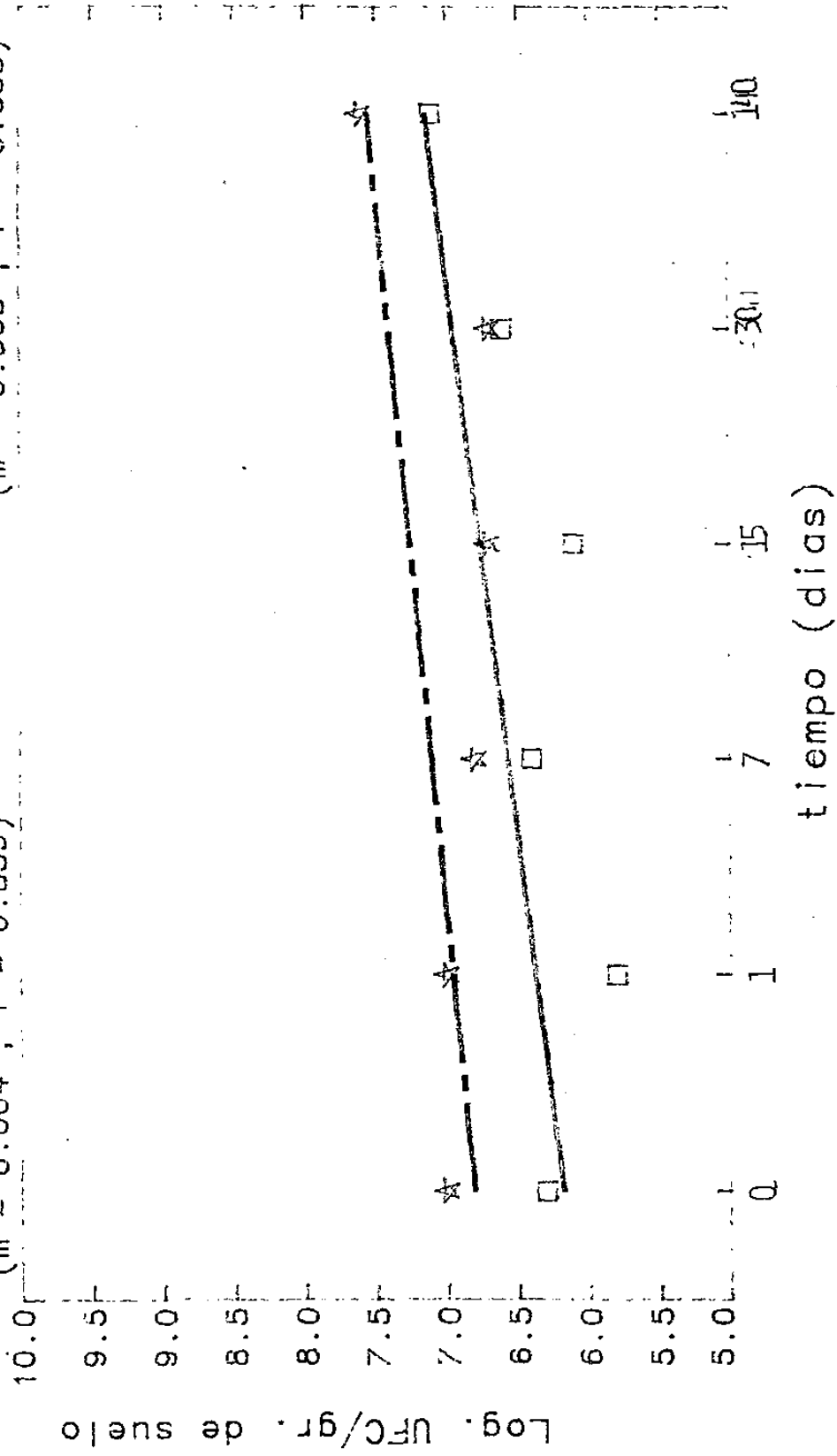


Fig. 14

Fig. 14

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-14 en suelo esteril

XEROSOL XEROSOL LITOSOL LITOSOL
 — □ — — ★
 (m = 0.004, r = 0.839) (m = 0.003, r = 0.855)



Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de
Bacillus thuringiensis cepa GM-15 en suelo esteril

XEROSOL XEROSOL LITOSOL LITOSOL

— □ — ☆

($m = 0.002$, $r = 0.598$)

($m = 0.001$, $r = 0.286$)

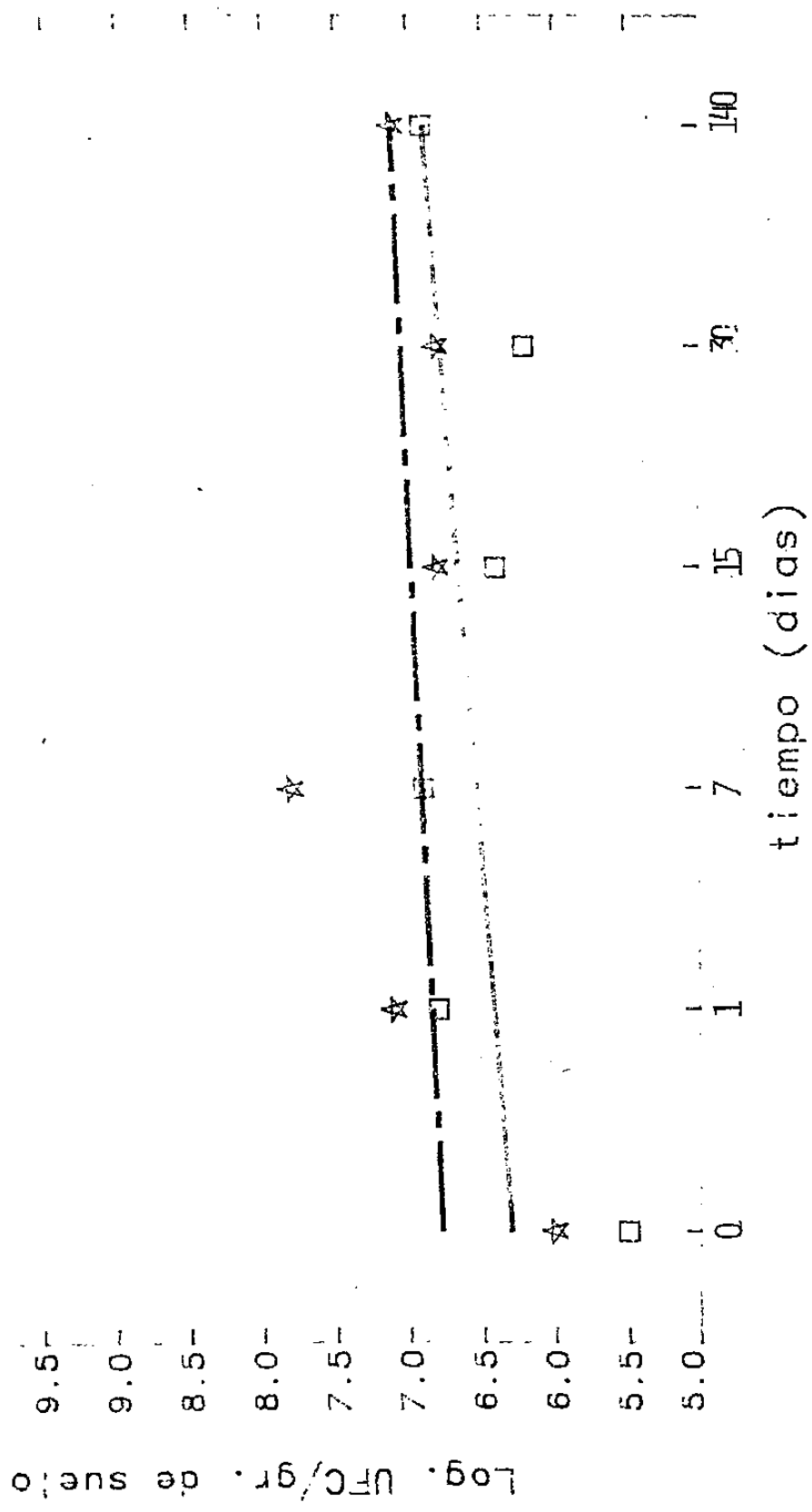


Fig. 16

Análisis de regresión lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-16 en suelo estéril

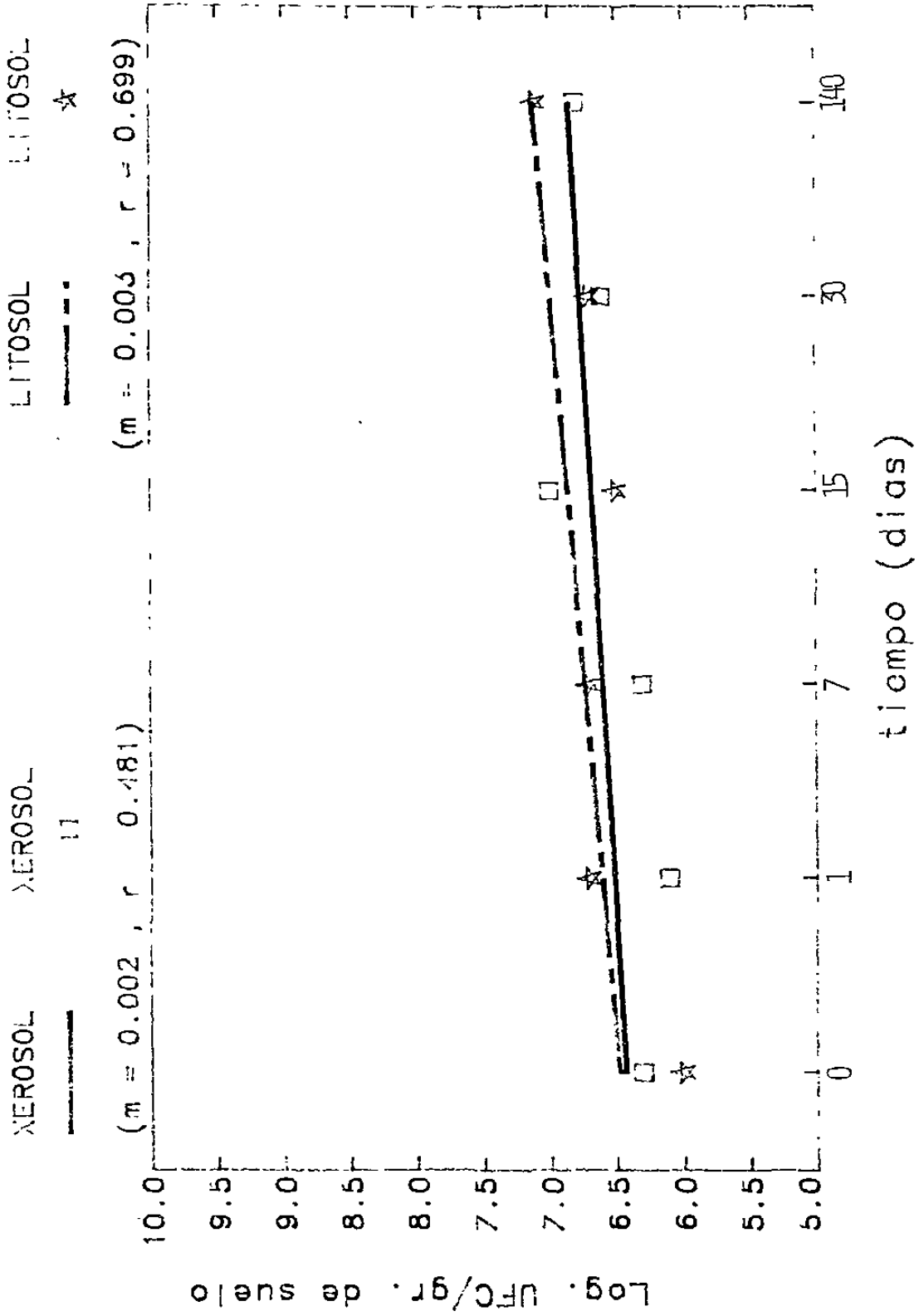


Fig. 17

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-17 en suelo esteril

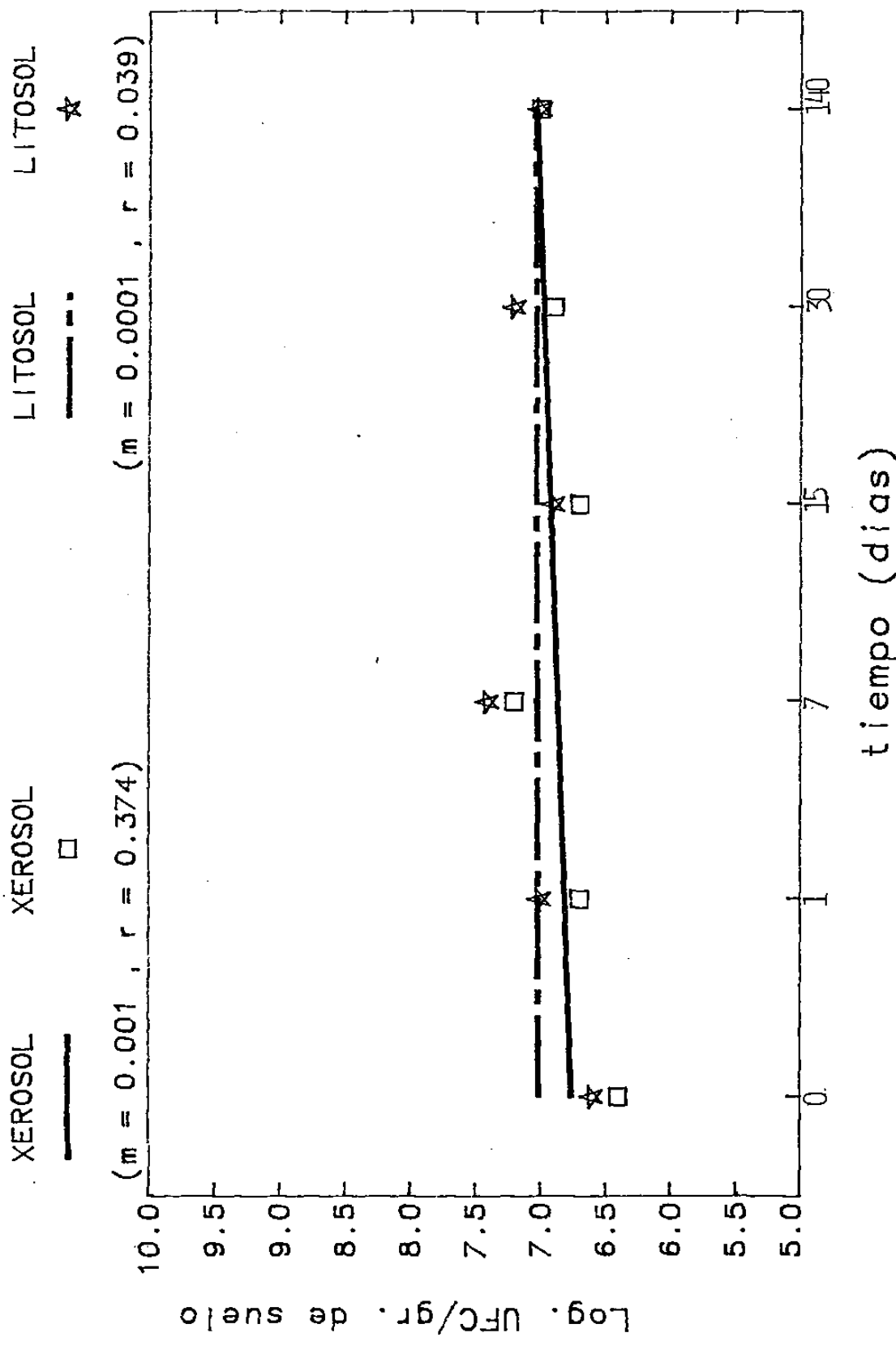


Fig. 18

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-18 en suelo esteril

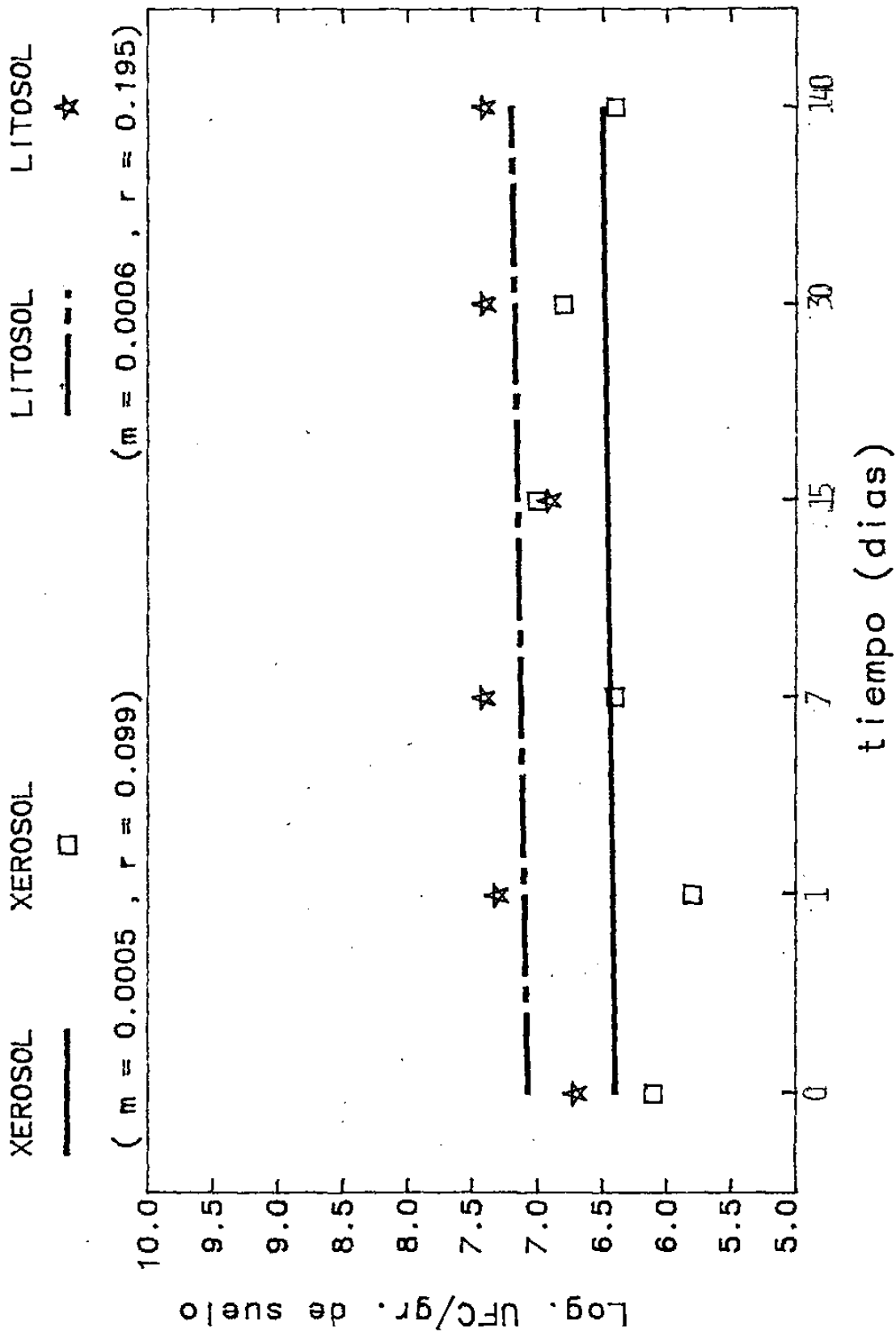


Fig. 19

Análisis de regresión lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-19 en suelo estéril

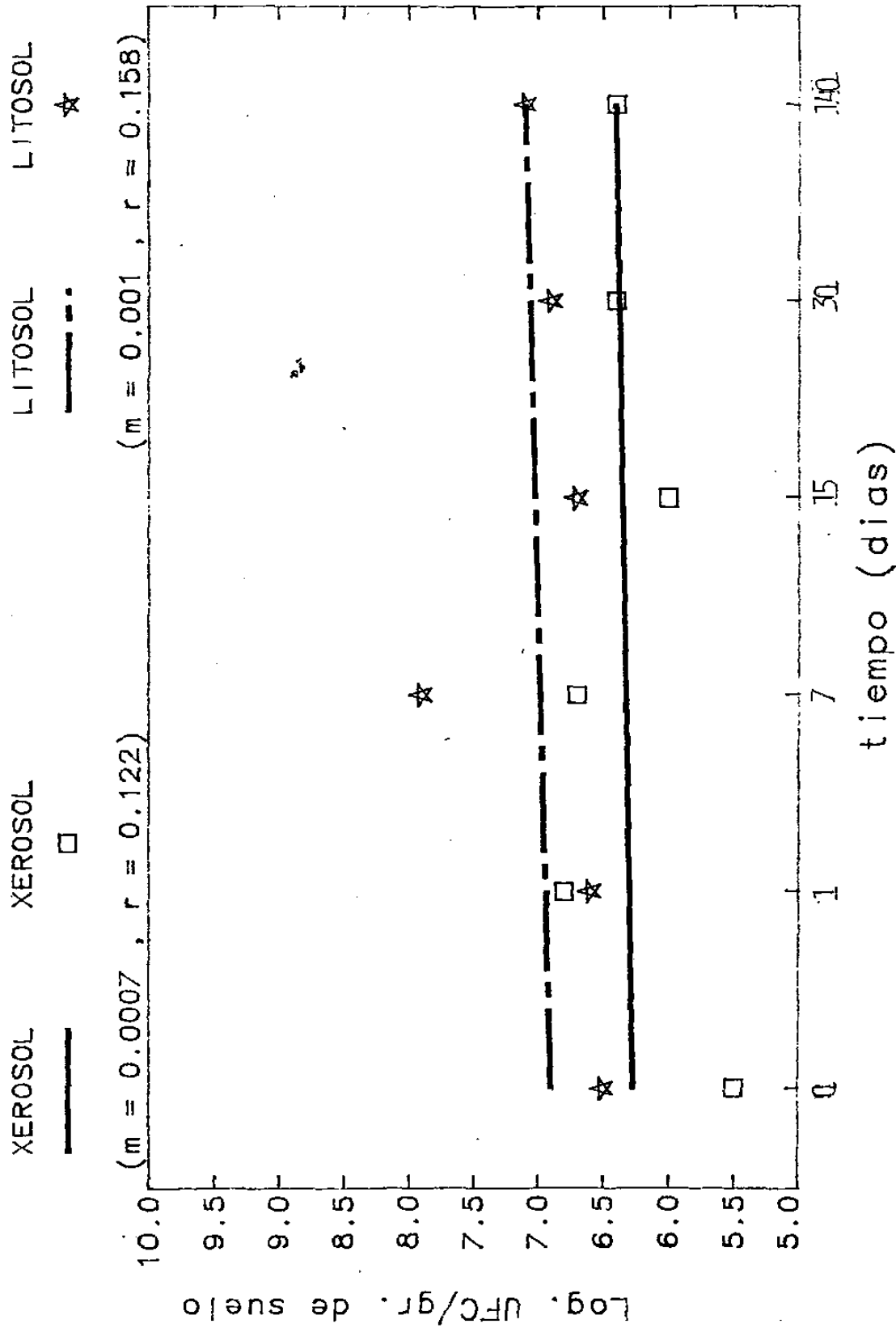


Fig. 20

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-20 en suelo esteril

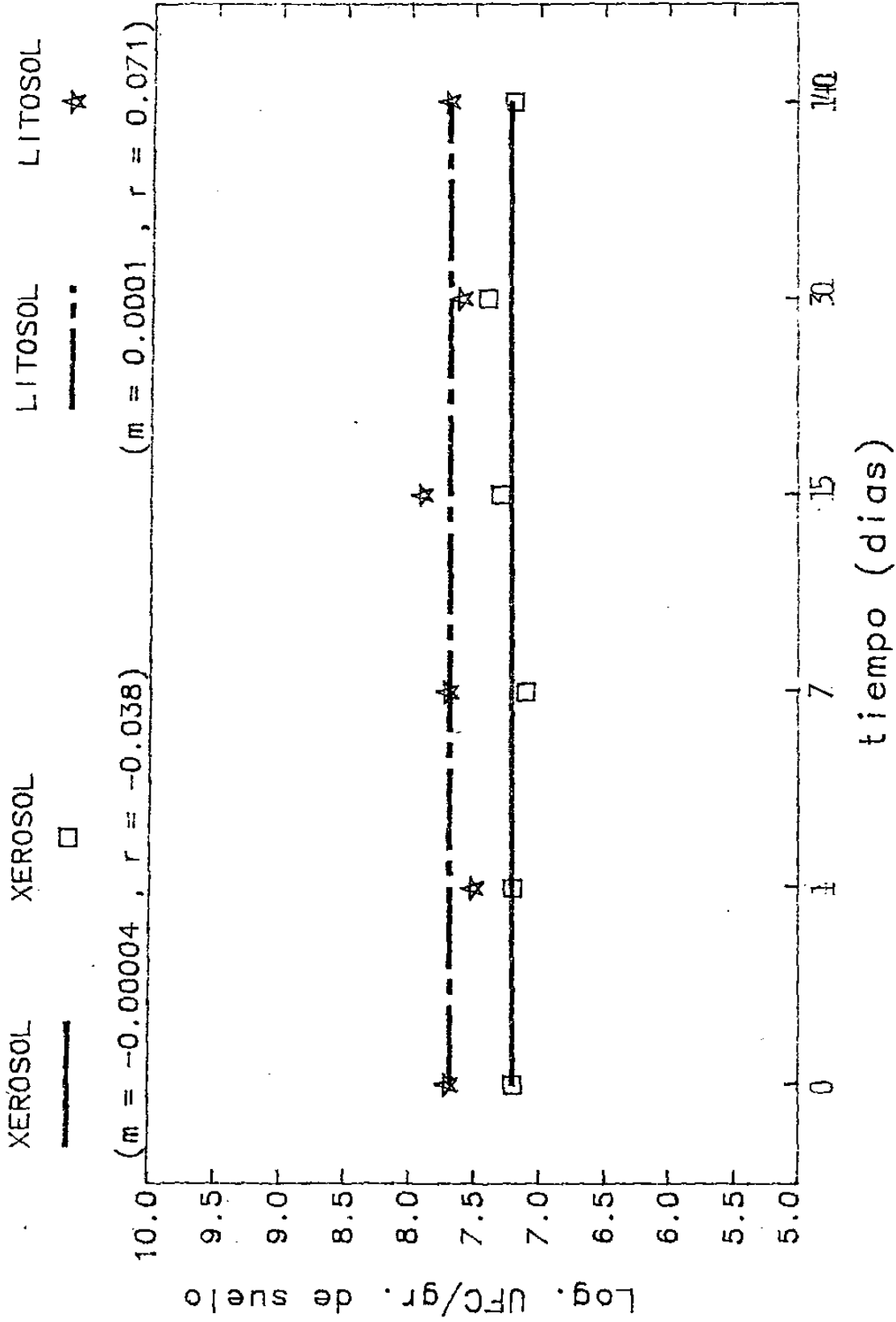
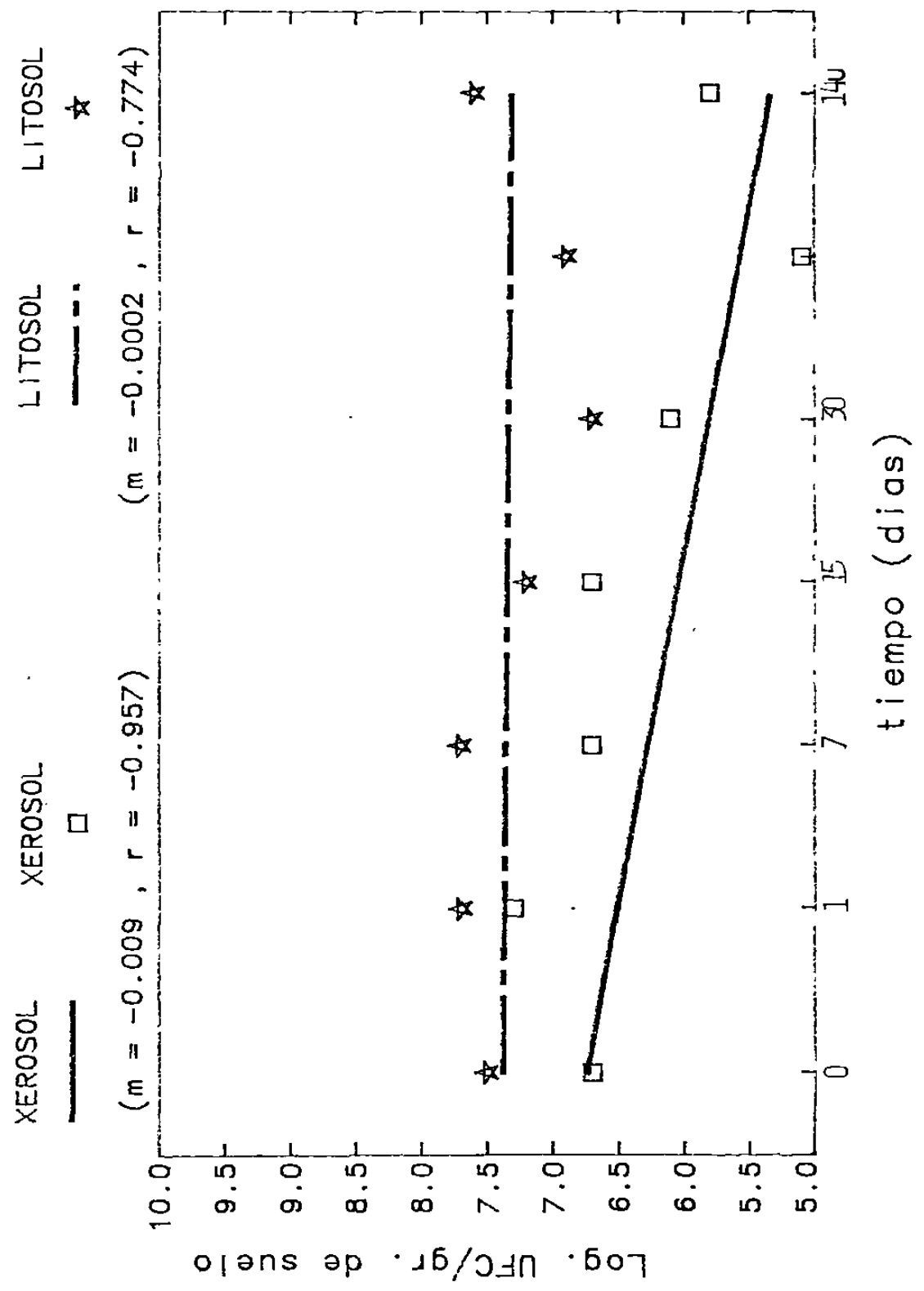


FIG. 21

Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* cepa HD-1 en suelo esteril



Analisis de regresion lineal para la sobrevivencia de Bacillus Subtilis en suelo esteril

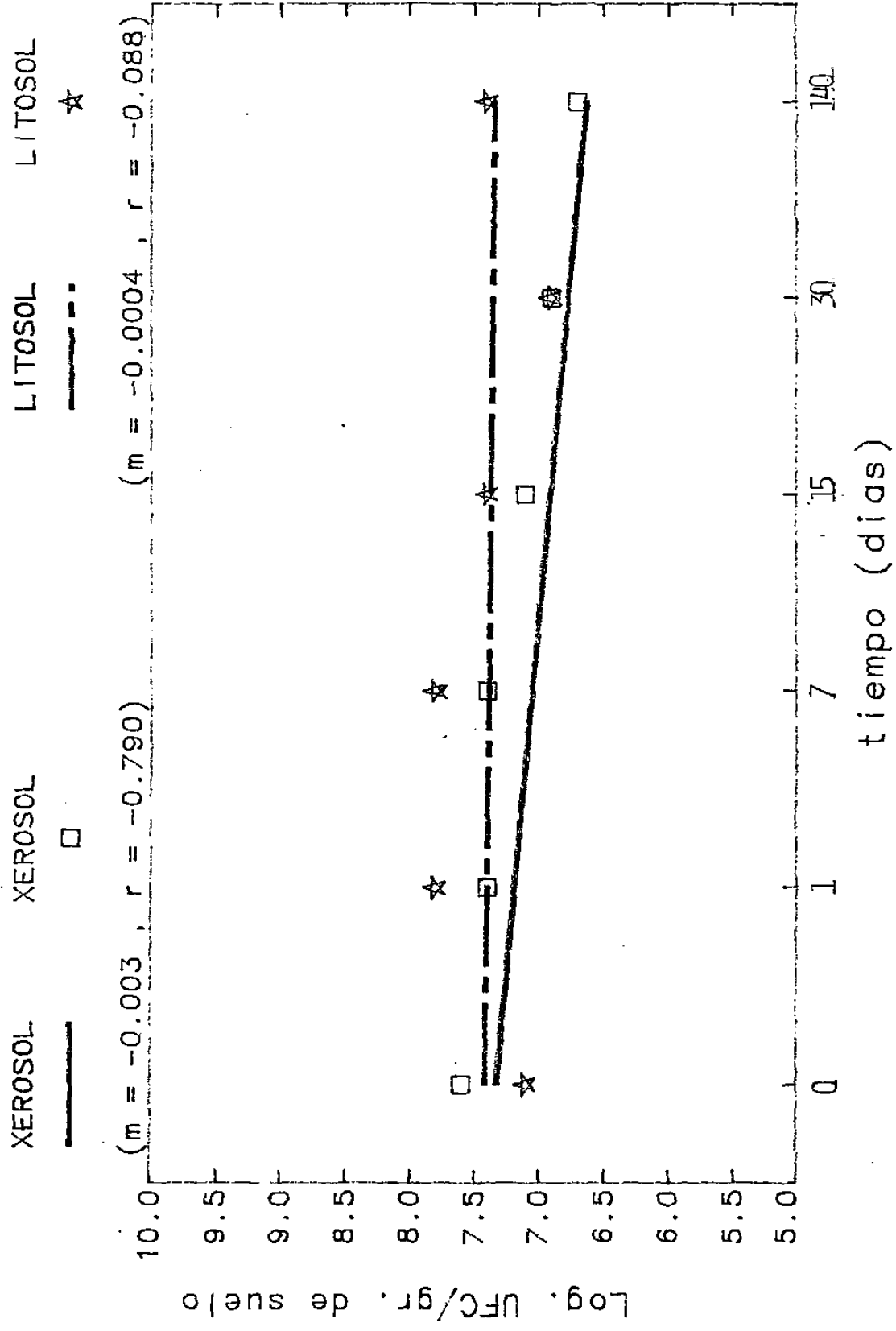


Tabla 4.- Comparacion del valor de las pendientes (m) en las lineas de regresion para la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* en suelo esteril.

Cepa	(m)	
	xerosol	litosol
GM-1	- 0.0091 a	- 0.0109 a
GM-2	0.0035 a	0.0020 a
GM-3	0.0011 a	0.0017 a
GM-4	0.0062 a	0.0046 a
GM-5	- 0.0010 a	- 0.0030 a
GM-6	0.0009 a	0.0009 a
GM-7	0.0068 a	- 0.0027 b
GM-8	0.0041 a	0.0025 a
GM-9	0.0059 a	0.0032 a
GM-10	0.0050 a	- 0.0043 b
GM-11	0.0058 a	0.0009 a
GM-12	- 0.0011 a	- 0.0031 a
GM-13	0.0016 a	0.0004 a
GM-14	0.0049 a	0.0038 a
GM-15	0.0029 a	0.0017 a
GM-16	0.0022 a	0.0033 a
GM-17	0.0040 a	0.0004 a
GM-18	0.0005 a	0.0006 a
GM-19	0.0007 a	0.0011 a
GM-20	- 0.00004 a	0.0002 a
HD-1	- 0.0091 a	- 0.0002 a
BS-FCB-1	- 0.0036 a	- 0.0004 a

Las comparaciones estadisticas entre los suelos se hacen dentro del mismo renglon; valores seguidos por letras diferentes, representan diferencias significativas (P = 0.05).

Tabla 1.- Produccion de cristal paraesporal por cepas de *Bacillus thuringiensis* recuperadas 6 meses despues de su incorporacion a suelos esteriles.

Cepa	Produccion de cristal	
	xerosol	litosol
GM-1	+	+
GM-2	+	+
GM-3	+	+
GM-4	+	+
GM-5	+	+
GM-6	+	+
GM-7	+	+
GM-8	+	+
GM-9	+	+
GM-10	+	+
GM-11	+	+
GM-12	+	+
GM-13	+	+
GM-14	+	+
GM-15	+	+
GM-16	+	+
GM-17	+	+
GM-18	+	+
GM-19	+	+
GM-20	+	+
HD-1	+	+

+ = Presencia de cristal en 10 colonias de *Bacillus thuringiensis* analizadas por cepa.

Cinetica de Esporulacion de *Bacillus thuringiensis*

Cepa GM-1 en suelo esteril de tipo xerosol

CELULA VEGETATIVA

CELULA VEGETATIVA

□

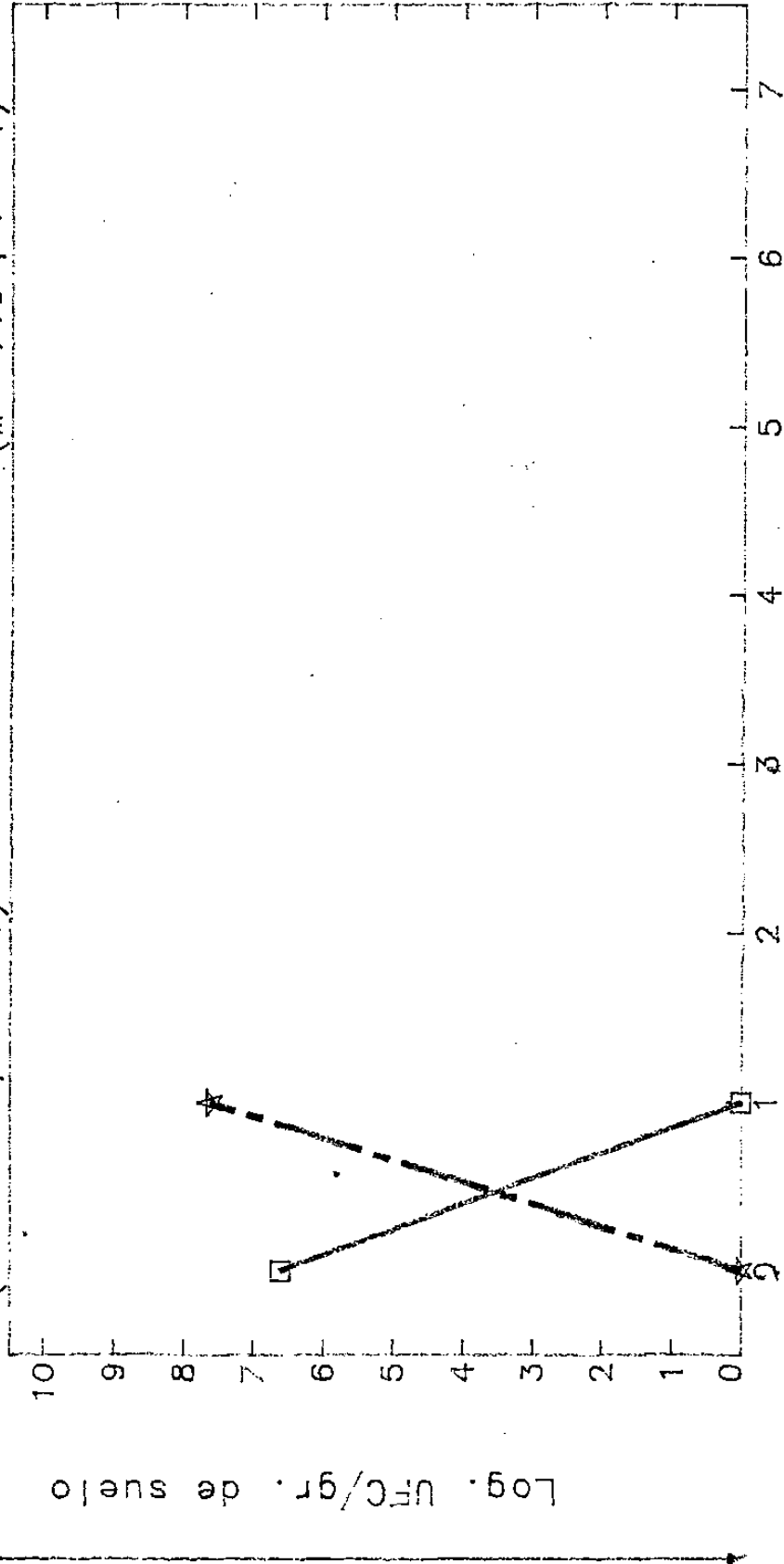
ESPORAS

ESPORAS

★

($m = -6.6$, $r = -1$)

($m = 7.6$, $r = 1$)



tiempo (dias)

Cinetica de Esporulación de *Bacillus thuringiensis*

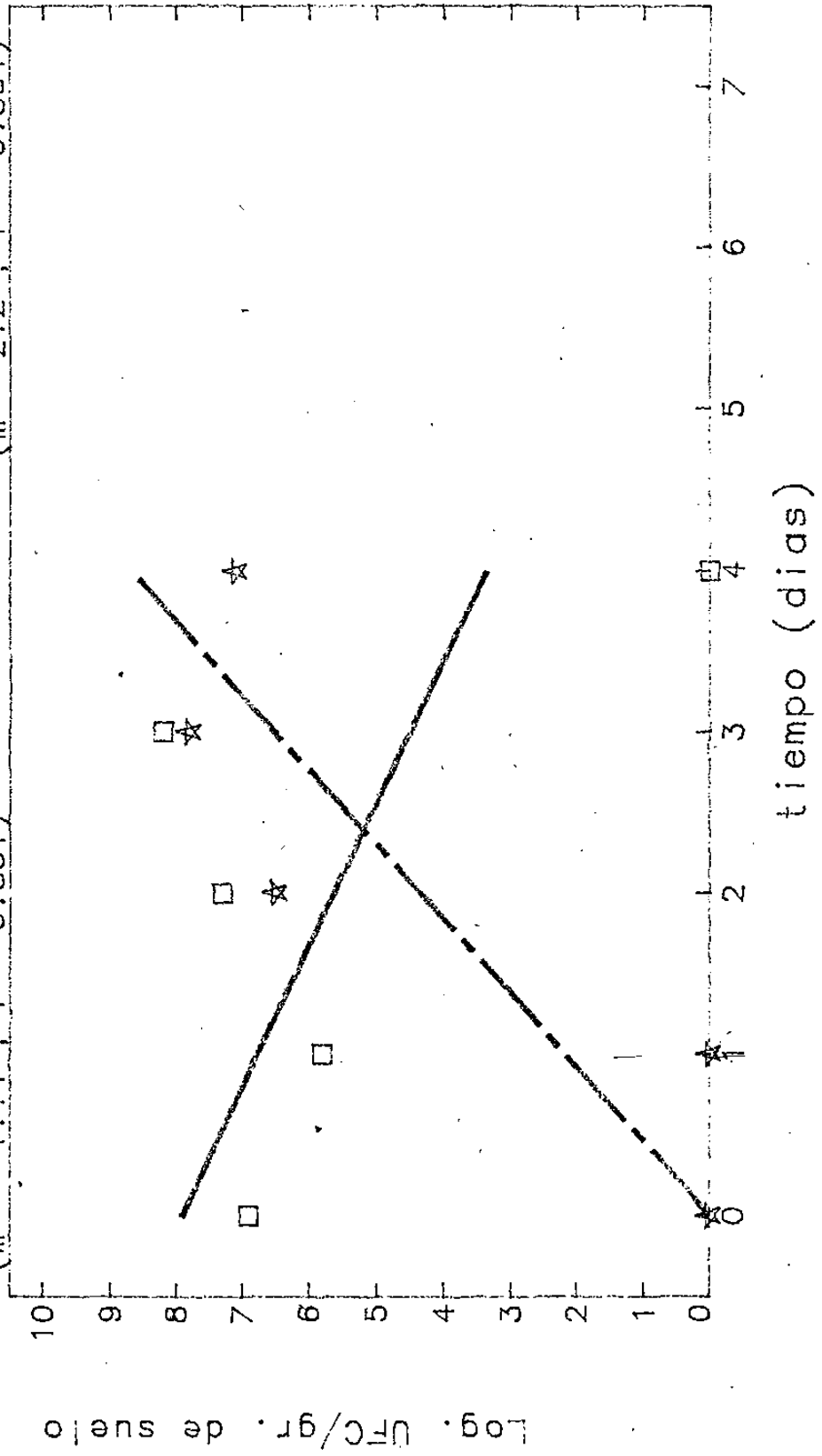
Cepa GM-4 en suelo esteril de tipo xerosol

CELULA VEGETATIVA □

ESPORAS ☆

($m = -1.14$, $r = 0.551$)

($m = 2.2$, $r = 0.884$)



Cinetica de Esporulacion de *Bacillus thuringiensis*

Cepa HD-1 en suelo esteril de tipo xerosol

CELULA VEGETATIVA

—

□

CELULA VEGETATIVA

□

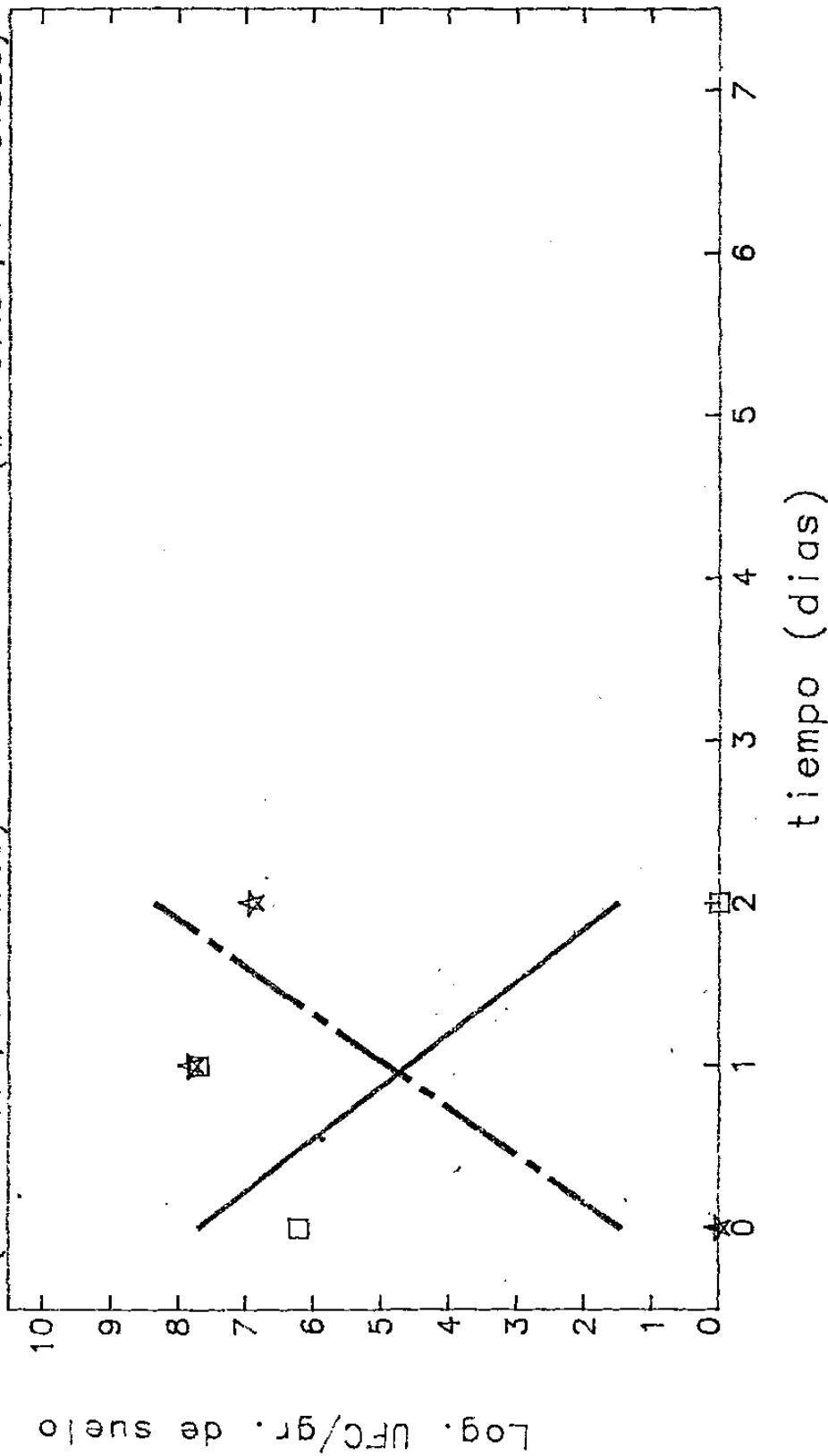
ESPORAS

ESPORA

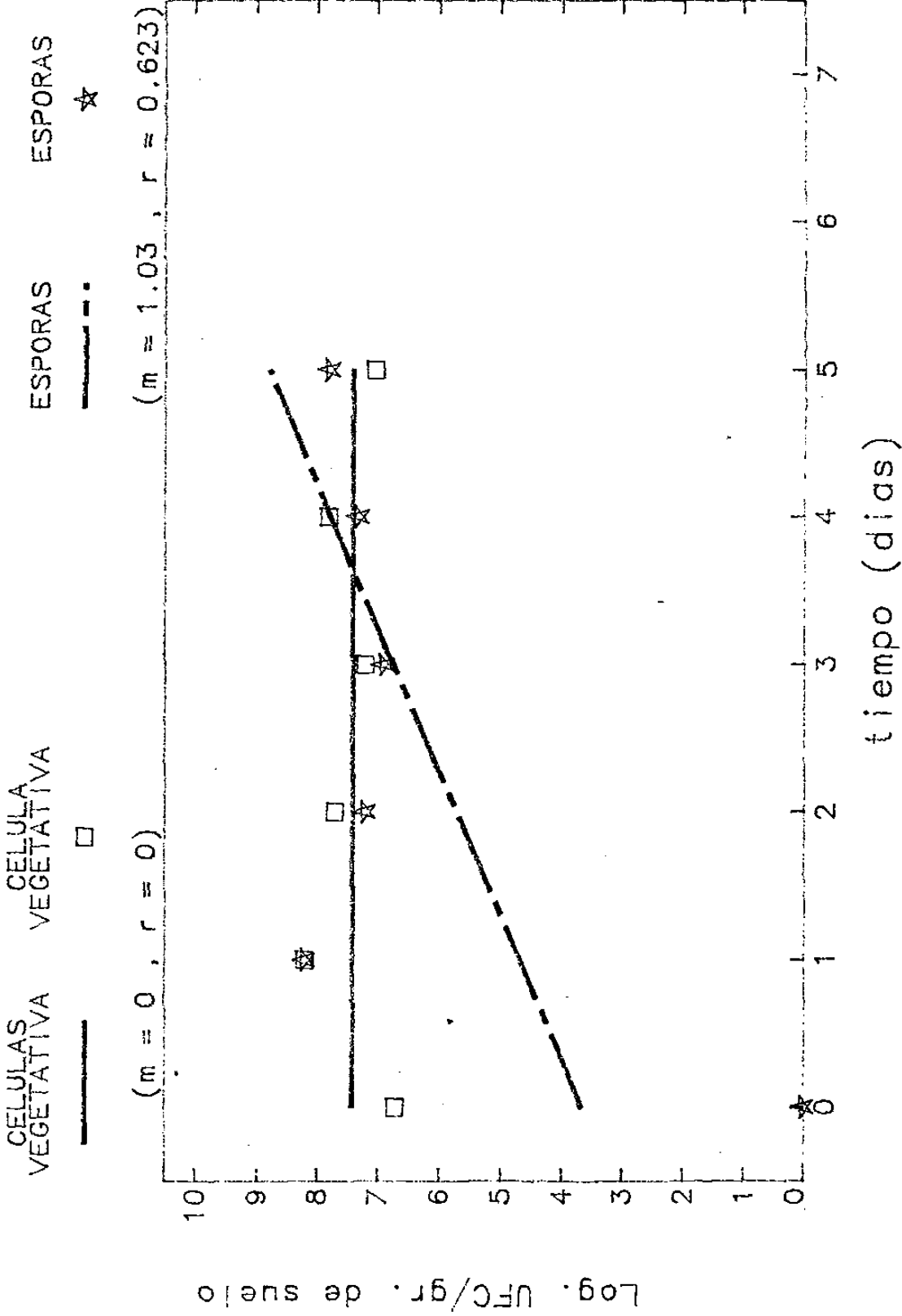
★

($m = -3.1$, $r = 0.759$)

($m = 3.45$, $r = 0.808$)



Cinética de Esporulación de Bacillus subtilis
 en suelo estéril de tipo xerosol



Germinacion de esporas de *Bacillus thuringiensis*

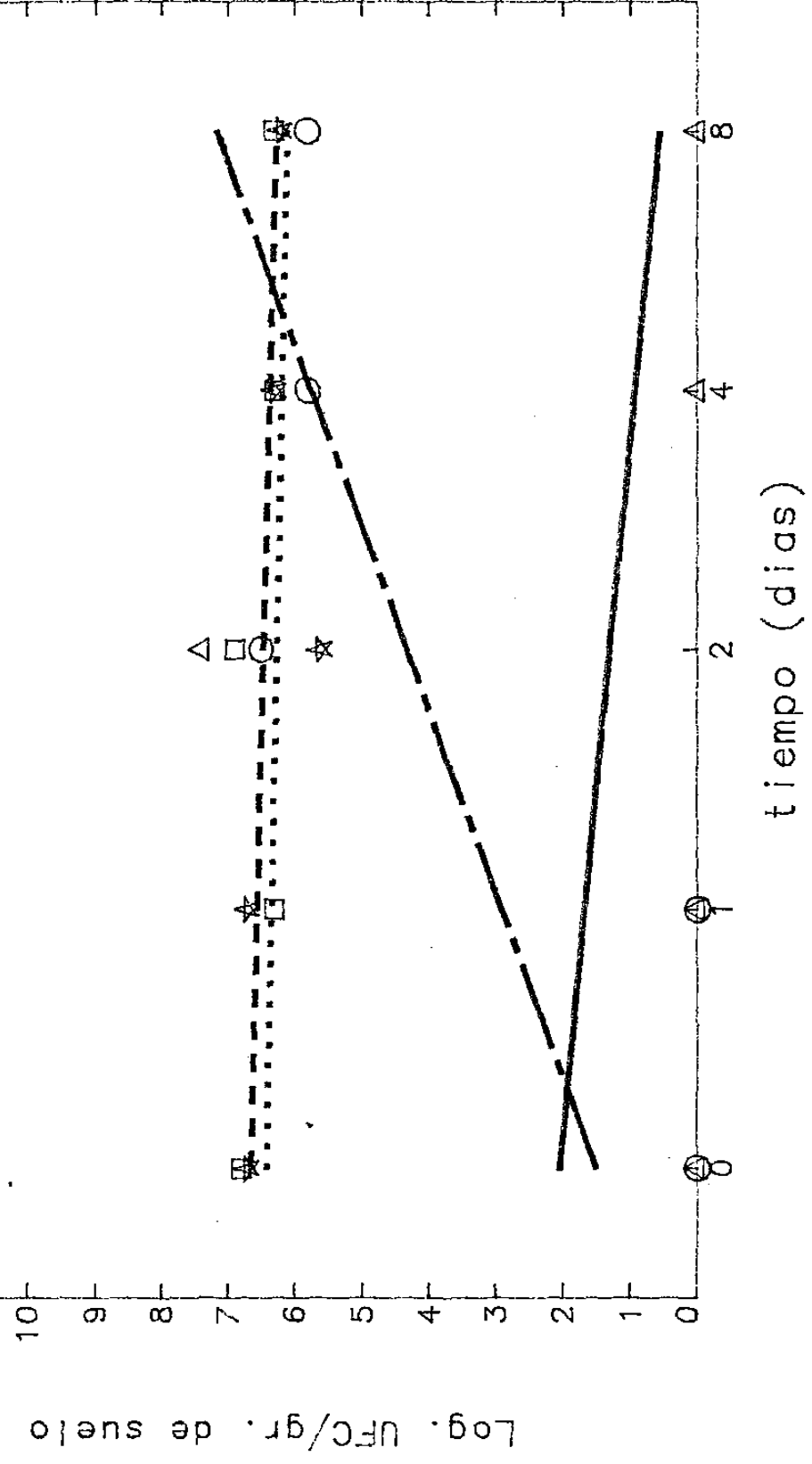
Cepa GM-4 con suelo esteril y no esteril de tipo xerosol

C. VEG.
S.N.E. O

ESPORAS
S.N.E. □

ESPORAS
S.E. ☆

($m=-0.185, r=-0.177$) ($m=0.707, r=0.674$) ($m=-0.052, r=-0.547$) ($m=-0.045, r=-0.314$)



Germinacion de esporas de *Bacillus thuringiensis*

Cepa HD-1 con suelo esteril y no esteril de tipo xerosol

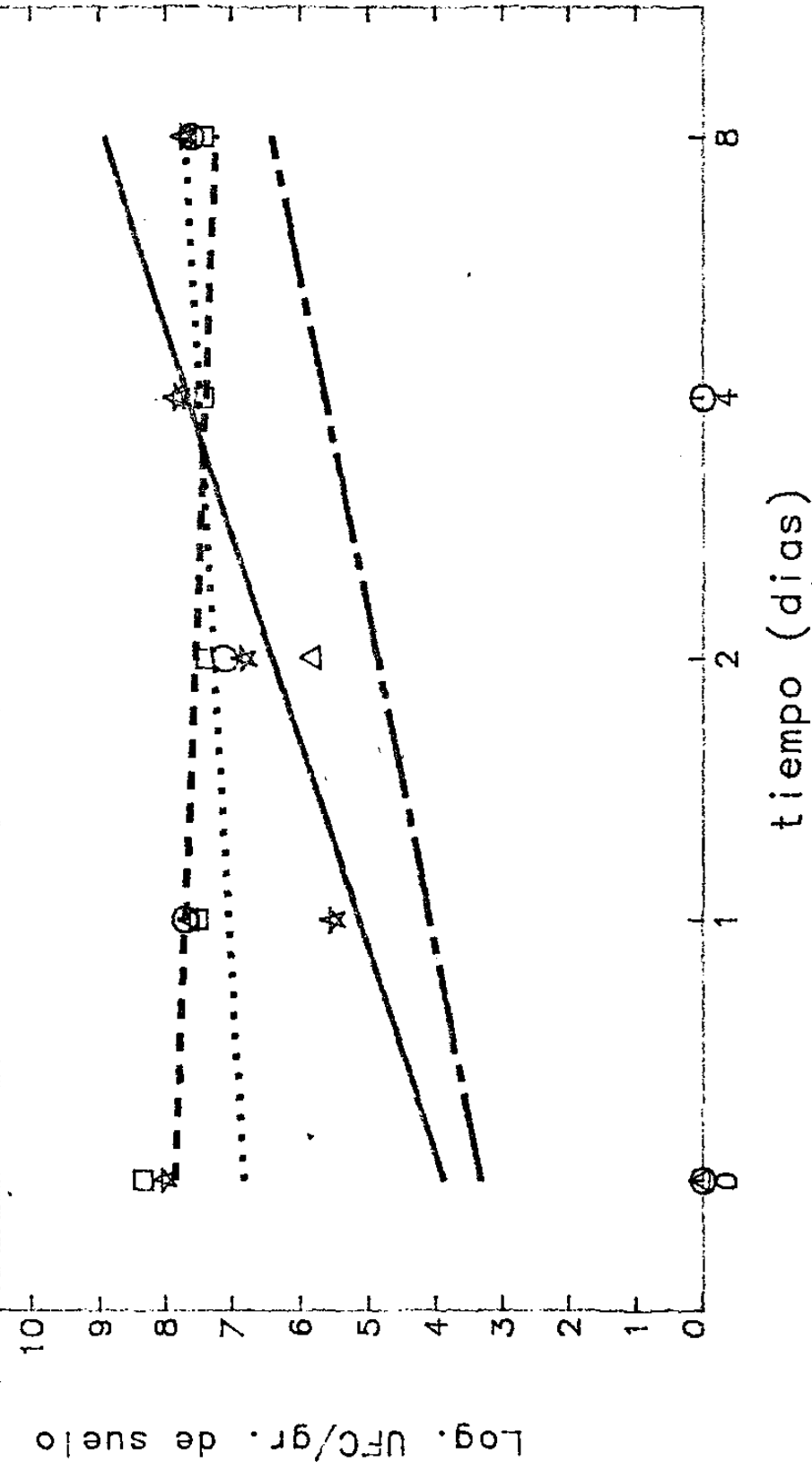
C. VEG.
S.N.E.

ESPORAS
S.N.E.

ESPORAS
S.E.

Δ ———— \circ ———— \square ———— \star ————
 C. VEG. S.N.E. ESPORAS S.N.E. ESPORAS S.E.

$(m=0.632, r=0.599)$ $(m=0.388, r=0.299)$ $(m=-0.08, r=-0.577)$ $(m=0.112, r=0.343)$



Germinacion de esporas de *Bacillus subtilis*

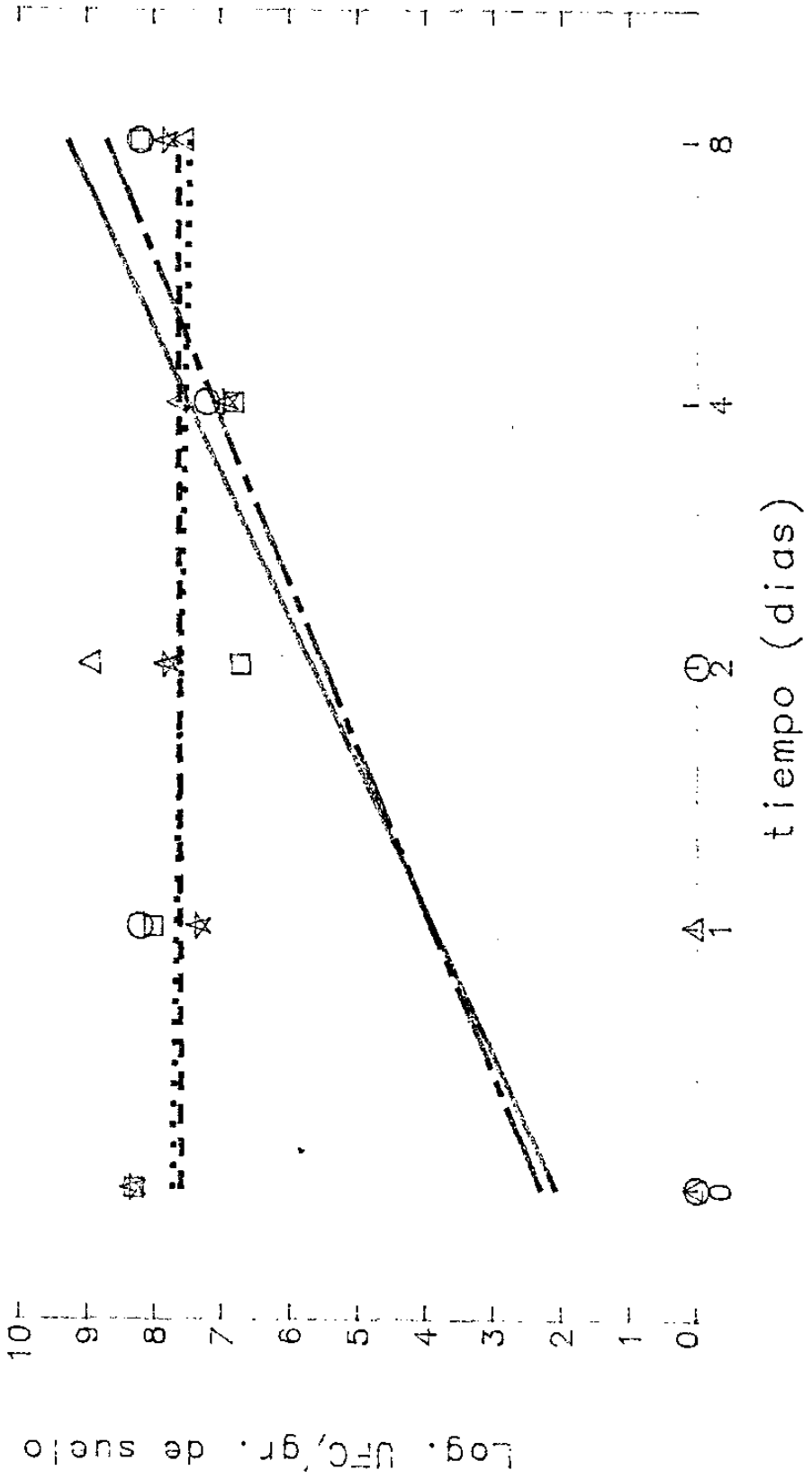
en suelo esteril y no esteril de tipo xerosol

C. VEG.
S.N.E. O

ESPORAS
S.N.E. □

ESPORAS
S.E. ☆

($m=0.905, r=0.648$)($m=0.795, r=0.581$) ($m=0.005, r=0.202$)($m=-0.035, r=-0.207$)



Cuadro No. 3.- Análisis de varianza de poblaciones de *B. thuringiensis* cepas HD-1 y GM-4 en suelo sujeto a modificaciones ambientales.

F.V.	G.L.				S.C.				F.C.	
	HD-1	GM-4	HD-1	GM-4	HD-1	GM-4	HD-1	GM-4	HD-1	GM-4
Total	809	809	27192240	3995157						
Carbono (C)	2	2	323791	686939			6.08**	117.12**		
pH (pH)	2	2	245463	318517			4.61**	54.30**		
Humedad (H)	2	2	954446	35978			17.93**	6.13**		
C x pH	4	4	170239	111402			1.59	9.49**		
C x H	4	4	199881	72655			1.87	6.19**		
pH x H	4	4	244100	45362			2.29	3.86**		
C x pH x H	8	8	569702	46628			2.67**	1.98*		
Error	754	754	20063290	2211037						

Los valores " F " calculados, que son significativamente diferentes a $P=0.05$ y 0.01 se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* HD-1 en suelo esteril enriquecido con glucosa y sujeto a diversos pH y regimenes de humedad (I= Inundado, CR= Capacidad de Retención; S= Seco), Letras diferentes encabezan las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p= 0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

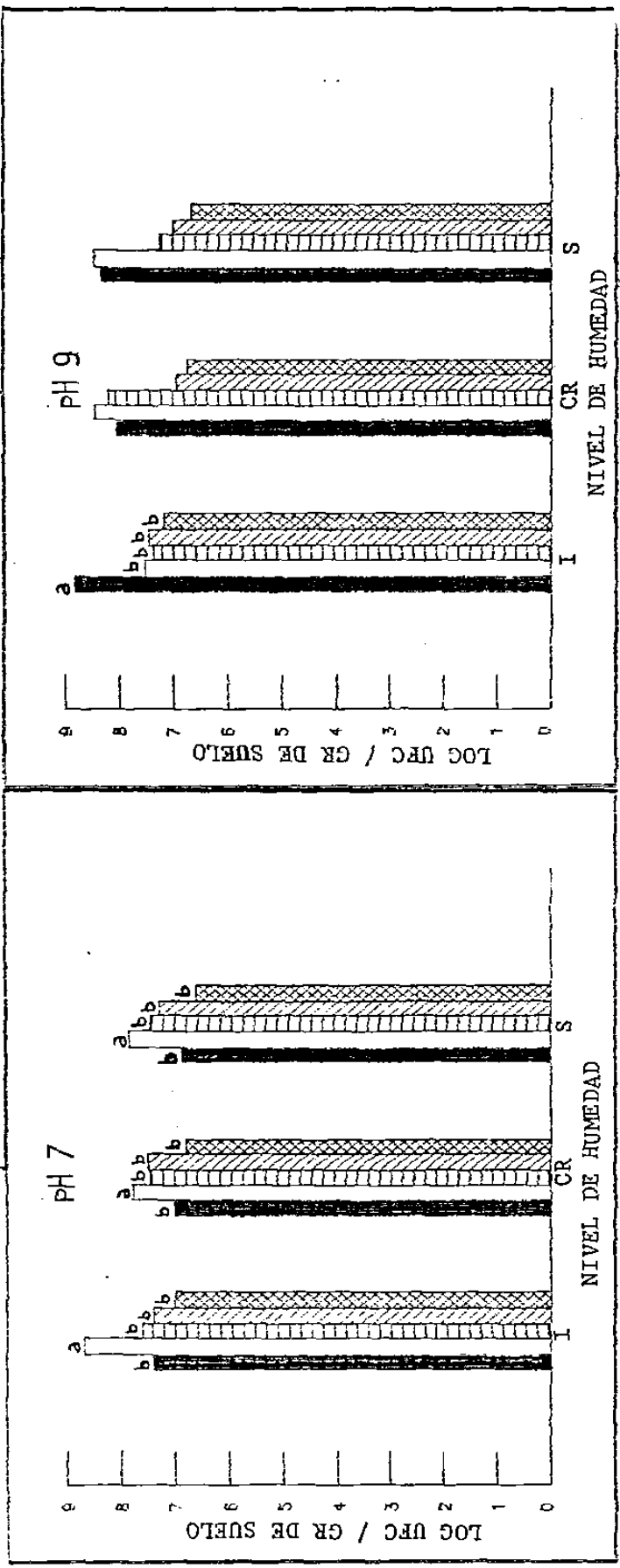
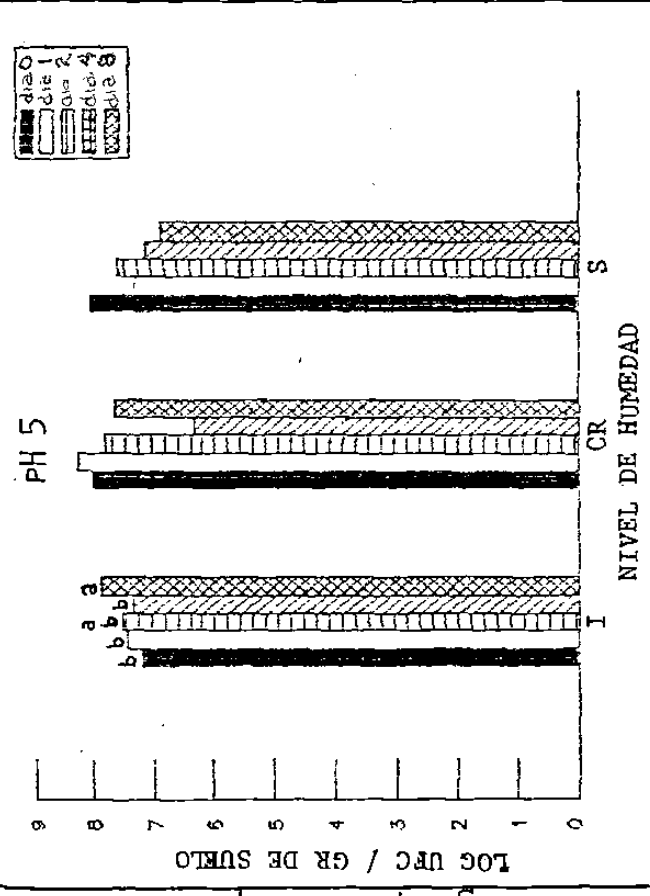


Fig. 1
 Comportamientos de *Bacillus thuringiensis* GM-4 en suelo esteril enriquecido con residuos de pasto y sujeto a diversos pH y regimenes de humedad (I= Inundado; CR= Capacidad de Retención; S= Seco). Letras diferentes encabezan do las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p=0.5$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

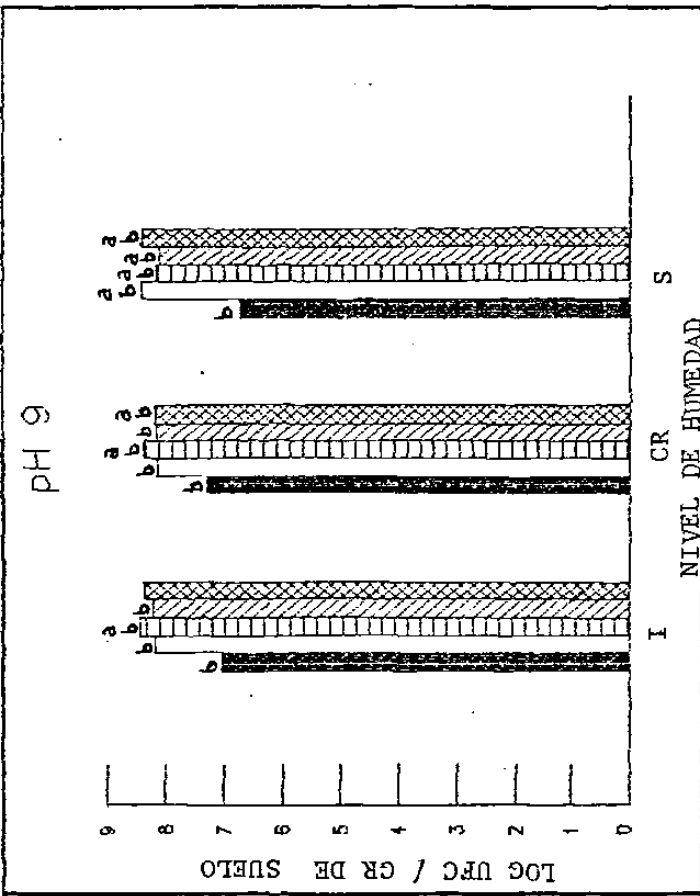
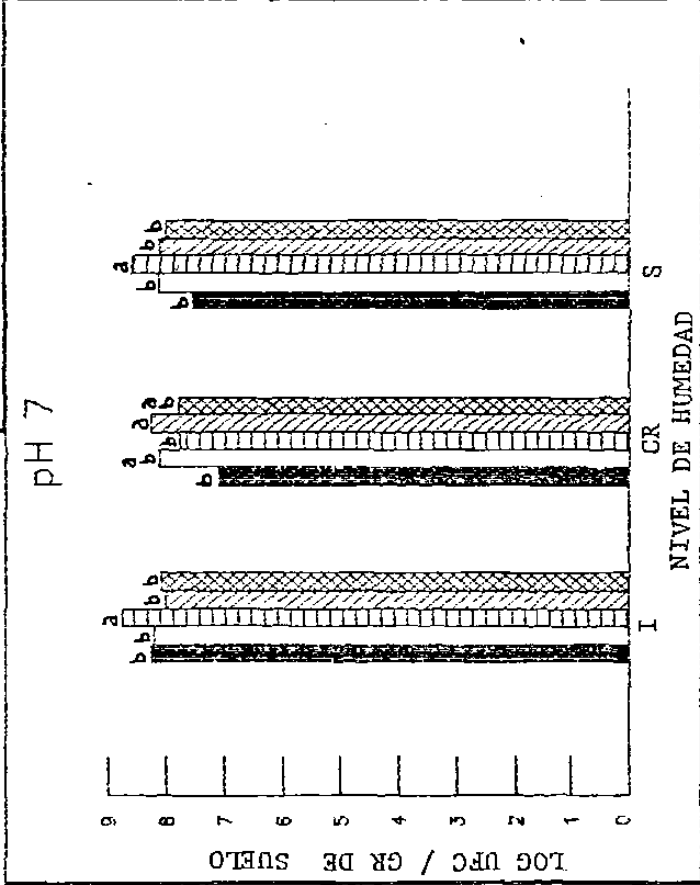
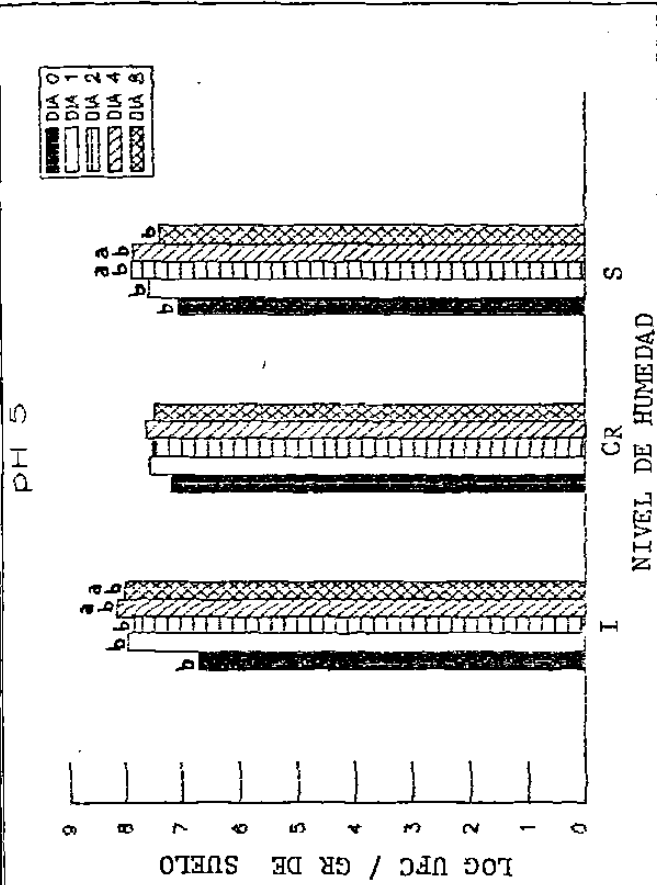
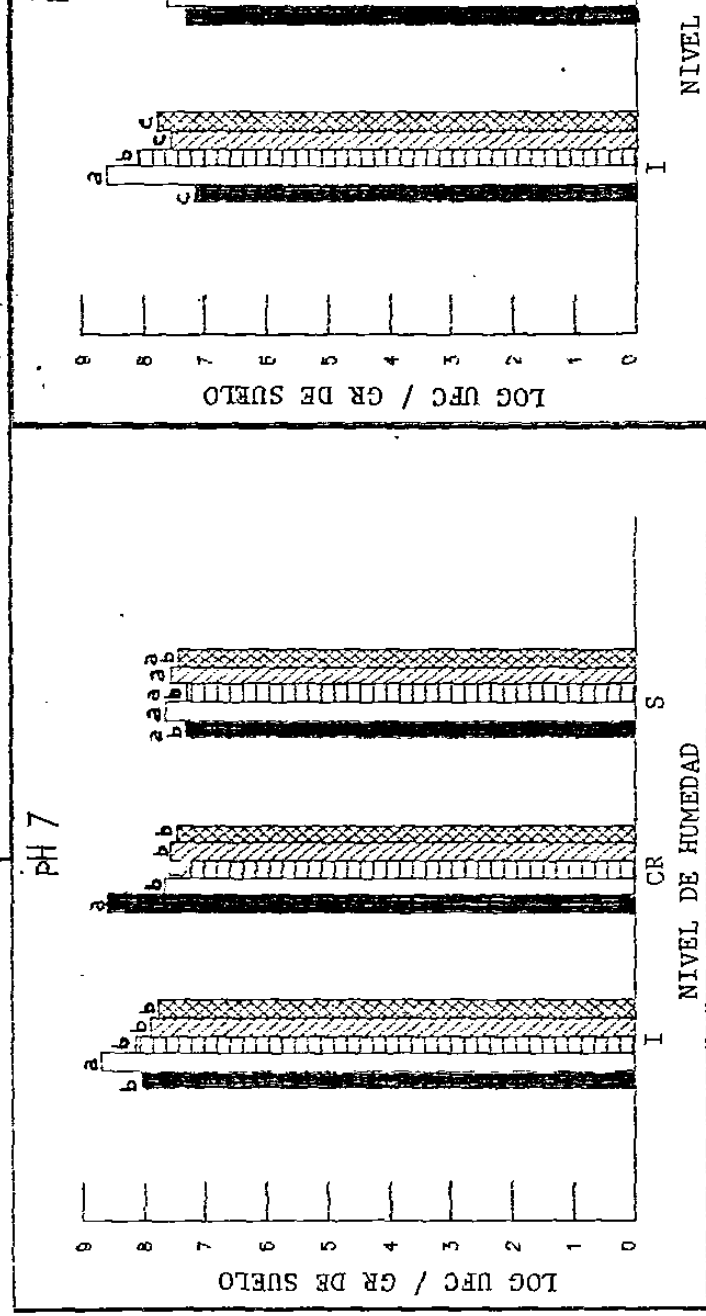
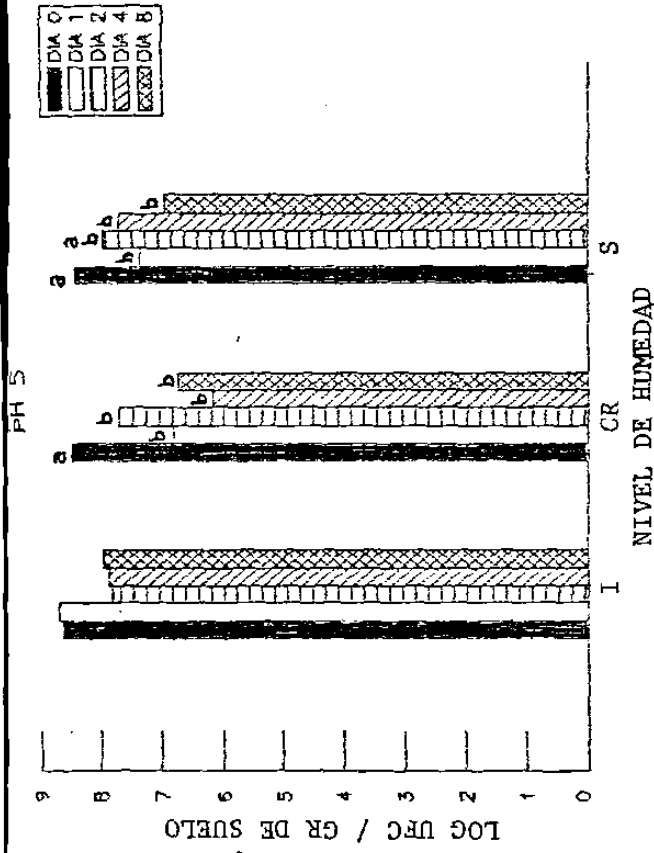


Fig.

Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* HD-1 en suelo estéril enriquecido con residuos de maíz y sujeto a diversos pH y regímenes de humedad (I= Inundado, CR= Capacidad de Retención; S= Seco). Letras diferentes encabezan las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p= 0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.



Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* HD-1 en suelo esteril enriquecido con residuos de pasto y sujeto a diversos pH y regímenes de humedad (I= Inundado, CR= Capa de Retención; S= Seco). Letras diferentes encabezan las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p=0.5$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

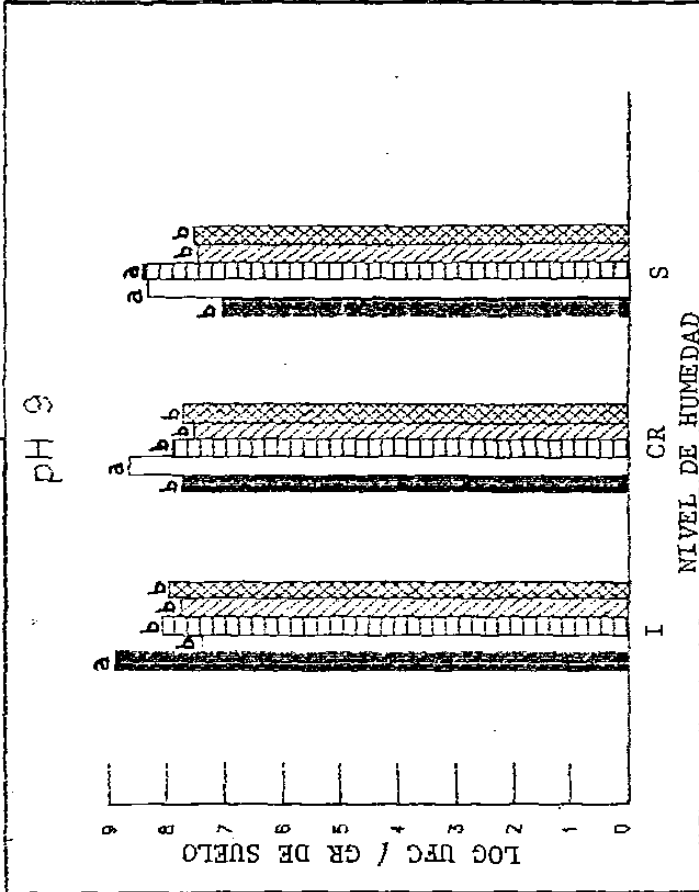
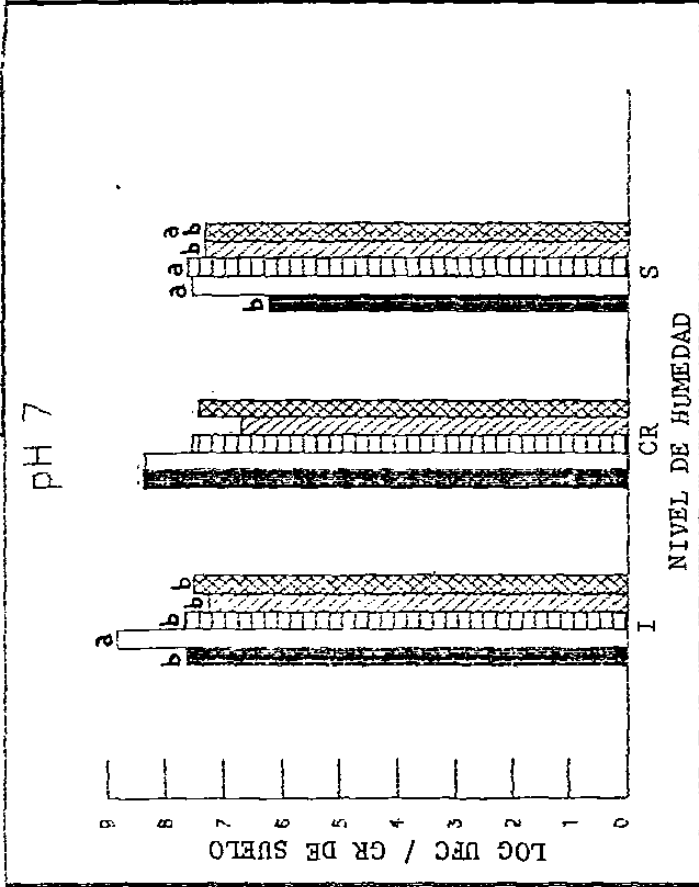
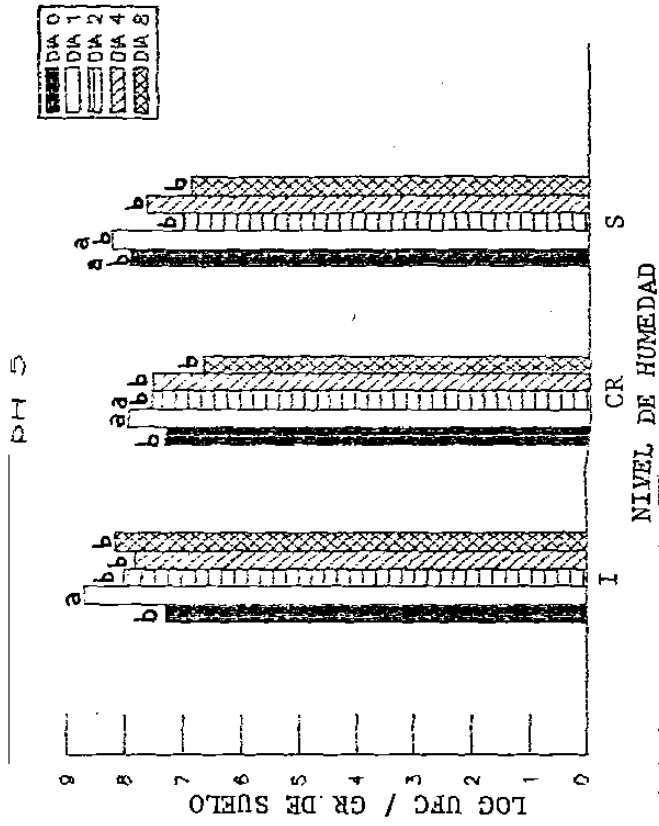


Fig. Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* GM-4 en suelo esteril enriquecido con glucosa y sujeto a diversos pH y regimenes de humedad (I= Inundado; CR= Capacidad de Retención; S= Seco), Letras diferentes encabezando las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p= 0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no muestran diferencias significativas.

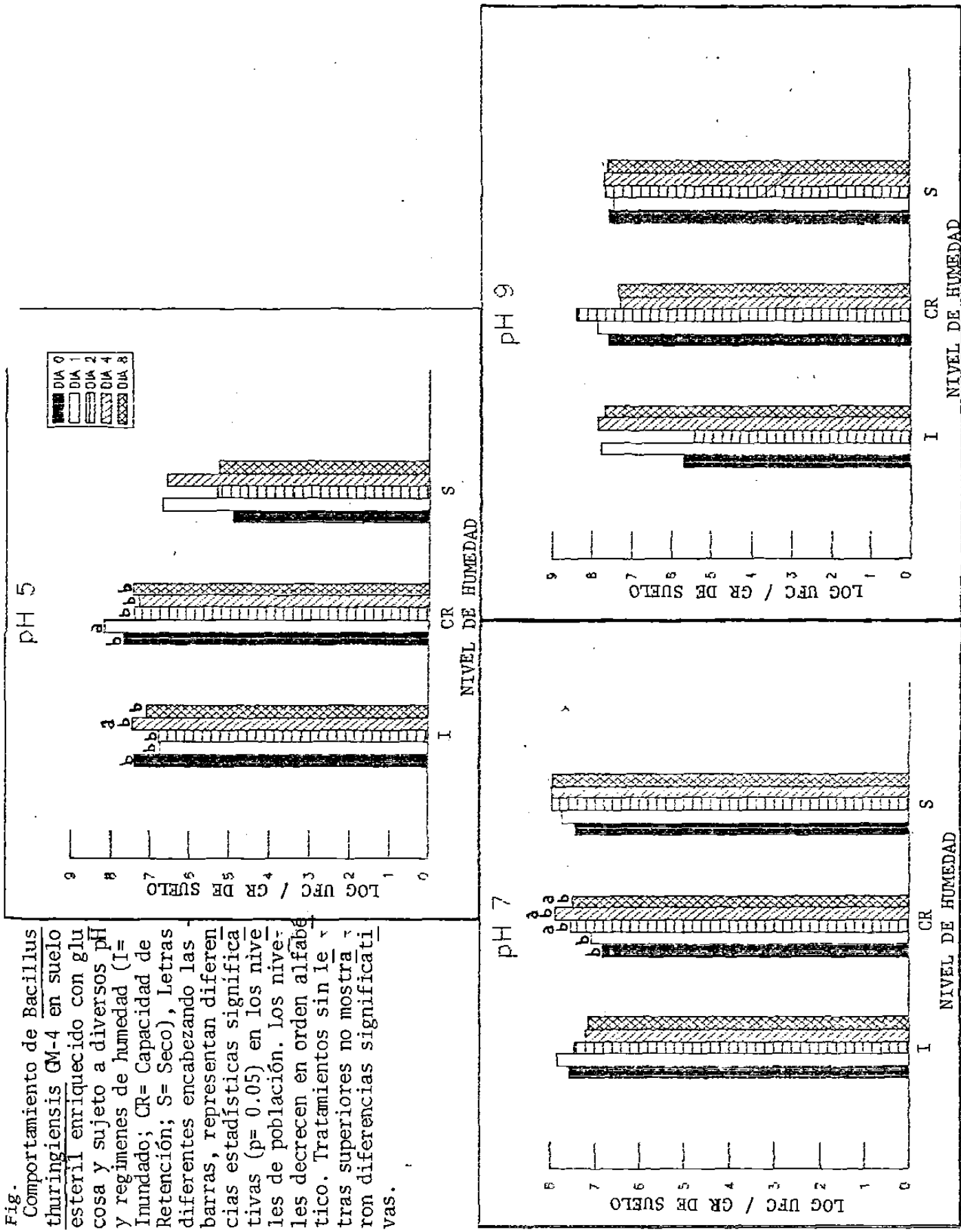
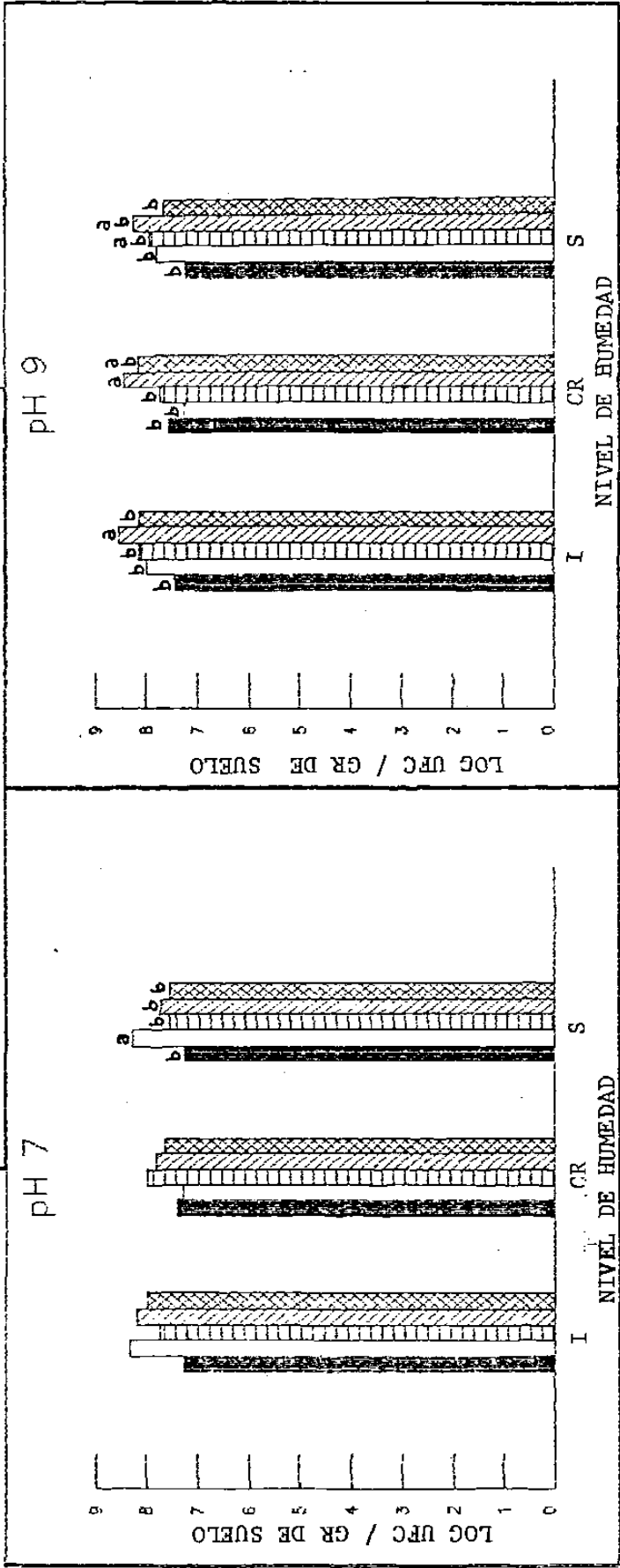
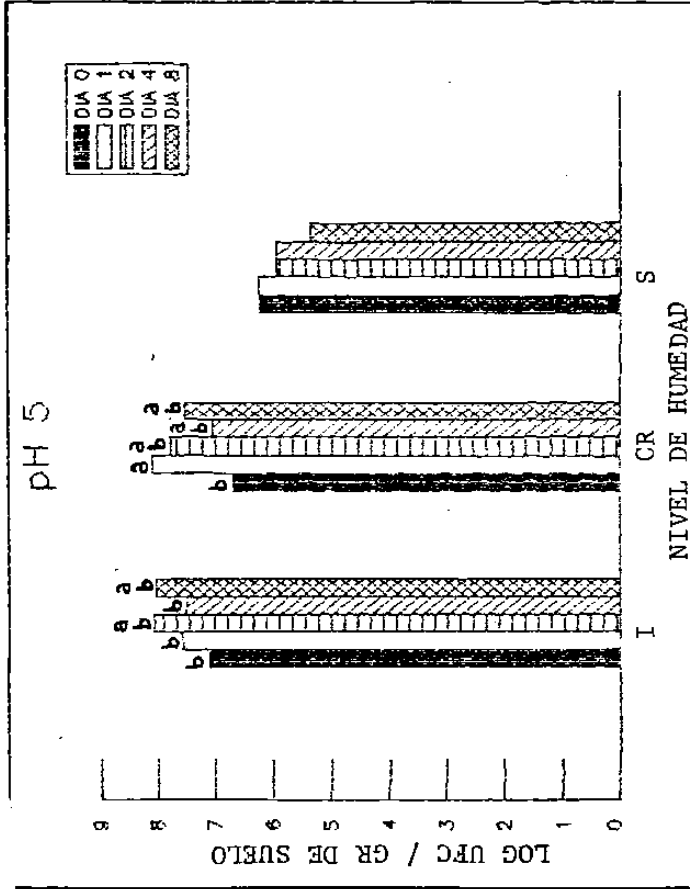


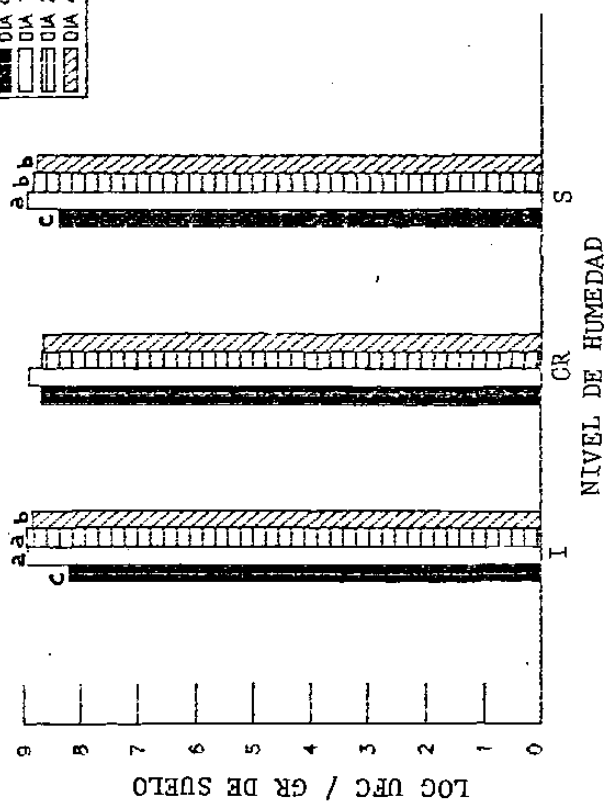
Fig.

Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* GM-4 en suelo esteril enriquecido con maíz sujeto a diversos pH y regímenes de humedad (I= Inundado; CR= Capacidad de Retención; S= Seco). Letras diferentes encabezando las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

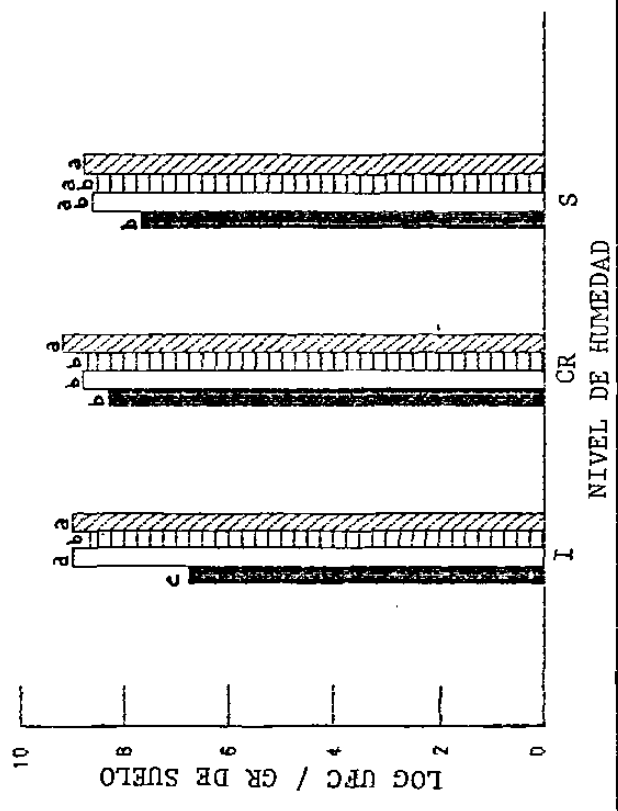


Comportamiento de un hongo nativo NX en suelo esteril enriquecido con glucosa y sujeto a diversos pH y regímenes de humedad (I= Irrigado; CR= Capacidad de Retención; S= Seco), Letras diferentes encabezan las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

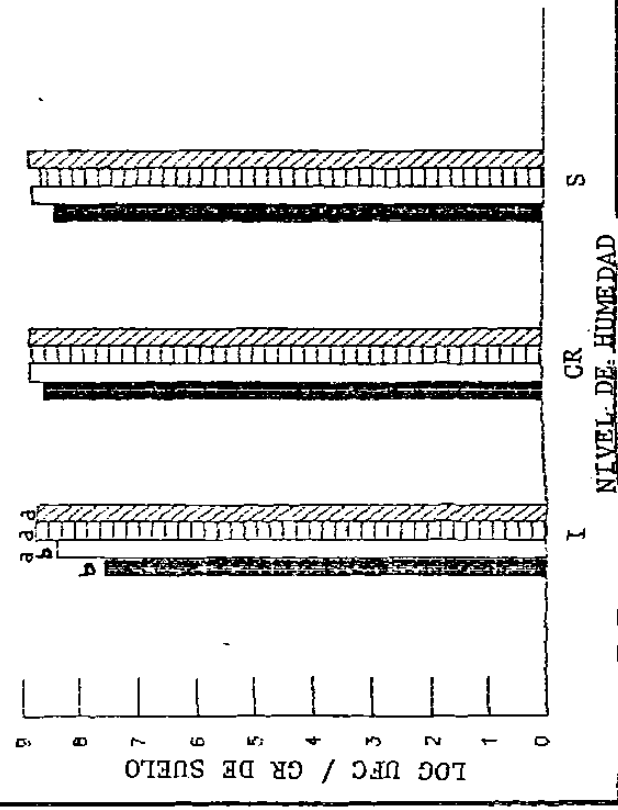
■ DIA 0
 ▨ DIA 1
 ▩ DIA 2
 ▪ DIA 4



pH 9



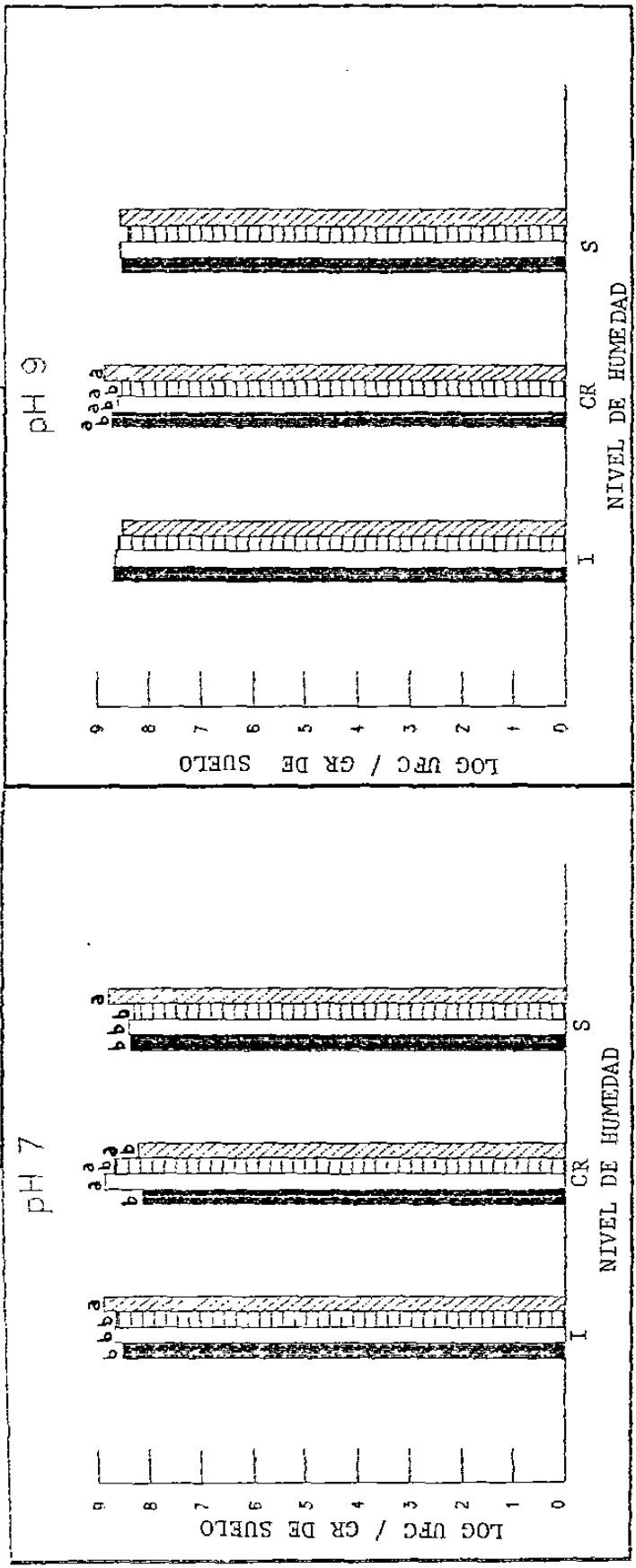
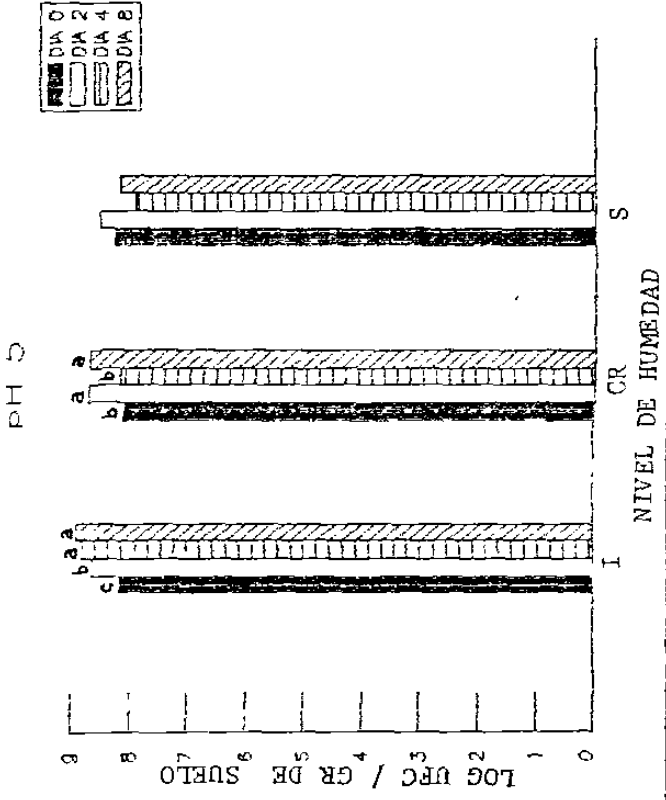
pH 7



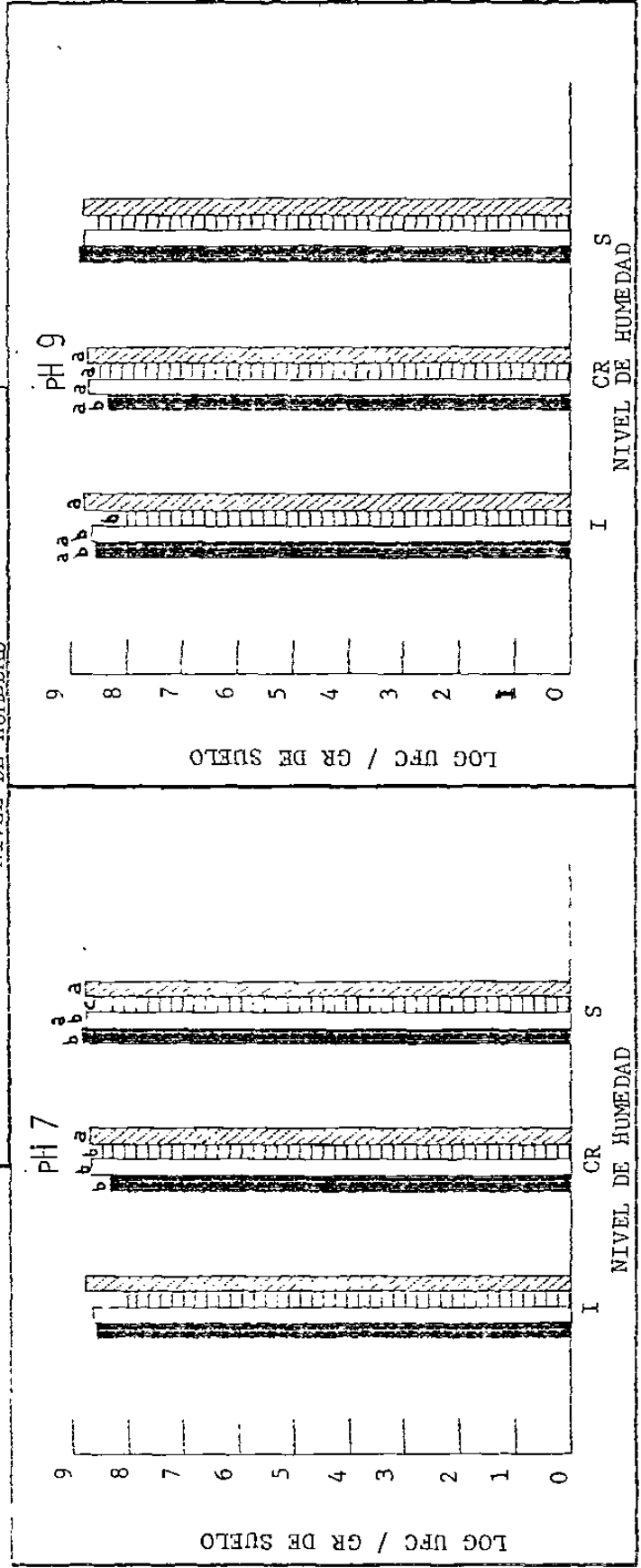
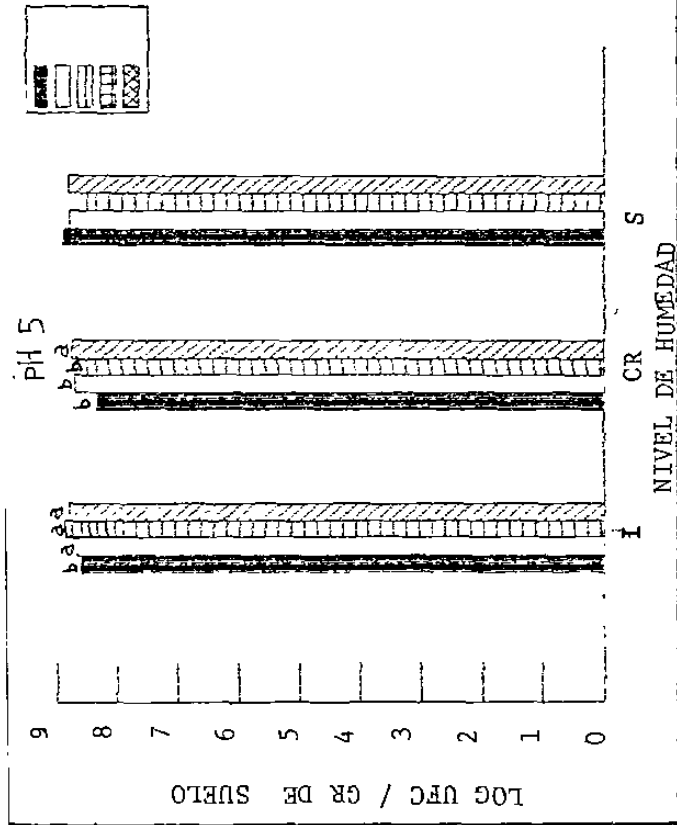
NIVEL DE HUMEDAD

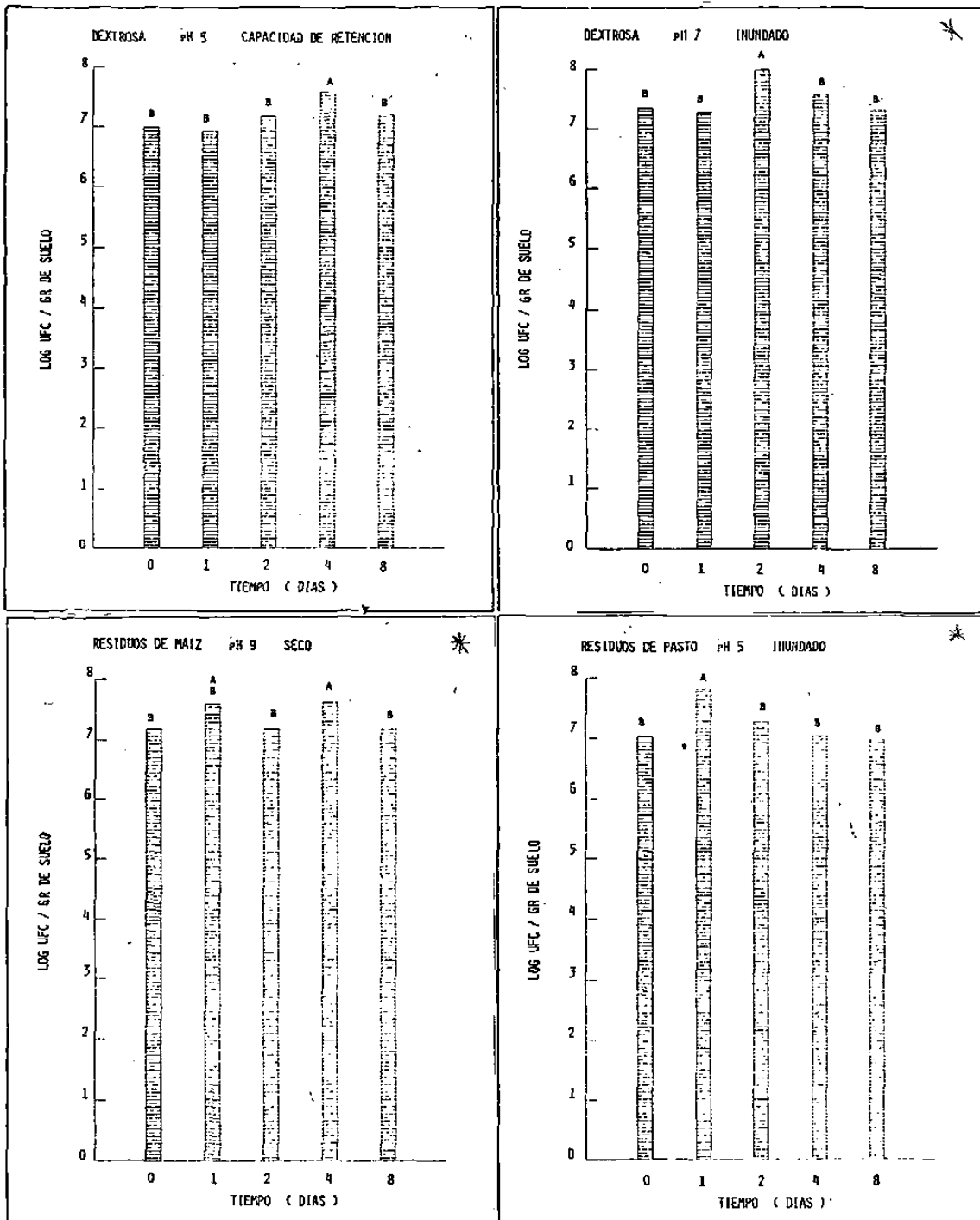
NIVEL DE HUMEDAD

Comportamiento de un bacterio nativo NX en suelo este rico enriquecido con residuos de maíz y sujeta a diversos pH y regímenes de humedad (I= Inundado; CR= Capacidad de Retención; S= Seco), Letras diferentes encabezando las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

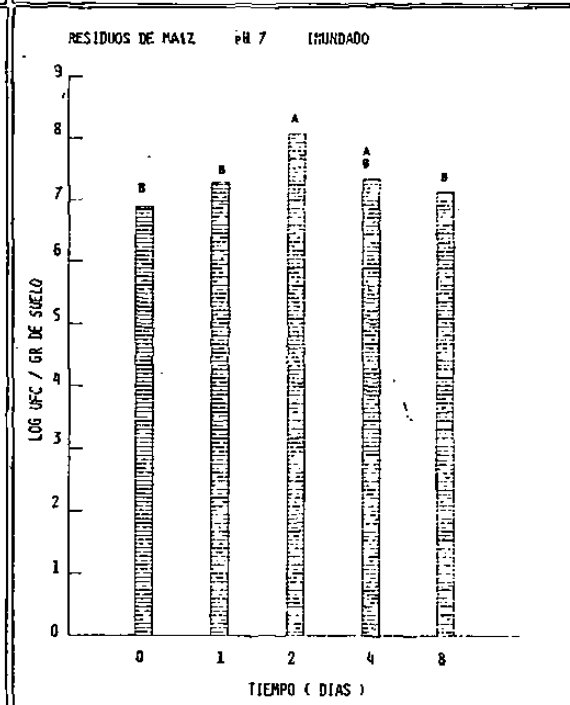
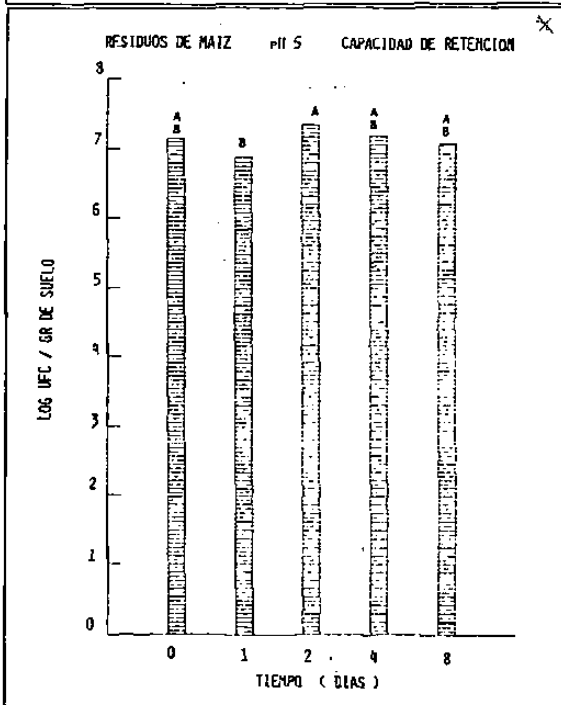
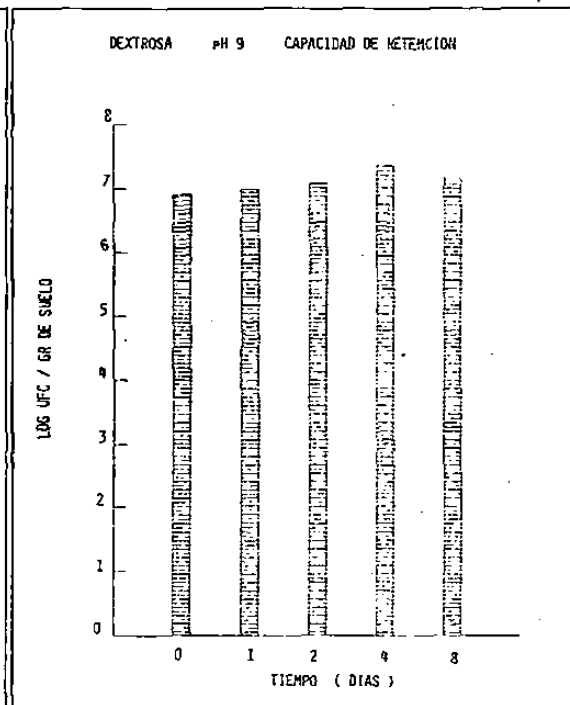
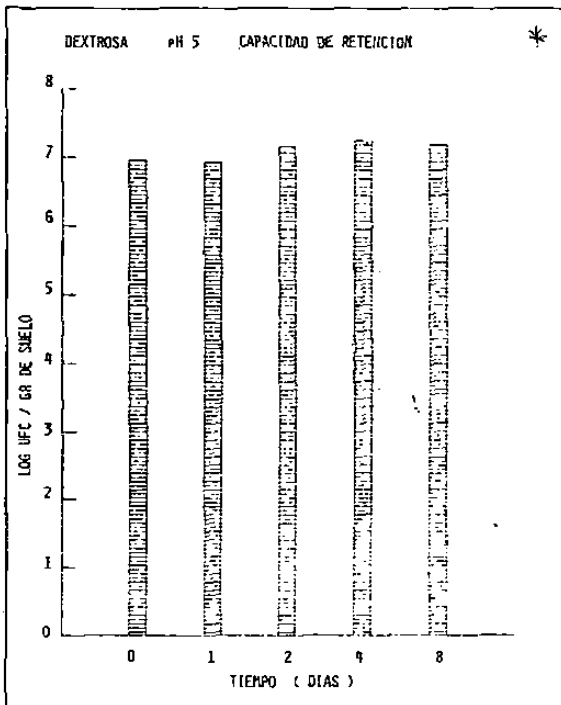


8. Comportamiento de un bacilo activo en suelo estéril enri- quecido con residuos de pas- to y sujeto a diversos pH y regimenes de humedad (I= Imundado; CR= Capacidad de Retención; S= Seco), Letras diferentes encabezan las barras, representan diferen- cias estadísticas significa- tivas ($p= 0.05$) en los nive- les de población. Los nive- les decrecen en orden alfa- bético. Tratamientos sin le- tras superiores no mostraron diferencias significativas.

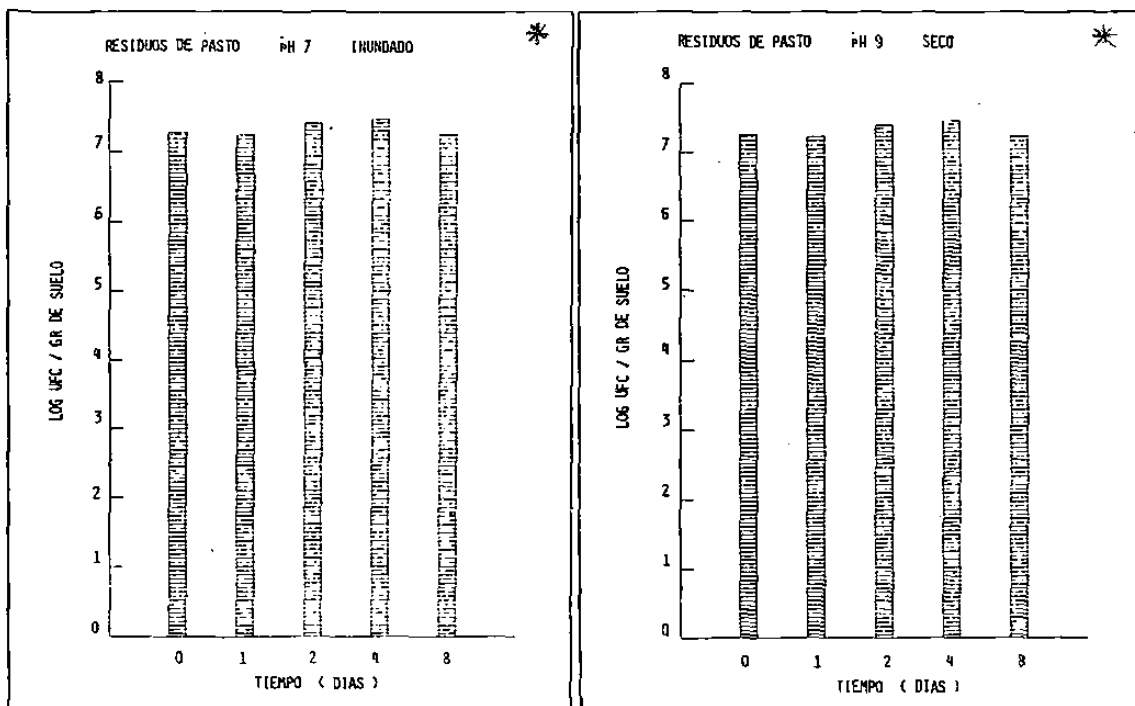




Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* HD-1 en suelo no esteril con -diversas condiciones. Letras diferentes encabezando las barras, repre-sentan diferencias estadísticas significativas ($p= 0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos -- sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

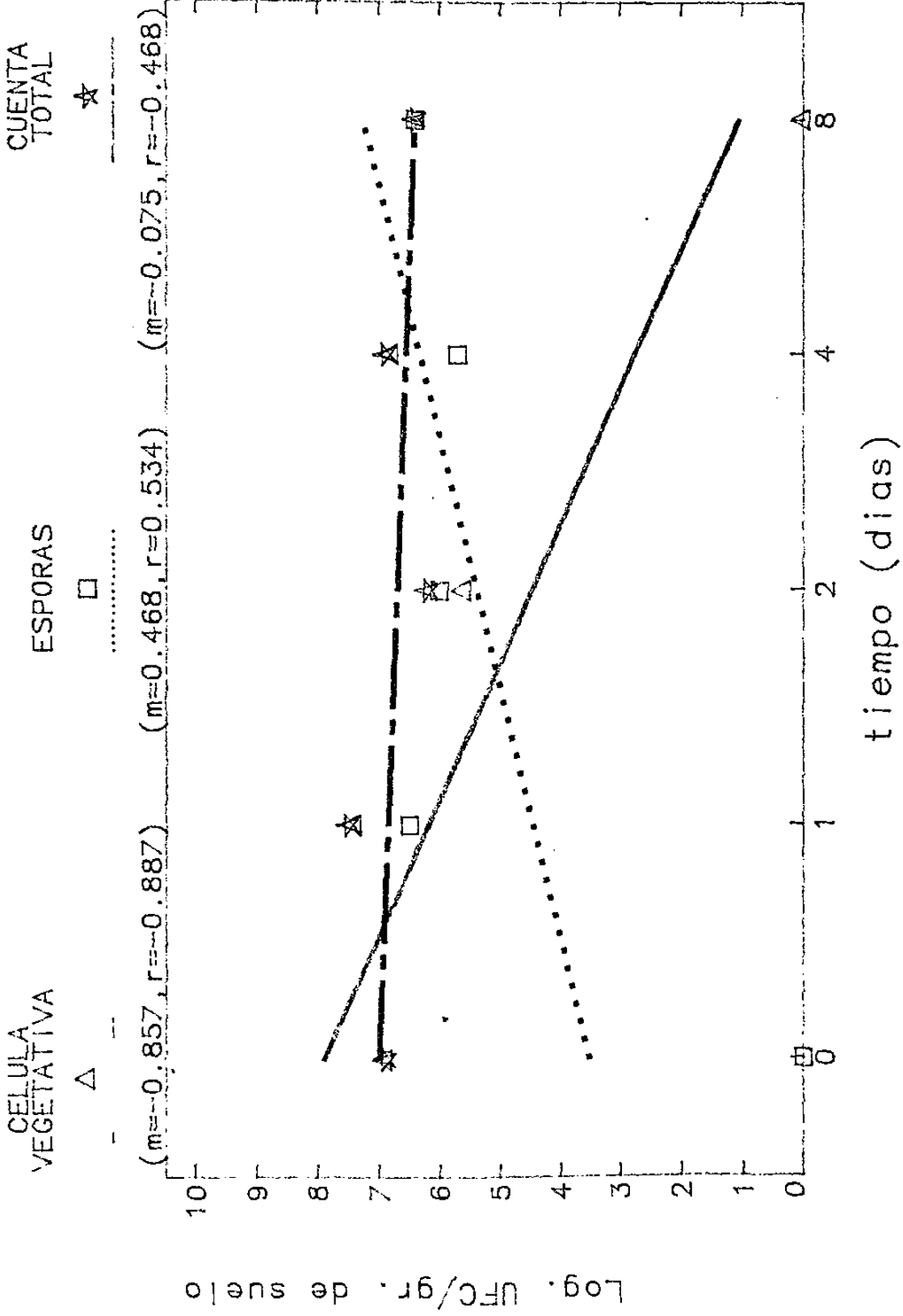


Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* GM-4 en suelo no esteril con = diversas condiciones. Letras diferentes encabezando las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) en los niveles población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos sin = letras superiores no mostraron diferencias significativas.

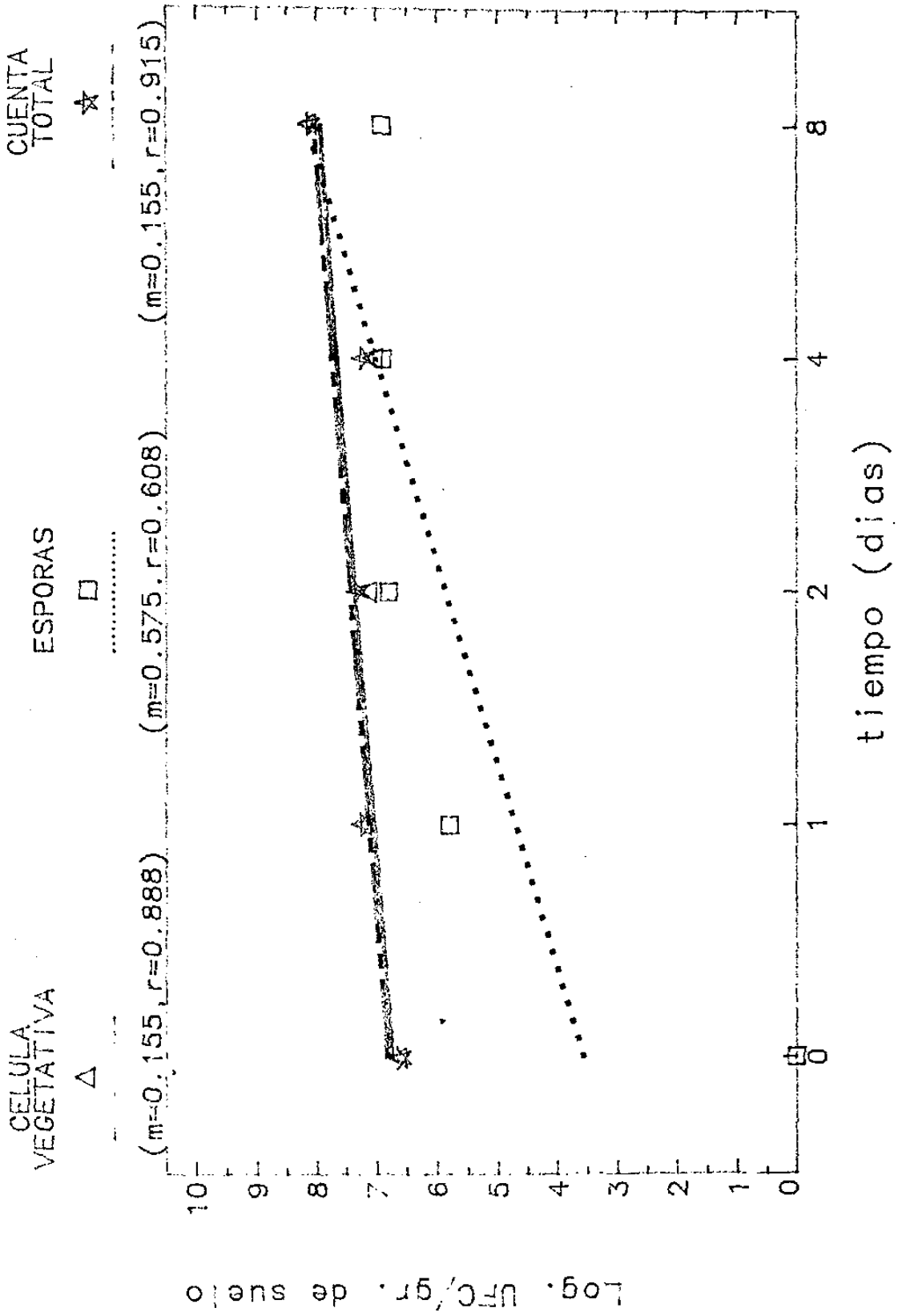


Comportamiento de *Bacillus thuringiensis* GM-4 en suelo no estéril con diversas condiciones. Letras diferentes encabezando las barras, representan diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) en los niveles de población. Los niveles decrecen en orden alfabético. Tratamientos -- sin letras superiores no mostraron diferencias significativas.

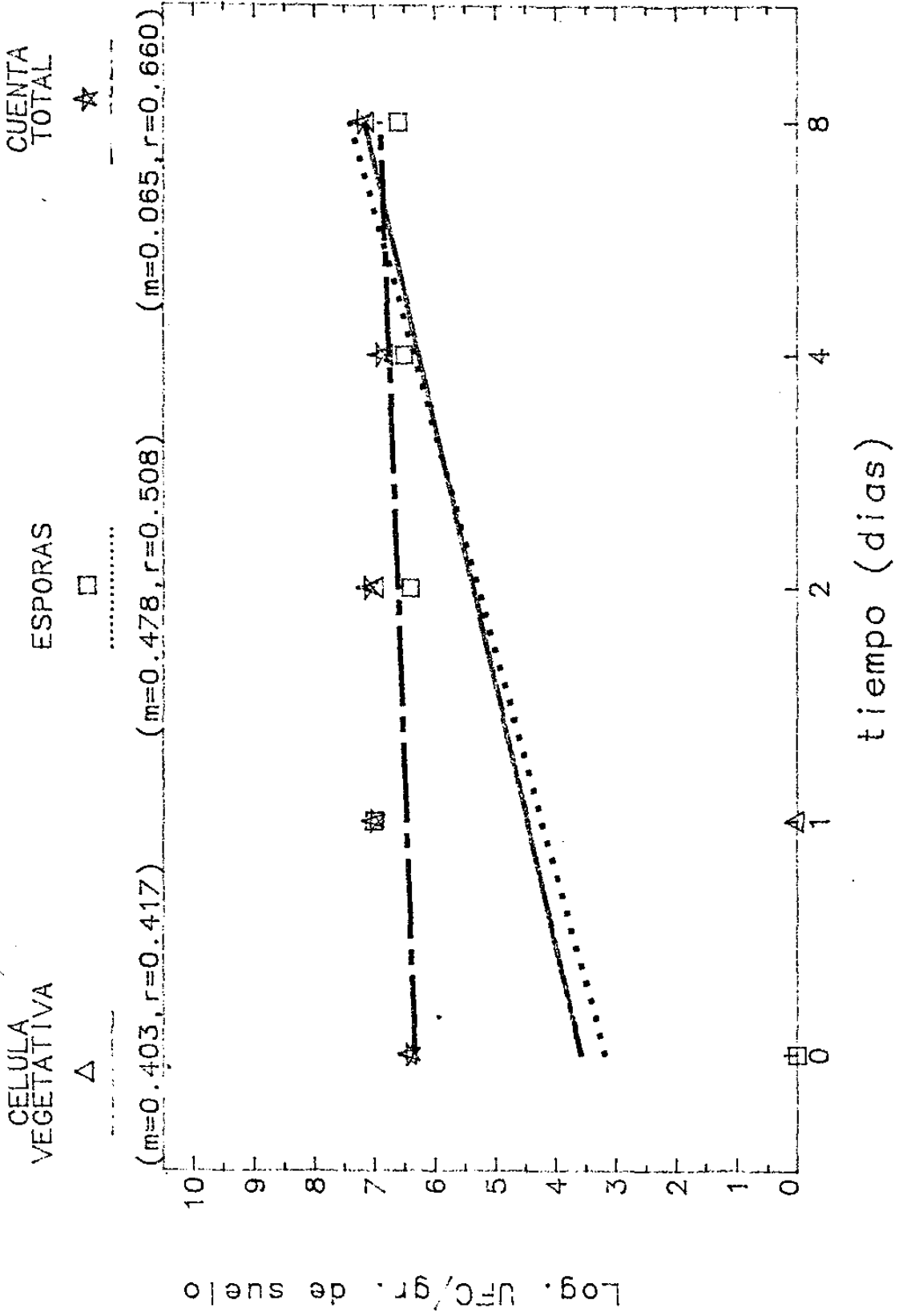
Respuesta de *Bacillus thuringiensis* Cepa GM-1
al enriquecimiento de un suelo tipo xerosol con pasto



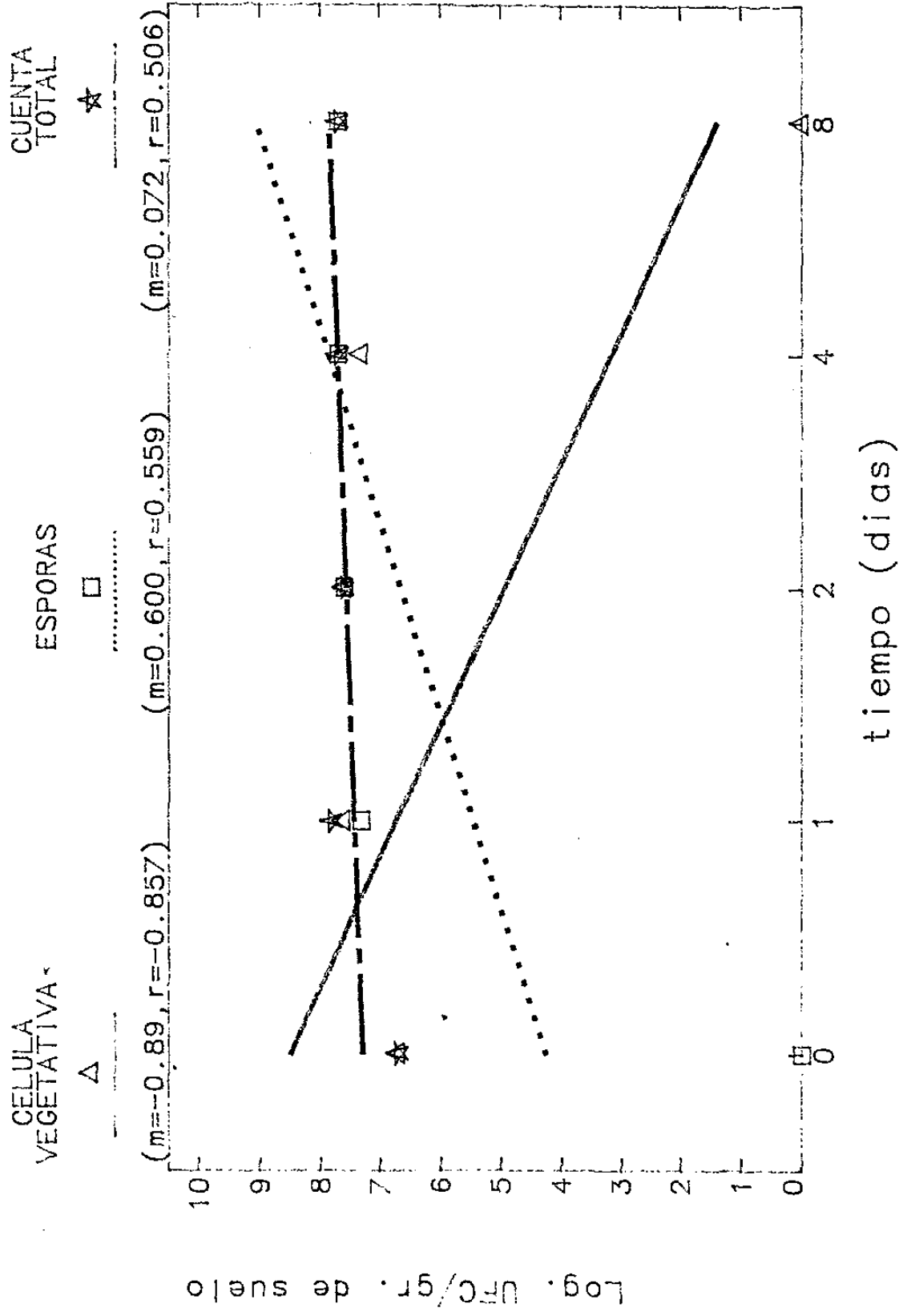
Respuesta de *Bacillus thuringiensis* cepa GM-4
al enriquecimiento de un suelo tipo xerosol con pasto



Respuesta de bacillus Thuringiensis Ceba HD-1 al enriquecimiento de un suelo tipo xerosol con pasto



Respuesta de *Bacillus subtilis* al enriquecimiento de un suelo tipo xerosol con pasto

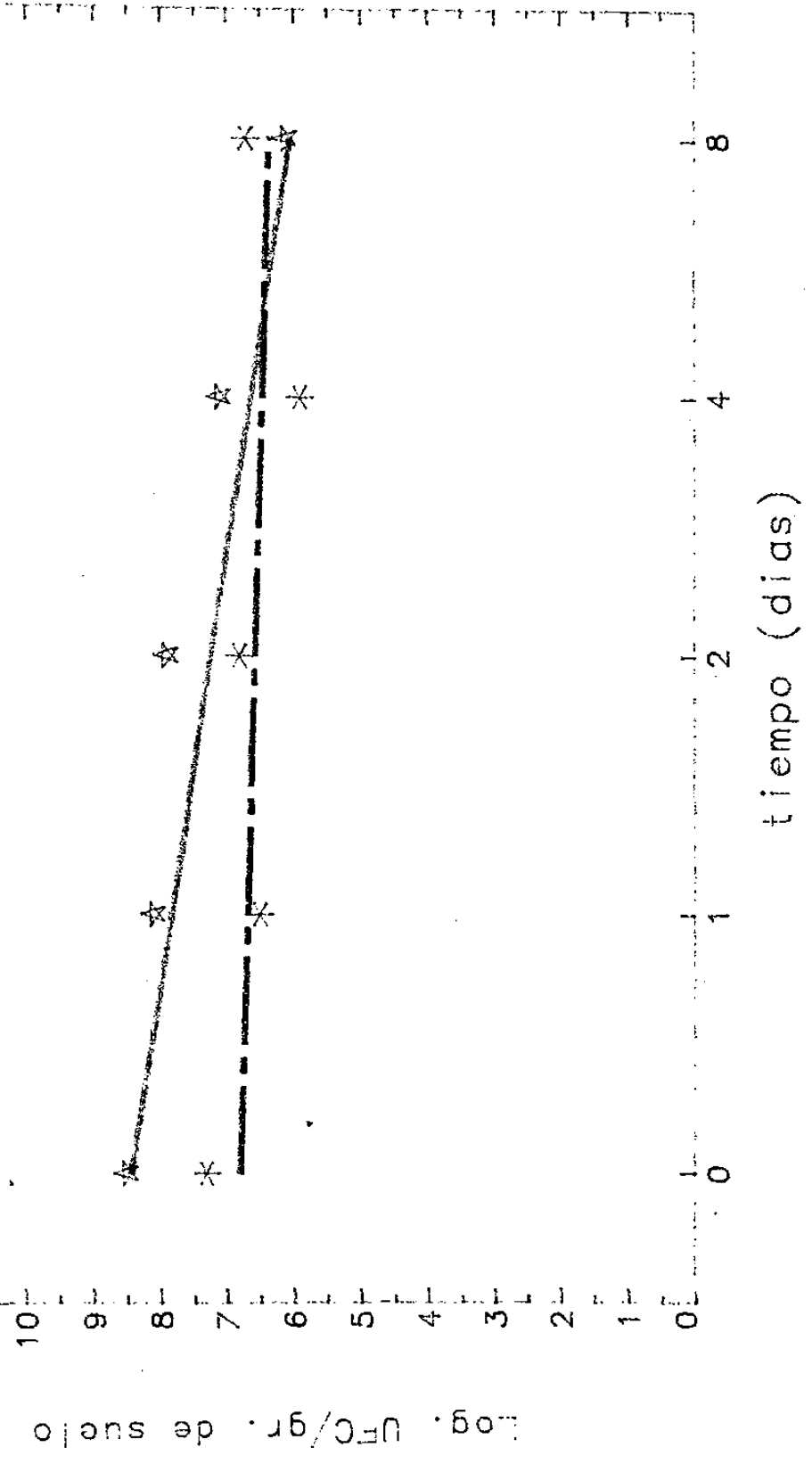


Respuesta del Bacilo nativo
al enriquecimiento de un suelo tipo xerosol con pasto

MICROORGMO AISLADO MICROORGMO TOTAL POBLACION AISLADO POBLACION TOTAL

☆ ☆ - - - *

(m = -0.299, r = -0.996) (m = -0.058, r = -0.358)



REFERENCIAS

- 1.- Akiba Y. 1981. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in the soils of mulberry plantations. First Japan / USA Symp. Tsukuba, Japan. Sept. 29 - 30. pp. 128 - 133.
- 2.- Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, S.A. México, D.F. pp. 429 - 446.
- 3.- Al-Rashidi R. K., T. E. Loynachan & L. R. Frederick. 1982. Desiccation tolerance of four strains of *Rhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem. 15: 343 - 345.
- 4.- Atlas R. M. & R. Bartha. 1981. Microbial ecology: fundamentals and applications. Addison-Wesley Publishing Company. Reading, Massachusetts. pp. 223 - 283.
- 5.- Baker K. F. 1980. Microbial antagonism - the potential for biological control. En "Contemporary Microbial Ecology" . Eds. D. C. Ellwood, J. N. Hedger, M. J. Latham, J. M. Lynch & J. H. Slater. Academic Press. London. pp. 327 - 348.
- 6.- Barry A.L. 1976. The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Lea & Febiger. Philadelphia. pp. 61 - 75, 105 - 116, 163 - 179.
- 7.- Boonkerd N. & R. W. Weaver. 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. 43: 585 - 589.
- 8.- Brock T. D. 1971. Microbial growth rates in nature. Bacteriol. Rev. 38: 39 - 58.
- 9.- Burgerson A. & D. A. Matouret. 1971. Determination and significance of the host spectrum of *Bacillus thuringiensis*.

En "Microbial Control of Insects and Mites" . Eds. H. D. Burges & N. W. Hussey. Academic Press. London. pp. 305 - 325.

- 10.- Buringh P. 1979. Introduction to the study of soils in tropical and subtropical regions. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Third Edition. Wageningen, the Netherlands. pp. 24 - 51.
- 11.- Cantwell G. E. & B. A. Franklin. 1966. Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 8: 256 - 258.
- 12.- Cantwell G. E. 1967. Inactivation of biological insecticides by irradiation. J. Invertebr. Pathol. 9: 138 - 140.
- 13.- Carlton B. C. & J. M. Gonzalez Jr. 1984. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. En "The Molecular Biology of the Bacilli" . Vol. 2. Ed. D. A. Dabnau. pp. 211 -249.
- 14.- Casida Jr L. E. 1980 a. Death of *Micrococcus luteus* in soil. Appl. Environ. Microbiol. 39: 1031 -1034.
- 15.- Casida Jr L. E. 1980 b. Bacterial predators of *Micrococcus luteus* in soil. Appl. Environ. Microbiol. 39: 1035 -1041.
- 16.- Casida Jr L. E. 1988. Response in soil of *Cupriavidus necator* and other copper-resistant bacterial predators of bacteria to addition of water, soluble nutrients, various bacterial species or *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2161 - 2166.

- 17.- Chao W. L. & M. Alexander. 1982. Influence of soil characteristics on the survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 949 - 952.
- 18.- Clapham W. B. Jr. 1973. *Natural ecosystems*. The Mcmillan Co. New York. pp. 57 - 136.
- 19.- Cole M. A. & G. H. Elkan. 1979. Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 867 - 870.
- 20.- Couch T. L. & D. A. Ross. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 1297 - 1304.
- 21.- Danso S. K. A., M. Habte & M. Alexander. 1973. Estimating the density of individual bacterial populations introduced into natural ecosystems. *Can J. Microbiol.* 27: 865 - 870.
- 22.- De Lucca II A. J., J. G. Simonson & A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* 27: 865 - 870.
- 23.- Dulmage H. T. & K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En "Microbial and Viral Pesticides", Ed. E. Kurstak. Marcel Dekker. New York. pp. 209 - 237.
- 24.- Frye R. D., C. G. Scholl, E. W. Scholiz & B. R. Funke. 1973. Effect of weather on a microbial insecticide. *J. Invertebr. Pathol.* 22: 50 - 54.
- 25.- Germida J.J. & L. E. Casida Jr. 1983. *Ensifer adhaerens* predatory activity against other bacteria in soil, as

- monitored by indirect phage analysis. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1380 - 1388.
- 26.- Griego V. M. & K. D. Spence. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. Appl. Environ. Microbiol. 35: 906 - 910.
- 27.- Ignoffo C. M. 1963. Sensitivity spectrum of *Bacillus thuringiensis* Berliner to the antibiotics, sulfonamides and other substances. J. Insect. Pathol. 5: 395 - 397.
- 28.- Ignoffo C. M. & C. Garcia. 1978. U. V.-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. Environ. Entomol. 7: 270 - 272.
- 29.- Jackson M. L. 1976. Análisis químico de suelos. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, Espana. pp. 282 - 310.
- 30.- Kuykendall L. D. & D. F. Weaver. 1978. Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculum strain in nodules of soybean plants grown in fields populated with *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 36: 915 - 919.
- 31.- Luthy P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 8: 1 - 7.
- 32.- Mc Linden J. H., J. R. Sabourin, B. D. Clark, D. R. Gensler, W. E. Workman & D. H. Dean. 1985. Cloning and expression of an insecticidal δ -endotoxin type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 623 - 628.
- 33.- Murphy D. W., S. S. Sohi & P. G. Fast. 1976. *Bacillus*

thuringiensis enzyme-digested delta endotoxin: effect in cultivated insect cells. *Science*. 194: 954 - 956.

34.- Ohba M. & K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 32: 303 - 309.

35.- Ohba M., K. Aizawa & T. Furusawa. 1979. Distribution of *Bacillus thuringiensis* serotypes in Ehime prefecture, Japan. *Appl. Ent. Zool.* 14: 340 - 345.

36.- Palmer R. G. & F. R. Troeh. 1979. Introducción a la ciencia del suelo - manual de laboratorio. A.G.T. Editor, S. A. México, D.F. pp. 27 - 40, 52- 64.

37.- Pendleton I.R. 1968. Ecological significance of antibiotics of some varieties of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 13: 235 - 240.

38.- Pendleton I. R. 1969. Insecticides of cristal - forming bacteria. *Process Biochem.* 4: 29 - 32.

39.- Pena-Cabriales J. J. & M. Alexander. 1979. Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 962 - 966.

40.- Pena-Cabriales J. J. & M. Alexander. 1983 a. Growth of *Rhizobium* in unamended soil. *Soil Sci Soc. Am. J.* 47: 81 - 84.

41.- Pena-Cabriales J. J. & M. Alexander. 1983 b. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47: 241 - 245.

- 42.- Petras S. F. & L. E. Casida Jr. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1496 - 1501.
- 43.- Pinnock D. E., R. J. Brand, J. E. Milstead & K. L. Jackson. 1975. Effect of tree species on the coverage and field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. J. Invertebr. Pathol. 25: 209 - 214.
- 44.- Prasertphon S. & P. Areekvi. 1973. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in host cadavers. J. Invertebr. Pathol. 21: 205 - 207.
- 45.- Pruett C. J. H., H. D. Burges & C. H. Wyborn. 1980. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis* J. Invertebr. Pathol. 35: 168 - 174.
- 46.- Rowe G. E. & A. Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Microbiol. 6: 87 - 127.
- 47.- Saleh S. M., R. F. Harris & O. N. Allen. 1969. Method for determining *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in soil. Can J. Microbiol. 15: 1101 - 1104.
- 48.- Saleh S. M., R. F. Harris & O. N. Allen. 1970 a. Recovery of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* from field soils. J. Invertebr. Pathol. 15: 55 - 59.
- 49.- Saleh S. M., R. F. Harris & O. N. Allen. 1970 b. Fate of *Bacillus thuringiensis* in soil: effect of soil pH and organic amendment. Can. J. Microbiol. 16: 677 - 680.

- 50.- Schesser J. H. & L. A. Bulla Jr. 1978. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spores to the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 121 - 123.
- 51.- Schenpf H. E. & H. R. Whiteley. 1985. Delineation of a toxin encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 260: 6273 - 6280.
- 52.- Schlegel G. Hans. 1979. *Microbiología general*. Segunda Edición, Ediciones Omega, S. A. Barcelona, Espana. pp. 161.
- 53.- Slater J. H. & D. Godwin. 1980. Microbial adaptation and selection. En "Contemporary Microbial Ecology". Eds. D. C. Ellwood, J. N. Hedger, M. J. Latham, J. M. Lynch & J. H. Slater. Academic Press. London. pp. 137 - 160.
- 54.- Soil Conservation Service. 1972. Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soil samples. U. S. Department of Agriculture. Washington, D. C. pp. 15 - 23.
- 55.- Somasegaran P. & H. J. Hoben. 1985. Methods in legume *Rhizobium* technology. University of Hawaii. Nifal Project & MIRCEN. pp. 46 - 49.
- 56.- Somerville H. J. 1973. Microbial toxins. *Annals of New York Academy of Sciences.* 217: 93 - 108.
- 57.- Spiegel R. M. 1984. *Estadística*. Primera edición. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F. pp. 357.
- 58.- Stahly D.P., D. W. Dingman, L. A. Bulla Jr, & A. I. Aronson. 1978. Possible origin and function of the

parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 581 - 588.

- 59.- Wang D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunhill, A. E. Humphrey & M. D. Lilly. 1979. *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons. New York. pp. 57 - 97.
- 60.- West A. W. & H. D. Burges. 1982. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in soil. En "Proceedings of the Third International Colloquium on Invertebrate Pathology" . pp. 319 - 323.
- 61.- West A. W. 1984. Fate of insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 16: 357 - 360.
- 62.- West A. W., H. D. Burges & C. H. Wyborn. 1984 a. Effect of incubation in natural and autoclaved soil upon potency and viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 44: 121 - 127.
- 63.- West A. W., N. E. Crook & H. D. Burges. 1984 b. Detection of *Bacillus thuringiensis* in soil by immunofluorescence. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 150 - 155.
- 64.- West A. W. & H. D. Burges. 1985. Persistence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil supplemented with grass or manure. *Plant Soil.* 83: 389 - 398.
- 65.- West A. W., H. D. Burges, T. J. Dixon & C. H. Wyborn. 1985 a. Effect of incubation in non-sterilized and autoclaved arable soil on survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula. *New Zealand J. Agric. Res.* 28: 559 - 566.

66. - West A. W., H. D. Burges, T. J. Dixon & C. H. Wyborn. 1985
b. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effect of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 17: 657 - 665.
67. - Zar H. J. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Inc. Englewood Cliffs, N. J. pp. 228 - 235, 341 - 355.
68. - Zeph L. R. & L. E. Casida Jr. 1986. Gram-negative versus gram-positive (actinomycete) nonobligate bacterial predators of bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 819 - 823.

