

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



" IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA DETECCION DE
BETA EXOTOXINA EN CEPAS DE Bacillus thuringiensis "

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA.

P R E S E N T A

Q.B.P. KATTUSHKA AREVALO NIÑO

Monterrey, N.L.

Enero de 1990.

TM
Z5320
FCB
1990
A7



1020066511

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



" IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA DETECCION DE
BETA EXOTOXINA EN CEPAS DE Bacillus thuringiensis "

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA.

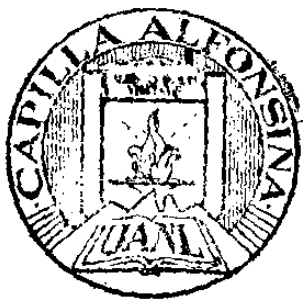
P R E S E N T A

Q.B.P. KATTUSHKA AREVALO NIÑO

Monterrey, N.L.

Enero de 1990.

TM
Z5320
Feb
1990
A7



161930

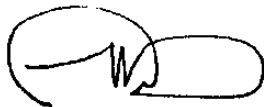
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

" IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA DETECCION DE
BETA EXOTOXINA EN CEPAS DE Bacillus thuringiensis "

TESIS COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

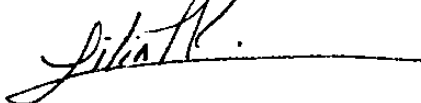
P R E S E N T A :

Q.B.P. KATIUSHKA AREVALO NIÑO



M.C. LUIS J. GALÁN WONG

PRESIDENTE



M.C. LILIA HORTENCIA MORALES RAMOS

SECRETARIO



DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

VOCAL

DEDICATORIA

A Dios:

Porque aunque alejada de él, siempre se acuerda de mí.

A la memoria de mi Padre:

Con todo mi amor y deseando que donde quiera que esté, se encuentre orgulloso de mí.

A mi Madre:

Le dedico éste trabajo con todo mi amor y agradecimiento por la oportunidad de ser alguien al darme la vida.

A mis hermanos:

Porque aunque alejados físicamente en el momento preciso estamos unidos.

A mis sobrinos:

Como ejemplo de un esfuerzo alcanzado.

A Daniel Carlos, mi esposo:

Por todo el amor y apoyo brindado que hicieron posible - la culminación de este trabajo, a él por ser el hombre - a quién amo.

A G R A D E C I E N T O S

Al M.C. Luis J. Galán Wong por el apoyo y conocimientos brindados por él, además de darme la oportunidad de seguir con mi formación profesional y dirigir el presente trabajo.

A la M.C. Lilia H. Morales Ramos por su valiosa ayuda y atención para la realización de este trabajo, por su perseverancia para la culminación del mismo y por la amistad que nos une esperando que continúe siempre.

A la Dra. Cristina Rodríguez de Tamez por su ayuda e interés en el presente trabajo.

A la M.C. Marivel Gómez Treviño, a ella mi más sincero agradecimiento por su incondicional ayuda a quien debo parte de este trabajo. A ti por los momentos buenos y malos que compartimos, a ti por ser mi mejor amiga.

Al Ing. Cuauhtémoc Núñez Ramos por su ayuda en la realización de los Bioensayos al inicio de este trabajo.

A Filiberto Molina por la cooperación prestada en la realización de los Bioensayos en este trabajo.

A la Sra. Yolanda Castillo de Hernández por su ayuda en la mecanografía de este trabajo.

Al ITESM por proporcionar las larvas para el establecimiento de la cría de insectos y permitirme utilizar sus instalaciones.

Al IMSS por permitirme utilizar el equipo del Laboratorio del Centro de Abastecimiento Regional.

A mis amigos del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Sueño por el tiempo, ayuda y consejos que hemos compartido; a todos ustedes, gracias.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL:
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y
DEL SUELO. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E
INMUNOLOGIA.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
BAJO LA DIRECCIÓN DEL M.C. LUIS J. GALAN WONG.

C O N T E N I D O

PAGS.

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	4
ANTECEDENTES	5
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	19
DISCUSIONES Y CONCLUSIONES	22
TABLAS	25
FIGURAS	33
LITERATURA CITADA	53

RESUMEN

La beta exotoxina producida por Bacillus thuringiensis se caracteriza por presentar un amplio espectro de toxicidad hacia insectos de diversos ordenes. Actualmente el interés - en este compuesto radica en determinar su presencia en sobrenadantes de cultivos de Bacillus thuringiensis de cepas nativas y de importancia industrial. Con el propósito de probar que el método de precipitación con etanol es útil para detectar beta exotoxina en sobrenadantes de cultivos de Bacillus thuringiensis y de aplicarlo a cepas nativas de este microorganismo, se aplicó dicho método a cepas de colección internacional reportadas como productoras (HD-59 y HD-41). Se comprobó que ambas cepas producen beta exotoxina al presentar el espectro de absorción característico de este compuesto y similar al espectro de absorción del "patrón de referencia" de beta exotoxina probado en este trabajo. La cepa HD-41, -- produjo una cantidad de beta exotoxina de 7.6 mg/litro de medio de cultivo, menor a la cantidad producida por la cepa -- HD-59 que fué de 28.4 mg/litro. El resultado de ésta última -- cepa se comprobó biológicamente en larvas de Musca doméstica de tercer estadio, obteniéndose valores de dosis letal media DL-50 de 240 ul/g de dieta, comparado con 98.28 ul/g, obtenido con el "patrón de referencia" de beta exotoxina. De 10 cepas nativas analizadas, todas presentaron resultados negativos para el método de precipitación con etanol, los cuales -- fueron corroborados con bioensayos, en donde valores menores al 10% de mortalidad fueron obtenidos. Por lo anterior concluimos que el método de precipitación con etanol es útil para detectar la presencia de beta exotoxina a concentraciones mayores de 7.6 mg/litro en cultivos de Bacillus thuringiensis.

INTRODUCCION

Actualmente el uso indiscriminado de insecticidas químicos para el control de insectos plaga, principalmente de importancia agrícola y forestal, ha ocasionado diversos efectos nocivos en el medio ambiente, tales como toxicidad selectiva, residualidad y resistencia adquirida en insectos. Las alteraciones de tipo ecológico provocadas por estos efectos ha originado la búsqueda de métodos alternativos de control, destacándose el Control Biológico (32).

El Control Biológico se basa, principalmente, en el uso de organismos entomopatógenos o sus productos. Las múltiples ventajas que ofrece este tipo de control sobre los insecticidas químicos, así como la demanda mundial, ha incrementado cada día el interés en estudiar y obtener nuevos productos de naturaleza biológica con propiedades bioinsecticidas que amplíen las posibilidades del control de insectos plaga (32).

Durante las tres últimas décadas se ha estudiado diversos tipos de microorganismos entomopatógenos, destacándose -- dentro del grupo de las bacterias a Bacillus thuringiensis y sus subespecies sobre las cuales se siguen enfocando múltiples estudios básicos y aplicados. Esta bacteria se caracteriza por producir diversas toxinas, considerándose entre las -- más importantes por sus propiedades entomopatógenas a las denominadas delta endotoxina y beta exotoxina (20,22,51).

A nivel mundial, la delta endotoxina es un producto de gran utilidad para el control de lepidópteros, dípteros y más recientemente coleopteros (51). La beta exotoxina,^{es} un compuesto de naturaleza nucleotídica con un peso molecular aproximado de 700 Da, también conocida como thuringiensin (43), presenta un espectro amplio de toxicidad sobre diversos ordenes de insectos y su uso se encuentra limitado a países como Ru--

sia principalmente (11)(Tabla N° 1).

La beta exotoxina presenta un potencial en subespecies de Bacillus thuringiensis para el control de plagas de importancia agrícola y del sector salud, logrando abrir diversos campos de estudio, sin embargo, es motivo de discusión ya que algunos investigadores reportan un posible efecto mutagénico hacia organismos superiores (6,35).., lo cual ha limitado el interés en este compuesto enfocándose principalmente ha establecer la ausencia de ésta toxina en cepas nativas y de uso industrial de Bacillus thuringiensis.

Hoy en día se conocen diversos métodos de detección para este compuesto, sin embargo la mayoría de éstos son laboriosos o requieren un mínimo de siete días, como en el caso de los bioensayos con larvas de Musca doméstica (8). Este hecho ha generado la necesidad de encontrar métodos sencillos de detección de esta toxina, lo cual sería de gran utilidad en los programas de caracterización de cepas de Bacillus thuringiensis.

Por lo anterior, se propone como objetivo principal del presente trabajo, probar un método de análisis químico sencillo para la detección de la beta exotoxina en subespecies de Bacillus thuringiensis.

H I P O T E S I S

Suponemos que el método químico de precipitación con etanol es útil para detectar beta exotoxina en cepas de Bacillus thuringiensis.

ANTECEDENTES

McConell y Richards, en 1959, descubren la beta exotoxina al inyectar el sobrenadante esterilizado de un cultivo de Bacillus thuringiensis en el hemocele del último estadio larvario de la palomilla Galleria mellonella (10).

H. De Barjac y Dedonder, de 1965 a 1968, aislaron y caracterizaron la beta exotoxina a partir de la cepa de Bacillus thuringiensis serotipo H-1 (34). Posteriormente Farkas, en 1969, propone la estructura química de esta toxina como un análogo nucleotídico con un peso molecular aproximadamente de 700 Da. (21). Recientes estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), corroboran el peso molecular de la toxina y su estructura química, definiéndola como un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a un ácido fosfoalárico (12). Fig. 1

En base a su estructura química, una característica de este compuesto, es su espectro de absorción en ultravioleta, el cual presenta una absorción máxima a 260 nm y una absorción mínima a 230 nm. Fig. 2

Faust, en 1973, reporta a esta toxina como un producto extracelular, dializable, soluble en agua y termoestable a 120°C por 15 minutos (22), producido en algunas variedades de Bacillus thuringiensis durante la fase de crecimiento exponencial (26).

De Barjac H. et al, en 1966, al comparar la producción de la toxina por mutantes acristalíferas y asporógenas con una cepa nativa, encuentra que la toxina no está asociada con la formación de cristales y esporas, produciéndose aún en ausencia de dichas estructuras (20).

Se han reportado otros aislados, además del serotipo H-1 como productores de la toxina, entre estos se encuentran el 4ac, 5, 7, 9, y el serotipo 10 (7,10,15,40). En 1973, DeBarjac y Burgerjon, reportan a los serotipos 11 y 12 como -- productores de la toxina (41), sin embargo, su producción es considerada 500 veces menor que la del serotipo H-1 (12)(Tabla 2).

El efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de la toxina ha sido poco estudiado. Conner y Hansen, en 1967, en un estudio sobre el efecto de la valina, leucina e isoleucina en el crecimiento de - - - - - Bacillus thuringiensis y la producción de la beta exotoxina, encuentran un máximo crecimiento y una mayor producción de - la toxina en una solución a base de sales minerales con 1% - de casaminoácidos (12,25). Posteriormente, en 1980, Mohd y - Salleh, estudian el efecto de seis diferentes medios de cultivo, incluyendo el de Conner y Hansen (1967), en la producción de la beta exotoxina, por tres variedades de - - - - - Bacillus thuringiensis, y encuentran que la actividad varia cuando se cultivan en los diferentes medios de cultivo, así como al utilizar el mismo medio en diferentes experimentos - (37).

Actualmente el medio de cultivo más usado para la recuperación de la beta exotoxina es el de Conner y Hansen, ya que evita complicaciones en los procedimientos para la obtención de la toxina por ser un medio simple (43). Cuando la -- productividad es el objetivo principal, más que la fácil recuperación de la toxina, algunos autores han adicionado ingredientes complejos al medio como almidón o líquido de remojo de maíz (Barbashova y Vladimirova, 1976), con la finalidad de hacer el medio más rico y económico y lograr así, un mayor crecimiento del microorganismo (43).

Los métodos más comunes para separación de nucleótidos han sido utilizados para la purificación de la beta exotoxina.

Así, De Barjac y Dedonder en 1965, llevan a cabo la precipitación con sales de mercurio (16,18,19), mientras que Bond et al, lo hacen con sales de bario. Posteriormente, Kim y -- Huang en 1970, hacen uso del carbón vegetal activado como método de separación y recuperan la toxina por elución con una mezcla de metanol, agua y amoníaco acuoso(44,46,55).

A partir de 1970, los métodos se basan en la adsorción de la toxina sobre carbón activado, seguido de eluciones con diferentes mezclas de solventes orgánicos. La purificación final se realiza principalmente por métodos cromatográficos en columna utilizando Dowex como soporte (12).

Benz, en 1966, describe un proceso de purificación en el que utiliza diferentes concentraciones de etanol para lograr la precipitación de la fracción tóxica en el medio de cultivo libre de células. Dicha fracción es denominada "cultivo prepurificado", el cual, posteriormente es purificado -- por cromatografía de intercambio iónico (2). Con éste método Carlberg, en 1973, determina en una curva de crecimiento de un cultivo de Bacillus thuringiensis, el tiempo al cual se -- obtiene la máxima cantidad de toxina (48 a 72 h) (12).

Bond et al, en 1971, realizan una revisión de los diferentes procesos de purificación y determinan que ninguno de éstos puede considerarse como un método cuantitativo. Menciona que la concentración inicial de la toxina en el sobrenadante de un cultivo libre de células es de aproximadamente -- 50 mg por litro de medio de cultivo, al eluir la toxina del carbón vegetal la recuperación que se logra es de un 57% y -- el rendimiento de la exotoxina purificada por cromatografía es de un 36% (3).

Sebesta, et al, en 1973, realizaron un ensayo de gran precisión, denominado de dilución isotópica, el cual utiliza la toxina pura marcada con P^{32} . Este método fué utilizado -- básicamente para medir el rendimiento al utilizar otros méto

dos simples (carbón vegetal activado), como método de separación (47); sin embargo, es un método laborioso y de alto costo para este fin.

Una revisión más reciente sobre la producción, purificación, bioensayos y procedimientos de identificación es realizada por Varikova, en 1978. Los ensayos biológicos incluyen un método en el cual se estima la inhibición de la bacteria Sarcina flava por la beta exotoxina (Rosenberg et al, -- 1970), posteriormente Carlberg, en 1973, menciona que este método es poco sensible y que requiere de concentraciones de exotoxina mayores de 0.5 mg por ml (12). Los ensayos con insectos han sido usados para determinar la eficiencia relativa de varios procedimientos de producción y purificación de la toxina, probándose en los siguientes insectos: - - - - - Mamestra brassicae, Pieris brassicae, Galleria mellonella, - - Drosophilla melanogaster, Heliothis zea, Aedes aegypti, - - y Musca doméstica. (33,36).

El método biológico más comunmente utilizado para probar la presencia de beta exotoxina son los bioensayos con -- larvas de tercer estadio de Musca doméstica (mosca casera) - (4), las cuales se desarrollan en adultos morfológicamente a normales al estar en contacto con la toxina (14). Sin embargo, los bioensayos presentan algunas limitaciones como la poca seguridad de las potencias estimadas y la poca reproducibilidad de los mismos (28). Debido a que ningún método ha sido adoptado rutinariamente, el laborioso e inconsistente método de bioensayos con larvas de Musca doméstica ha permanecido como el método de selección para la detección de la producción de beta exotoxina por cepas de Bacillus thuringiensis (38,41).

Oeheler, en 1981, propone el uso de Cromatografía Líquida de Alta Resolución "HPLC", para determinar la producción de beta exotoxina en cepas de Bacillus thuringiensis, sin embargo, Johnson, en 1983, menciona las limitaciones que presen

ta el uso de "HPLC" al encontrar que un compuesto, además de la toxina, coeige con ésta, haciendo la técnica poco confiable para la detección y cuantificación de la beta exotoxina (28).

Cabe mencionar que los rendimientos de producción reportados varían de acuerdo al serotipo, e incluso, dentro de los aislados del mismo serotipo. Así, Bond et al, en 1969, reportan un rendimiento de 50 mg por litro de medio de cultivo, --- mientras que Sebesta et al, en 1973, al utilizar el método de dilución isotópica, reporta 120 mg por litro para la cepa de - Bacillus thuringiensis var. thuringiensis (47), mientras que - De Barjac y Lecadet, en 1976, reportan valores de 250 a 300 -- mg de toxina para esta misma cepa.

Una característica de éste compuesto es su amplio espectro de toxicidad, que abarca diversos órdenes de insectos como Orthoptera, Coleoptera, Lepidóptera y Díptera principalmente - (54) Dunn, en 1960, demostró la susceptibilidad de larvas de -- Musca doméstica a la beta exotoxina en heces de bovino, hecho que p^osteriormente originó se nombrara a este compuesto factor mosca (14).

S. S. Wasti, en 1973, estudió la actividad larvicida de la toxina contra dos especies de dípteros, Phoemis regina y - Othelia caesarium y encuentran una correlación directa entre dosis y mortalidad (53). Ignoffo et al , en 1977, al probar los efectos de la beta exotoxina en lepidópteros, específicamente sobre la maduración de larvas , longevidad y fecundidad de adultos y en la viabilidad de huevecillos , observaron que existe una inhibición del desarrollo de las partes bucales y que la fecundidad es afectada en adultos emergidos de larvas tratadas con la toxina (26).

Herbert, en 1985, realizó bioensayos con larvas de diferentes estadios larvarios de Heliothis zea, observando susceptibilidad por parte de este insecto a la beta exotoxina. Encuentra que la mortalidad se incrementa conforme la dosis es mayor, principalmente en los primeros estadios larvarios del

insecto (24).

Cntwell, en 1964, comprobó la susceptibilidad de - - - Aedes aegypti a la toxina. Un estudio más reciente fué realizado por Lecadet, en 1984, para analizar el efecto de la beta exotoxina sobre culícidos, particularmente en - - - - - Aedes aegypti, Anopheles stepheosi y Culex pipiens, donde observa que la susceptibilidad de los estadios larvarios a la toxina, es proporcional a la concentración '33).

Variková y Lesková, en 1972, observan al inyectar beta exotoxina en el hemocele de la palomilla Galleria mellonella que el efecto menor de la toxina es por vía oral que parenteral y concluyen que la toxina es degradada rápidamente en el intestino por fosfatasas intestinales (48,52).

Aunque las estructuras morfológicas afectadas por la toxina varían en los diferentes órdenes de insectos, estas usualmente siguen una secuencia, iniciando en las partes bucales, antenas, tórax y alas en adultos; y deformaciones en las pupas (34).

Sebesta et al, en 1969, reportan valores de dosis letal media (DL-50) por vía parenteral de 18 mcg/g de peso corporal en ratones (16). Un boletín emitido recientemente por los laboratorios Abbot (1986), reporta diferentes valores de --- DL-50 en animales de laboratorio a los cuales se administró beta exotoxina por diversas vías de inoculación, encontrando se que la vía más tóxica es por inhalación con 3 μ g/g de peso corporal (1).

Sebesta y Horská, en 1968, investigan el modo de acción de la toxina y encuentran que la toxina inhibe la ARN polimerasa dependiente de ADN de Escherichia coli "in vitro" y sugieren que dicha inhibición es la causa de su toxicidad (17,-29,45). A partir de 1969, en que se conoció la estructura química de la beta exotoxina se sugiere el potencial mutagénico

que esta molécula podría tener por su afinidad con el ADN.

Meretoja y Carlberg, en 1971, prueban la mutagenicidad de la beta exotoxina en varios sistemas de mamíferos. Ellos concluyen que dicha toxina no presenta efecto mutagénico ya que no encuentran alteraciones mitóticas en las células tratadas (30,35).

Thelestam, en 1972, realizó un estudio con fibroblastos humanos y encuentra que la toxina prepurificada por el método de Benz, no causa ningún efecto citotóxico (12).

Dash, en 1978, realizó estudios para observar el efecto citotóxico de la beta exotoxina en células de Rattus norvergicus. El utilizó colchicina como control, y encuentra cierto efecto citotóxico a concentraciones menores que la colchicina, sin embargo menciona que la dinámica de la acción de la exotoxina en células en división no está bien entendida y establece la necesidad de mayor investigación al respecto - - (13).

Lam y Webster, en 1972, sugieren que altas dosis de la toxina causan una inhibición de la síntesis de ARN de novo lo suficientemente grande como para causar la muerte y que la -- aparición de individuos morfológicamente anormales con concentraciones bajas de la toxina, podría ser el resultado de la - inhibición de algún tipo de ARN, involucrado en la formación de tejidos específicos en pupas y adultos (12).

Por otro lado, Panda en 1979, estudia los efectos clastogénicos, en algunos sistemas mitóticos de plantas, de la beta exotoxina y la delta endotoxina de Bacillus thuringiensis y encuentra que la beta exotoxina presenta efecto clastogénico en todos los sistemas probados (42).

Kahkonen, en 1979, prueba la mutagenicidad de sobrenadantes de cultivos de Bacillus thuringiensis, midiendo la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en células de -

médula ósea de ratas tratadas con dichos sobrenadantes. Sus resultados demuestran que la beta exotoxina de Bacillus - - - -- thuringiensis no presenta actividad mutagénica ó clastogénica (30).

Cantwell, en 1982, emplea la prueba microsomal conocida como prueba de Ames, la cual utiliza cepas de Salmonella - - - -- thiophymurium, para probar la actividad mutagénica de la exotoxina producida por una cepa de Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni. Sus resultados indican que carece de actividad mutagénica y propone que sean utilizados como evidencia para el registro de este producto como bioinsecticida (9).

El estudio más reciente sobre la mutagéncidad de la beta exotoxina fué realizado por Marec et al, en 1989. Las toxinas producidas por algunos serotipos de Bacillus thuringiensis son sujetas a pruebas de mutación somática y recombinación en Brosophila melanogaster. Los resultados indican que este compuesto no presenta ninguna actividad genotóxica (36). Sin embargo existe gran controversia en el uso de este producto como bioinsecticida, por su naturaleza química que lo compromete -- con el material genético de las células.

Algunos autores proponen el uso de la beta exotoxina como una sustancia útil para estudiar el ciclo celular, debido a la habilidad que presenta para inhibir la formación de la placa celular durante la citoquinesis, acción similar de la cafeína (50).

El uso de esta toxina no ha sido todavía aprobado para ser usado como bioinsecticida en E.U.A. por la EPA " Agencia de Protección Ambiental ", sin embargo los Laboratorios Abbot han desarrollado un producto a base de beta exotoxina denominado Dibeta, el cual fué propuesto ante esta institución " EPA " para su registro. Este producto fué desarrollado principalmente para el control de plagas, principalmente de algodón, papa y cultivos ornamentales (1).

Aunque en E.U.A., se carece de este producto como bioinsecticida comercialmente, países como Rusia han utilizado una preparación comercial a base de beta exotoxina llamada Bytoksybacillín para controlar el escarabajo colorado de la papa, Leptinotarsa decemlineata, por mas de 10 años (11,27).

MATERIAL Y METODOS

a) Cepas utilizadas:

Como control positivo se utilizaron cepas de colección internacional reportadas como buenas productoras de beta -exotoxina:

- * HD-59 Bacillus thuringiensis var. thuringiensis
- * HD-41 Bacillus thuringiensis var. thuringiensis

Como control negativo se utilizó:

- * HD-1 Bacillus thuringiensis var. kurstaki
- * Estas cepas fueron proporcionadas gentilmente por el Dr. Howard T. Dulmage del Departamento de Agricultura de Weslaco, Texas en E.U.A.

Por carecerse en el mercado de un estándar certificado de beta exotoxina o un producto comercial con una pureza -- química validada, se obtuvo un producto de -exotoxina de - pureza desconocida proporcionado por los laboratorios Abbot (Lote: 52-595-BD, 4 de Mayo de 1983), el cual fué denominado para este trabajo como " patrón de referencia ".

Las cepas nativas de Bacillus thuringiensis fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. -- (Tabla 3).

b) Mantenimiento de las cepas:

Las cepas fueron mantenidas mediante resiembras periódicas cada tres meses en tubos de ensayo con agar nutritivo inclinado (Merck) pH 7 y refrigeración a 4°C.

c) Cultivo de las cepas para la producción de β -exotoxina.

a) Preparación del Inóculo:

Las cepas fueron activadas por resiembra en tubos con agar nutritivo inclinado e incubadas durante 24 h a 37°C. Se transfirió una asada a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo a pH 7; estos matraces se incubaron - en agitación rotatoria en un shaker (Lab-Line) a 150 rpm durante 18 h a 37°C.

b) Medio de cultivo para la producción de β -exotoxina.

Se tomaron 2 ml a partir del inóculo de cada una de las cepas (control y nativas), y se transfirieron a matraces - de 1000 ml con 200 ml del medio de cultivo para la produc- - ción de la toxina, el cual consiste en un medio a base de sa- les minerales y casaminoácidos (Tabla 4), a pH 7. Los ma- -- traces se incubaron en agitación rotatoria a 150 rpm durante 48 h a 37°C. El tiempo de incubación se determinó por obser- vación directa al microscopio (a las 48 h inicia la fase de esporulación de los cultivos). El medio de cultivo fué cen- trifugado a 10 000 rpm por 30 min. en una centrífuga refrige- rada (Beckman Mod. J2-21), para separar el sobrenadante -- del paquete celular. El sobrenadante recuperado fué esterili- zado a 120°C por 15 min. y filtrado a través de membranas -- Millipore de 0.22 micras de tamaño de poro. Las muestras ob- tenidas se mantuvieron en congelación a 2°C hasta el momento de su uso (Figura 3).

c) Análisis del Sobrenadante.

a) Precipitación con etanol:

Los sobrenadantes obtenidos fueron descongelados a tem- peratura ambiente, se tomaron 20 ml de cada uno de estos so- brenadantes y se transfirieron a vasos de precipitado de 100 ml, respectivamente. Posteriormente, se concentraron diez ve- ces el volúmen original en un baño metabólico a una tempera- tura de 90°C por 20 min.

Los concentrados se mezclaron con un volúmen igual de -

etanol absoluto (Merck) y se mantuvieron a 4°C por 24 h para acelerar la precipitación. Después de este tiempo, el sobrenadante se decantó y se llevó a una concentración de alcohol del 60%, manteniéndose a 4°C por 24 h. Posteriormente la concentración de etanol del sobrenadante decantado -- fué llevada a 90%, concentración a la cual se reporta que -- precipita la toxina. El precipitado obtenido con esta con-- centración de alcohol es disuelto en agua destilada para su análisis espectrofotométrico. Este mismo procedimiento se -- realizó con 20 ml de medio de cultivo estéril, el cual fué utilizado como control (Figura 4).

b) Análisis espectrofotométrico:

Tomando como base el espectro de absorción característico reportado para este compuesto, el cual por su estructura química presenta una absorción máxima a 260 nm y una mínima a 230 nm, aproximadamente, se realizó un barrido del -- patrón de referencia de la beta exotoxina en un espectrofotómetro Mod. DU-7, Marca Beckman, utilizando como blanco de ajuste agua destilada (Figura 2). El espectro de absor-- ción obtenido es usado como referencia para el análisis espectrofotométrico de los precipitados etanólicos obtenidos de los sobrenadantes.

Se tomó 1 ml de cada precipitado, respectivamente, lle-- vándose a un volumen final de 25 ml con agua destilada para obtener una dilución de 0.04 mg/ml; posteriormente se reali-- zó el barrido de absorción en la región de 200 a 300 nm, -- usando agua destilada como blanco de ajuste (Figuras 6 y -- 20).

c) Curva de calibración del patrón de referencia de la β -exotoxina.

A partir del patrón de referencia cuya concentración -- real es desconocida, se preparó una solución patrón de 1 mg/ ml; de esta solución se obtuvieron diluciones correspondien

tes a: 0.004, 0.012, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 mg/ml. Posteriormente se determinó la absorbancia de dichas soluciones a su longitud de onda máxima de 260 nm, en un espectrofotómetro Marca Beckman Mod. DU-7, con agua destilada como blanco de ajuste (Tabla 5).

En base al coeficiente de extinción molar reportado para este compuesto se aplicó la siguiente fórmula a las lecturas de absorbancia obtenidas en cada una de las diluciones analizadas, con la finalidad de conocer la concentración aproximada de cada una de ellas:

$$C = \frac{A}{(e) (B)}$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra

e = Coeficiente de extinción molar (14,200)

B = Espesor de la celda (1 cm)

C = Concentración

Finalmente se efectuó con los datos, un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para obtener la linealidad de los valores de concentración obtenidos anteriormente.

E) Bioensayos:

Para corroborar los resultados obtenidos en el análisis espectrofotométrico, se procedió a realizar bioensayos con larvas del tercer estadio de Musca doméstica, por ser este el método comúnmente empleado.

a) Cría de los insectos:

Los adultos de Musca doméstica se criaron asépticamen

te en una dieta a base de azúcar y agua a una temperatura de 32°C y una humedad relativa de 80%. Los huevecillos colectados se transfirieron a una dieta a base de alfalfa y agua para el desarrollo de las larvas. Posteriormente se seleccionaron las larvas del tercer estadio para usarse directamente en el bioensayo.

A partir de los sobrenadantes descongelados a temperatura ambiente se prepararon diluciones con agua destilada para obtener las concentraciones a probar: 500 mc1/g de dieta (como dosis única), 40 mc1/g, 120 mc1/g, 280 mc1/g, -- 360\mc1/g, 360 mc1/g y 480 mc1/g de dieta.

La dieta utilizada en el bioensayo consiste en 22.5 g de alfalfa molida, 0.075 g de ácido sórbico, 0.150 g de ácido parametilbenzónico (estos últimos como inhibidores de hongos). Los componentes se mezclan con las diluciones obtenidas de los sobrenadantes y se homogenizan con una batidora de mano eléctrica (Figura 5).

Cada dosis fué probada por triplicado en cada uno de los sobrenadantes. Como controles negativos se usaron, el sobrenadante de la cepa HD-1 (Bacillus thuringiensis var. kurstaki), el medio de cultivo estéril y agua destilada; como controles positivos se utilizaron el sobrenadante de la cepa HD-59 (Bacillus thuringiensis var. thuringiensis) y el patrón de referencia de beta exotoxina.

Se colocaron 25 larvas del tercer estadio de - - - - - Musca doméstica en cada uno de los recipientes que contenían la dieta y se incubaron a 37°C y 80% de humedad relativa durante 7 días. Posteriormente se obtuvieron los datos como número de larvas muertas los cuales fueron analizados a través del análisis Probit para obtener la Dosis Letal Media (DL-50).

R E S U L T A D O S

Cultivo de las cepas para la producción de beta exotoxina.-

Todas las cepas probadas (control y nativas), presentaron un crecimiento favorable en el medio de Conner y Hansen. - El tiempo de fermentación (48 h), se determinó por observación directa al microscopio del inicio de la fase de esporulación - reportado como el período al cual se produce la mayor cantidad de beta exotoxina (12).

Análisis Espectrofotométrico.-

Los resultados de los análisis espectrofotométricos de las muestras tratadas, indican que el patrón de referencia de beta exotoxina presentó una total similitud con el espectro de absorción característico reportado para este compuesto -- (Fig. 6), encontrándose un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm.

Al comparar los espectros de absorción de los precipitados etanólicos de los sobrenadantes de las cepas HD-59 -- (Bacillus thuringiensis var. thuringiensis) y HD-41 -- (Bacillus thuringiensis var. thuringiensis) con el espectro de absorción del patrón de referencia, observamos que en los tres casos se presenta una absorbancia máxima a 260 nm, sin embargo, los valores de absorción a esta longitud de onda en las cepas HD-59 y HD-41 son menores a los obtenidos con el patrón de referencia, como se observa en las figuras 7 y 8.

Por otro lado, la cepa HD-1 (Bacillus thuringiensis var. kurstaki), utilizada como control negativo, no presenta absorción a dicha longitud de onda, similar al medio de cultivo estéril (Fig. 9 y 10).

En el caso de las cepas nativas, de un total de 10 sobrenadantes analizados, todos presentaron resultados similares a los controles negativos con ausencia de absorción a la longitud de onda característica de 260 nm (Fig. 11 - 20).

Curva de Calibración.-

Se obtuvieron los valores de concentración real de las diluciones del patrón de referencia aplicando el coeficiente de extinción molar reportado para la toxina (14 200) y de las absorbancias obtenidas (Tabla 5). El análisis de regresión lineal simple para los valores de concentración obtenidos anteriormente indican una linealidad de los datos de 0.999.

Las concentraciones aproximadas de beta exotoxina producida por las cepas HD-59 y HD-41, se obtuvieron en base a la correlación entre las absorbancias de los precipitados etanólicos de dichas cepas y las concentraciones reales obtenidas en la curva de calibración. De ésta manera, para la cepa HD-59, cuya absorbancia aproximada es de 0.400, su concentración aproximada es de 0.0284 mg/ml, mientras que para la cepa HD-41, con 0.100 de absorbancia aproximadamente, su concentración aproximada es de 0.0076 mg/ml. En el caso del patrón de referencia, en donde se obtuvo una absorción de 0.500 aproximadamente, la concentración que se obtiene es de 0.0351 mg.ml (Tabla 6).

Extrapolando los valores de concentración obtenidos en las cepas HD-59 y HD-41, la cantidad de beta exotoxina producida por ambas cepas es de 28.4 mg/l y 7.6 mg/l, respectivamente.

Bioensayos.-

Los resultados obtenidos químicamente fueron corroborados biológicamente con bioensayos en larvas del tercer estadio de Musca doméstica. Para la cepa HD-59 (Bacillus thuringiensis var. thuringiensis) utilizado como control positivo, se obtuvieron valores de 16.0% y 73.7% de mortalidad en las dosis menor y mayor respectivamente. El análisis Probit de estos datos indican una DL-50 de 240 µl/g de dieta (Tabla 6).

El patrón de referencia de beta exotoxina fué el que presentó los porcentos de mortalidad más altos (Tabla 7), con 30.60% y 80.0% para la dosis menor y mayor respectivamente.

te. Se obtuvo una DL-50 de 92.28 μ l/g de dieta al analizar -- los datos estadísticamente.

En el caso de la cepa HD-1 (Bacillus thuringiensis var. kurstaki), los resultados fueron negativos con valores menores al 10% de mortalidad, excepto en la dosis de 360 μ l/g de dieta en donde se obtuvo 12%. Resultados similares con porcentajes de mortalidad menores al 10%, fueron obtenidos con el medio de cultivo estéril y el agua destilada, ambos controles negativos. Estos resultados no fueron analizados estadísticamente por presentar valores menores al 10% de mortalidad (Tabla 8).

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

El medio de Conner y Hansen resultó un medio favorable para el crecimiento de Bacillus thuringiensis similar a lo reportado en la literatura. Sin embargo, por los resultados obtenidos no puede descartarse la posibilidad de que sea necesario un medio más complejo para obtener un mayor crecimiento y una mayor producción de beta exotoxina.

La similitud entre los espectros de absorción para las cepas reportadas como productoras y el patrón de referencia de la beta exotoxina, indican que dichas cepas sí producen la toxina, sin embargo las diferencias de absorción sugieren que la producción de la toxina por dichas cepas es baja en estos experimentos. Aún más, la cepa HD-41 produce menor cantidad que la cepa HD-59, ambas pertenecientes a la variedad thuringiensis, reportada como buena productora de beta exotoxina. Esto apoya el trabajo de Mohd y Salleh (1980), donde se observa que la actividad tóxica de los aislados varía aún cultivándose en el mismo medio, por lo que concluimos que resulta difícil producir esta toxina con rendimientos constantes.

Se establece la utilidad del método de precipitación con etanol para detectar beta exotoxina, al analizar los espectros de absorción de los controles negativos: medio de cultivo estéril y el sobrenadante de la cepa HD-1, reportada como no productora de la toxina, en donde está ausente la curva típica de absorción de ^{la} beta exotoxina ~~con una ab-~~ sorción de beta exotoxina con una absorbancia máxima a 260 nm.

Debido a que se desconoce la concentración real del patrón de referencia de beta exotoxina utilizado en este trabajo se aplicó el coeficiente de extinción molar reportado para este compuesto por Sebesta y Horská, en 1972, con la finalidad de establecer un valor aproximado de la concentra

ción de beta exotoxina producida por las cepas HD-59 y HD-41. De esta manera concluimos que para el caso de la cepa HD-1, ésta se encuentra produciendo menor cantidad de beta exotoxina con un valor de 7.6 mg/litro de medio de cultivo, mientras que la cepa HD-59, resultó mejor productora con 28.4 mg/litro de medio de cultivo.

Comparando los valores obtenidos con valores reportados en la literatura, observamos que la cepa HD-41 se encuentra produciendo la octava parte, aproximadamente, del rendimiento más bajo reportado que es de 50 mg/litro, mientras que la cepa HD-59, está produciendo la mitad, aproximadamente, del mismo valor.

Para el caso de las cepas nativas (GM-S), los espectros de absorción de los precipitados etanólicos de estas cepas indican que no producen la toxina, al menos en cantidades detectables por este método, así, ya que la cepa HD-41 se encontró que produce 7.6 mg/litro y resultó detectable al aplicarle el método de precipitación con etanol, concluimos que dicho método puede ser útil en cepas que se encuentren produciendo arriba de esta concentración, sin embargo, consideramos que este valor va a ser variable según las condiciones en que se lleve a cabo el análisis y considerando que siempre deberá correrse un control positivo durante el mismo, el cual como se mencionó antes varía de igual forma en cada experimento que se lleve a cabo.

Por otro lado, observamos que los resultados obtenidos químicamente fueron corroborados con bioensayos en larvas del tercer estadio de Musca doméstica, en el caso de los controles positivos, únicamente la cepa HD-59 fué probada, ya que en base a los resultados obtenidos fué la cepa con mayor producción de toxina.

Dicha cepa, al igual que el patrón de referencia mostró porcentos de mortalidad relativamente altos en comparación con las cepas nativas las cuales corroboran los resultados negativos del análisis químico al obtener porcentos de mortalidad menores al 10%. En el caso de estas cepas, únicamente 4 fueron probadas en los bioensayos, esto debido a las dificultades técnicas presentadas en el cultivo y mantenimiento de las crías de Musca doméstica, las cuales originaron la pérdida total de las mismas. Sin embargo en base a los resultados obtenidos con estas 4 cepas probadas GM-7, GM-10, GM-48 y GM-78 es de esperarse un comportamiento similar de las 6 cepas restantes, ya que los resultados químicos de las mismas fueron negativos.

Cabe mencionar, que la metodología empleada en los bioensayos fué establecido para este trabajo ya que aunque éste sea el método más comúnmente empleado para detectar beta exotoxina en cultivos de Bacillus thuringiensis, actualmente se carece de un método establecido para realizarlo, por lo tanto se propone la necesidad de establecer y estandarizar una metodología para los bioensayos con este insecto.

Finalmente podemos concluir, que en comparación con el laboratorio e inconsistente método de bioensayo, el método de precipitación con etanol resulta ser un método práctico, sencillo y económico, el cual debe ser mas ampliamente estudiado.

TABLA 1..

FORMULACIONES COMERCIALES DE BETA EXOTOXINA Y
DELTA ENDOTOXINA

NOMBRE COMERCIAL	C O M P A Ñ I A
<u>I.- BETA EXOTOXINA:</u>	
BIOTOXKSYBACILLIN	All Union Inst. Agr. Micro biol. RUSIA
EKSOTOKSIN	Glavmikrobioprom. RUSIA
TOXOBACTERIN	Glavmikrobioprom. RUSIA
<u>II.- DELTA ENDOTOXINA:</u>	
AGRITOL	Merck & Co. E.U.A.
BAKTHANE	Rohm & Hass. E.U.A.
BACTOSPEINE	Roger Bellon. FRANCIA
BATHURIN	Chemapol-Biokyma. CHECOESLO VAQUIA.
BIOSPOR	Farbwerke Hoechst. ALEMANIA.
BIOTROL BTB	Nutrilitite Prod. E.U.A.
DENDROBACILLIN	Glavmikrobioprom. RUSIA
DIPEL	Abbot Labs. E.U.A.
ENTOBACTERIN	Glavmikrobioprom. RUSIA
INSEKTIN	Glavmikrobioprom. RUSIA
PARASPORIN	Grain Proc. Lab. E.U.A.
SPOREINE	LIBEC Laboratoire. FRANCIA
THURICIDE	Sandoz-Inc. E.U.A.

Tabla. 2.

VARIÉDADES DE CEPAS DE Bacillus thuringiensis REPORTADAS
 COMO PRODUCTORAS DE BETA EXOTOXINA

	SEROTIPO H
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>thuringiensis</u>	1
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>kenyae</u>	4a4c
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>dendrolimus</u>	4a4b
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>galleriae</u>	5a5b
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>aizawi</u>	7
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>tolworthi</u>	9
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>darmstadiensis</u>	10
<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>toumanoffi</u>	11a11b

TABLA 3.

CEPAS NATIVAS DE Bacillus thuringiensis (GM'S)

CLAVE*	V A R I E D A D	SEROTIPO
GM-7	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>aizawi</u>	7
GM-10	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>aizawi</u>	7
GM-18	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>neolonensis</u>	24
GM-23	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>aizawi</u>	7
GM-34	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u>	3 a b
GM-38	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>tohokuensis</u>	17
GM-40	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>tohokuensis</u>	17
GM-47	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>tolworthi</u>	9
GM-48	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>tohokuensis</u>	17
GM-78	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>tohokuensis</u>	17

CLAVE* = Nomenclatura de la colección de cepas de - - - - -
Bacillus thuringiensis de la FCB-UANL.

TABLA 4.

MEDIO PARA LA PRODUCCION DE LA BETA EXOTOXINA

Casaminoácidos	10.0 g/1to.
KH_2PO_4	5.0 g/1to.
K_2HPO_4	5.0 g/1to.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.05g/1to.
$\text{CaCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.05g/1to.
$\text{Na} (\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1.5 g/1to.
Citrato de sodio	3.0 g/1to.
pH	7

(Conner y Hansen 1967).

Tabla. 5

CURVA DE CALIBRACION

Concentracion teorica	Absorbancia	Concentracion real *, **
0.1 mg/ml	.5160	.0351 mg/ml
0.08 mg/ml	.4178	.0284 mg/ml
0.06 mg/ml	.3227	.0219 mg/ml
0.04 mg/ml	.2229	.0151 mg/ml
0.02 mg/ml	.1130	.0076 mg/ml
0.012 mg/ml	.0764	.0051 mg/ml
0.004 mg/ml	.0350	.0023 mg/ml

* Obtenida con el coeficiente de extinción molar (14,200)

** $r = 0.999$

Tabla 6.

TOXICIDAD DE LA CEPA HD-59 SOBRE LARVAS
DEL TERCER ESTADIO DE :
Musca doméstica

DOSIS	No. DE REPETICIONES	No. DE LARVAS TRATADAS	% DE MORTALIDAD
40 mc1/g	3	75	16 %
120 mc1/g	3	75	18 %
200 mc1/g	3	75	20 %
280 mc1/g	3	75	61.33 %
360 mc1/g	3	75	78.60 %
480 mc1/g	3	75	73.30 %

Tabla. 7

TOXICIDAD DEL PATRON DE REFERENCIA DE BETA
EXOTOXINA SOBRE LARVAS DEL TERCER ESTADIO

DE: Musca doméstica.

DOSIS	No. DE REPETICIONES	No. DE LARVAS TRATADAS	% DE MORTALIDAD
40 mc1/g	3	75	30.66 %
120 mc1/g	3	75	45.41. %
200 mc1/g	3	75	58.66 %
280 mc1/g	3	75	70.66 %
360 mc1/g	3	75	74.66 %
480 mc1/g	3	75	80.00 %

Tabla.8

RELACION DE TOXICIDAD DE CEPAS GM'S
Y CEPAS CONTROL, EN LARVAS
DE TERCER ESTADIO DE: Musca domestica.

CEPA	No. de repeticiones por dosis	No. de larvas tra- tadas por dosis	DOSIS (mcl/g)							% DE MORTALIDAD
			40	120	200	280	360	480		
GM-7	3	75	2.6%	0%	2.6%	1.33%	1.33%	1.33%	0%	
GM-10	3	75	0%	0%	1.33%	2.6%	0%	4%	0%	
GM-38	3	75	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
GM-78	3	75	0%	0%	0%	1.33%	0%	0%	0%	
Blanco ^a	3	75	2.6%	1.33%	1.33%	1.33%	1.33%	2.6%	0%	
Control negativo ^b	3	75	1.33%	0%	5.33%	2.6%	12.0%	1.33%	0%	
Control positivo ^c	3	75	16.0%	18.0%	20.0%	61.3%	78.6%	73.3%	0%	
Patrón de referencia	3	75	30.6%	45.4%	58.6%	70.6%	74.6%	80.0%	0%	
Testigo	3	75								

a = Medio de Cultivo estéril, b = Cepa HD-1, c = Cepa HD-59, * = El testigo es la mezcla de -
la dieta con agua por lo tanto es una sola dosis.

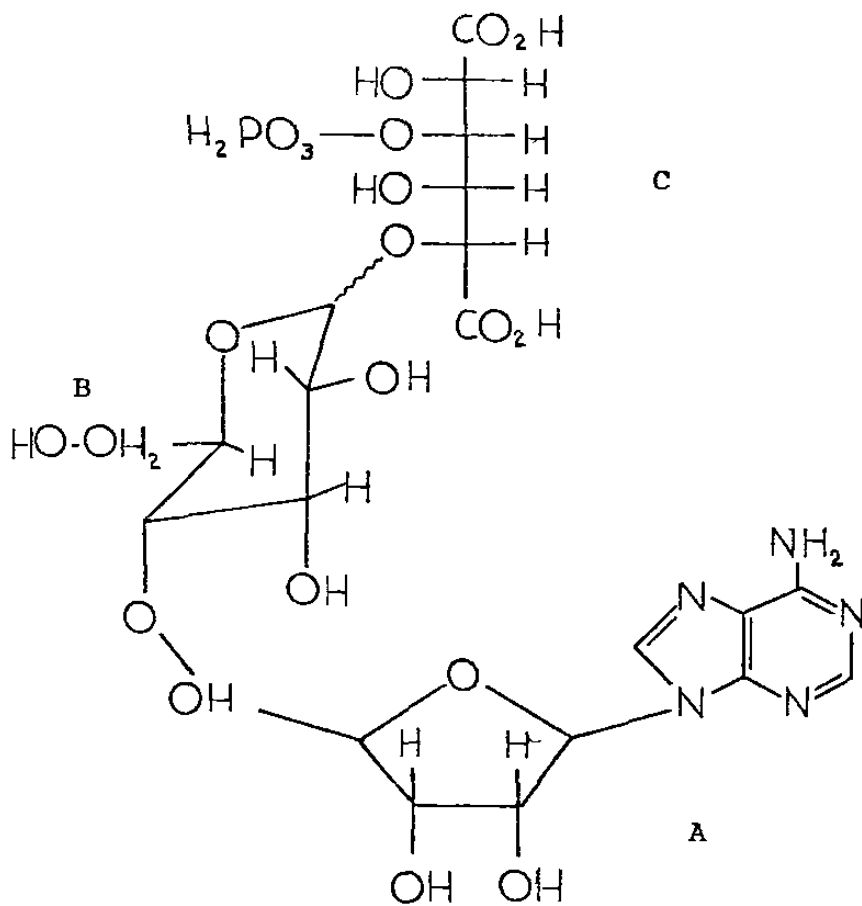
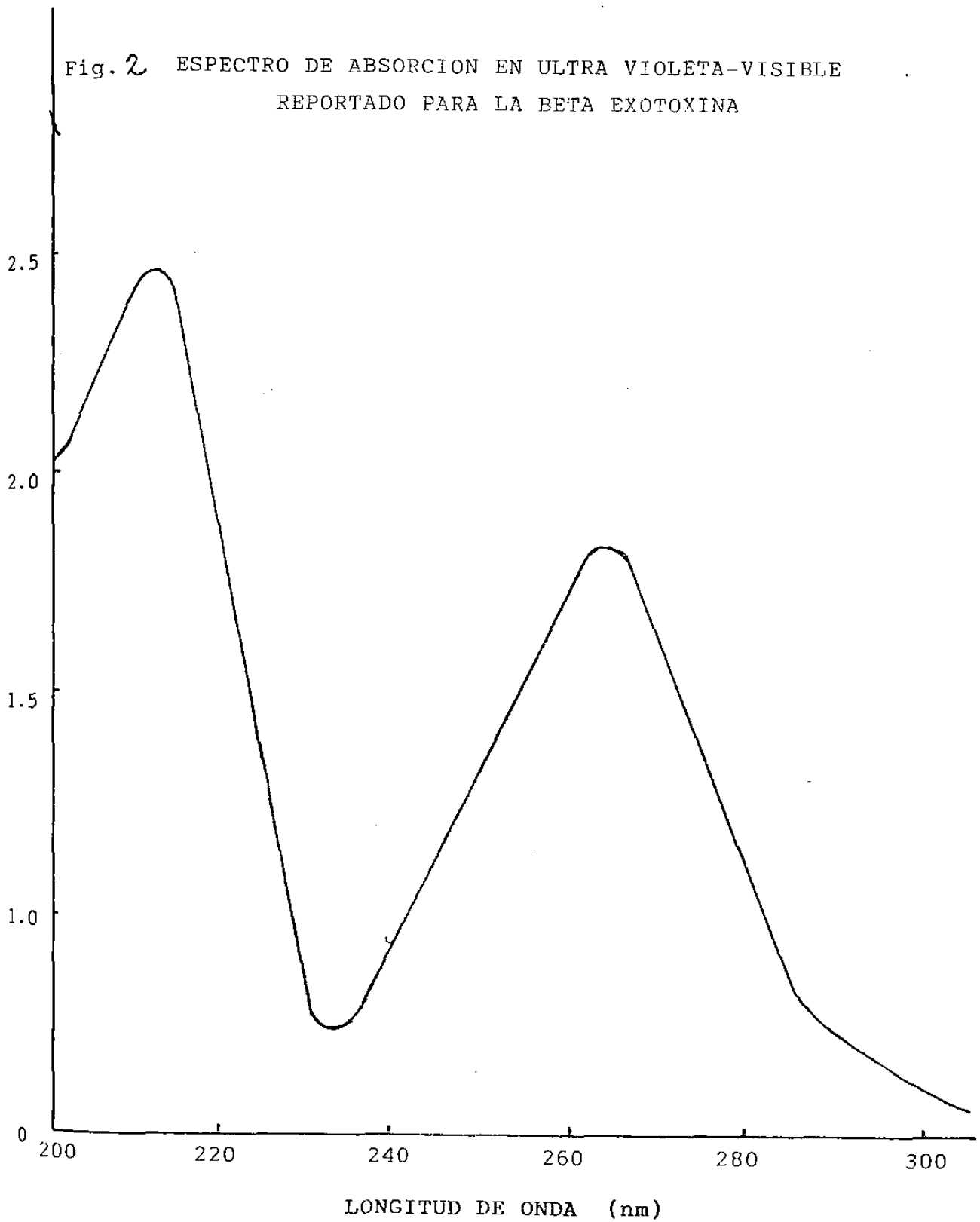


Fig. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA BETA EXOTOXINA
 A = Derivado Nucleotídico de Adenina
 B = Glucosa
 C = Acido Fosfoalárico

Fig. 2 ESPECTRO DE ABSORCION EN ULTRA VIOLETA-VISIBLE
REPORTADO PARA LA BETA EXOTOXINA



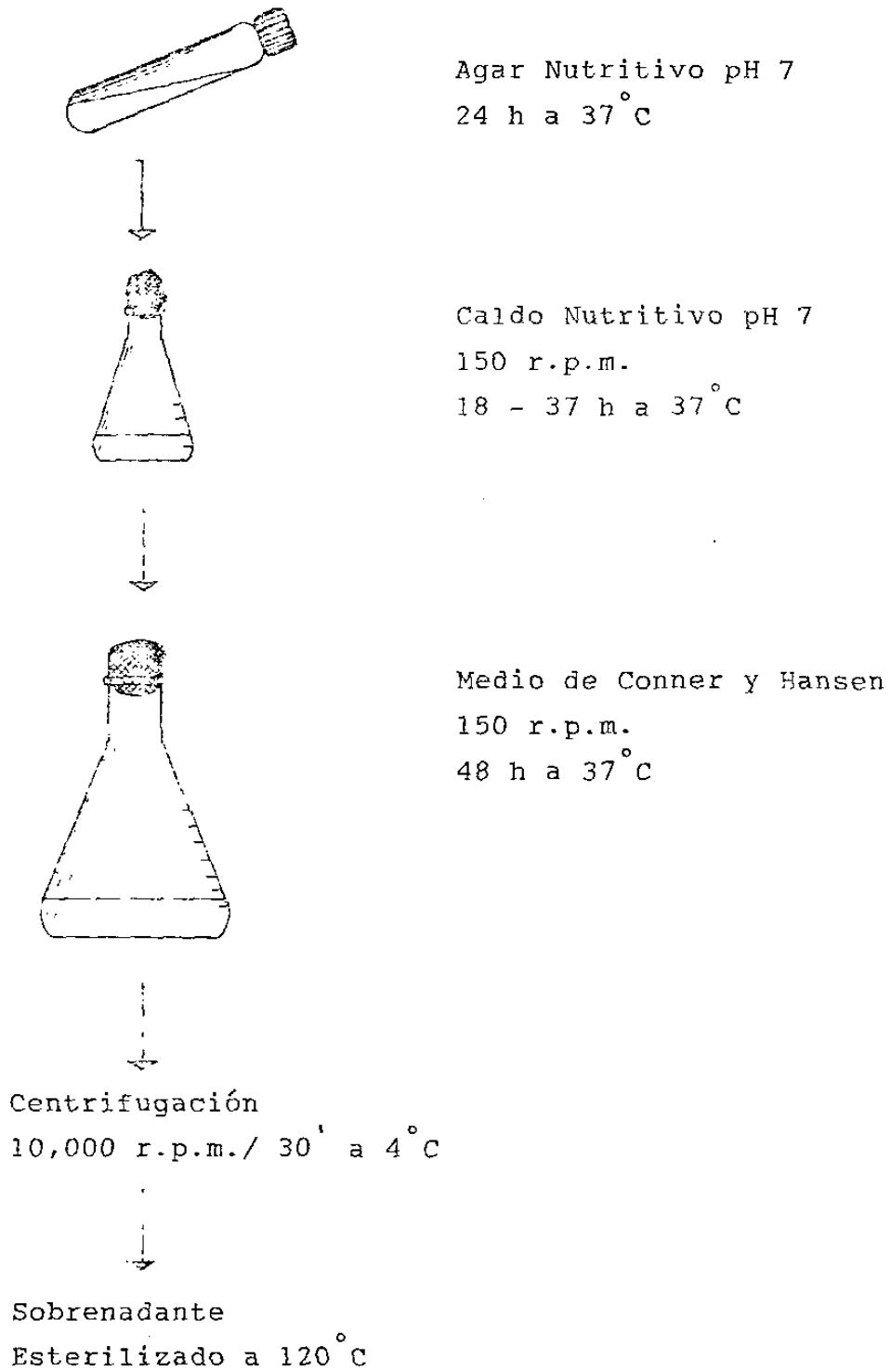


Fig. 3 Propagación de cepas de Bacillus thuringiensis y obtención del sobrenadante.

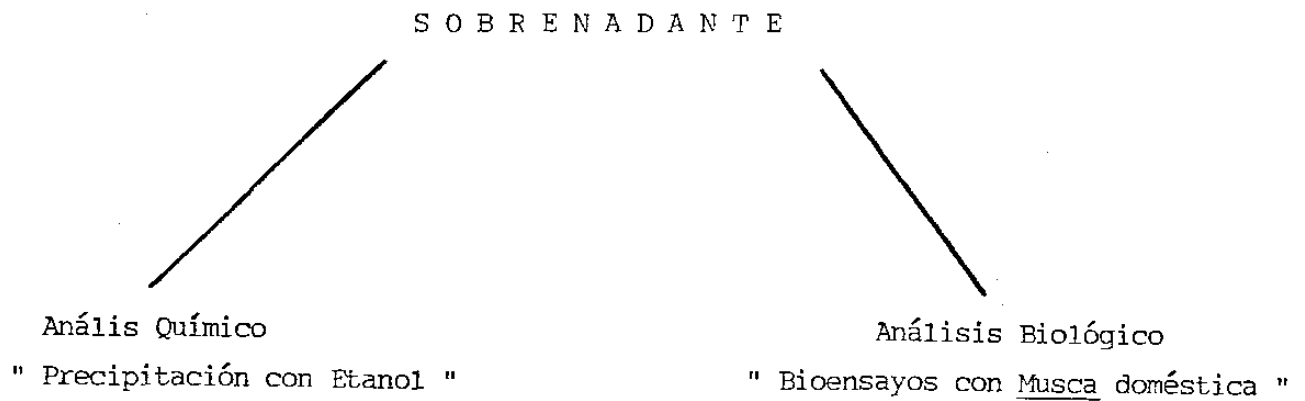
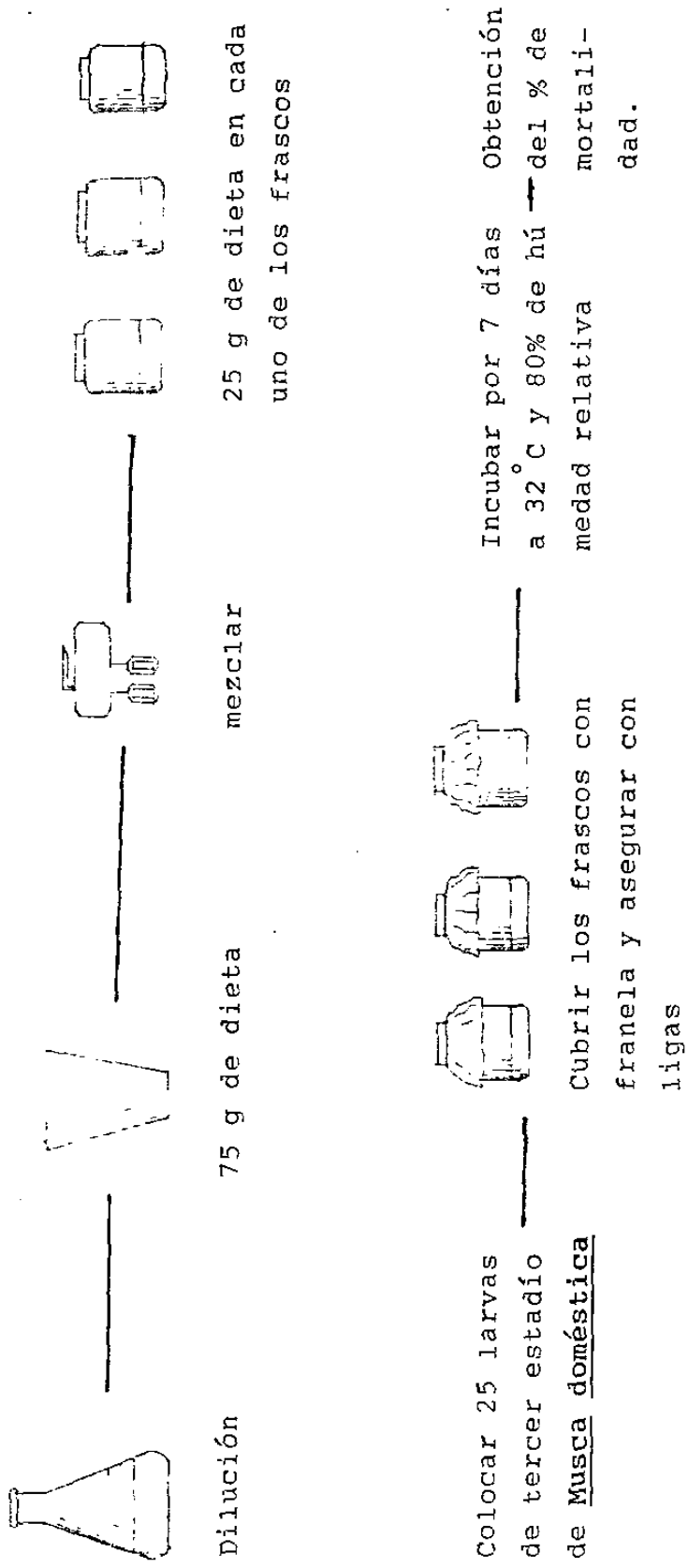


Fig. 4.- Análisis del Sobrenadante

Fig. 5.- ESQUEMA DE BIOENSAYO



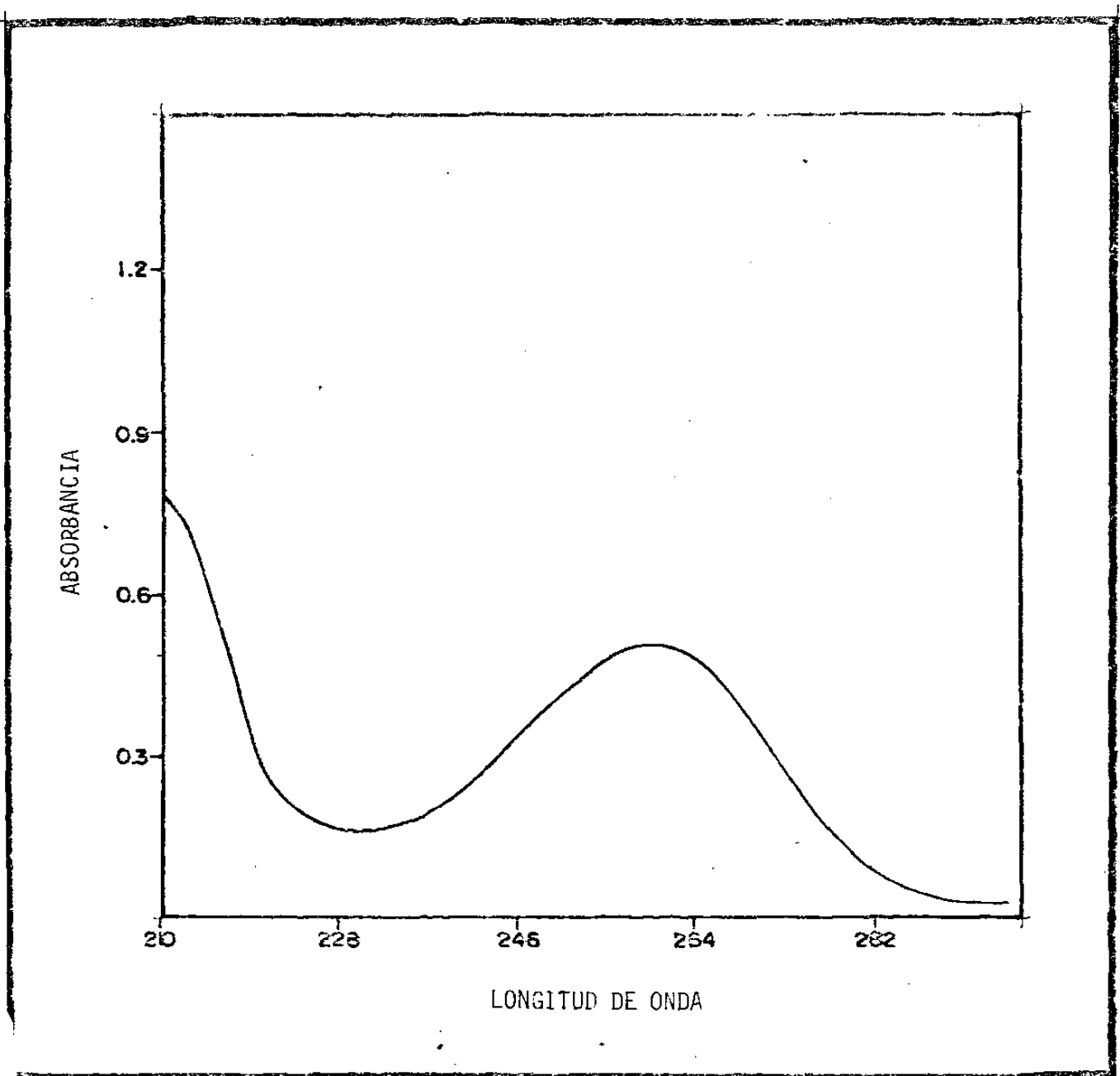


Fig. 6 Espectro de absorción ultravioleta del patrón de referencia de beta exotoxina. Lote: 52-595-BD.

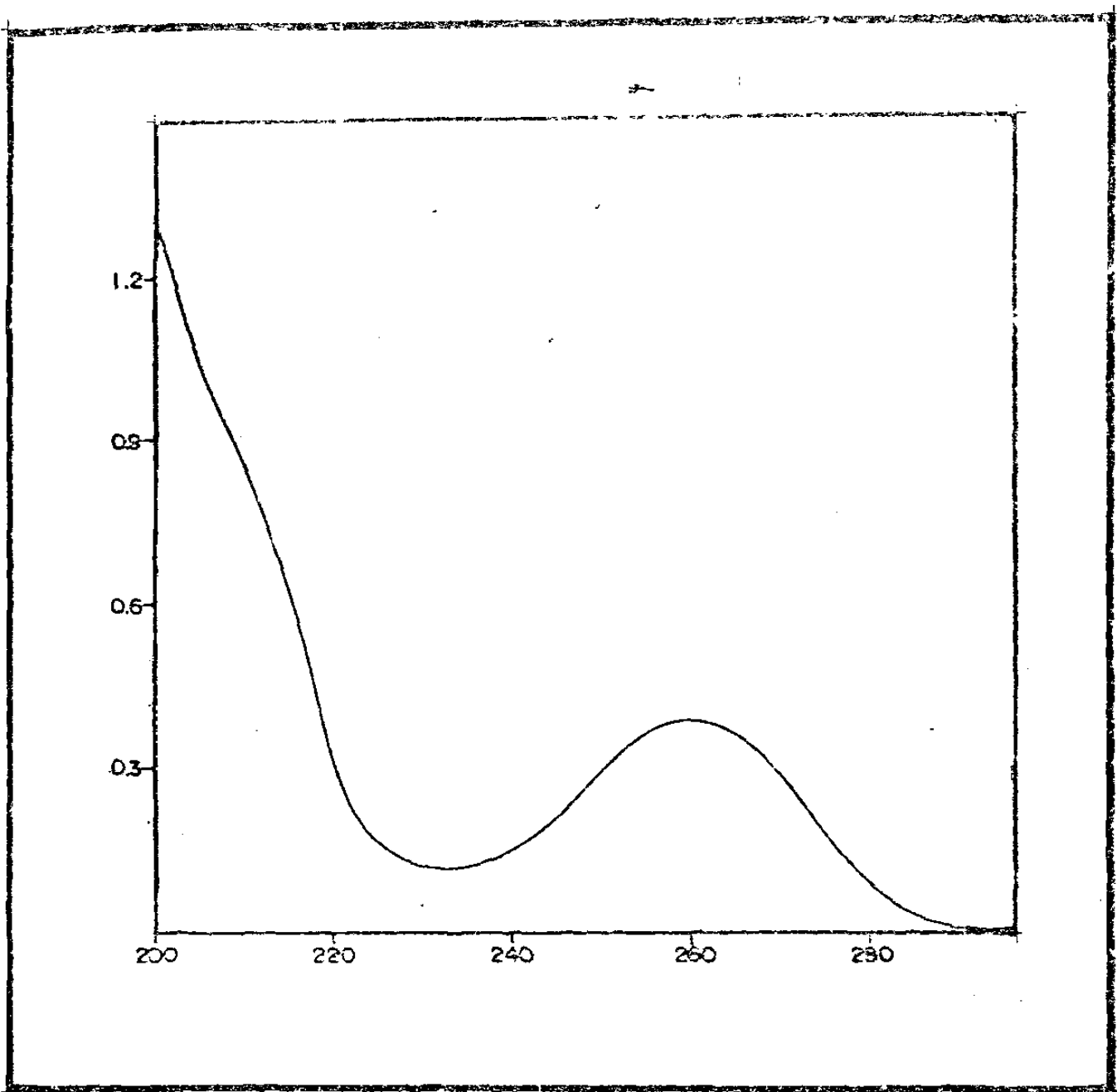


Fig. 7 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa HD-59 después del tratamiento de precipitación con etanol.

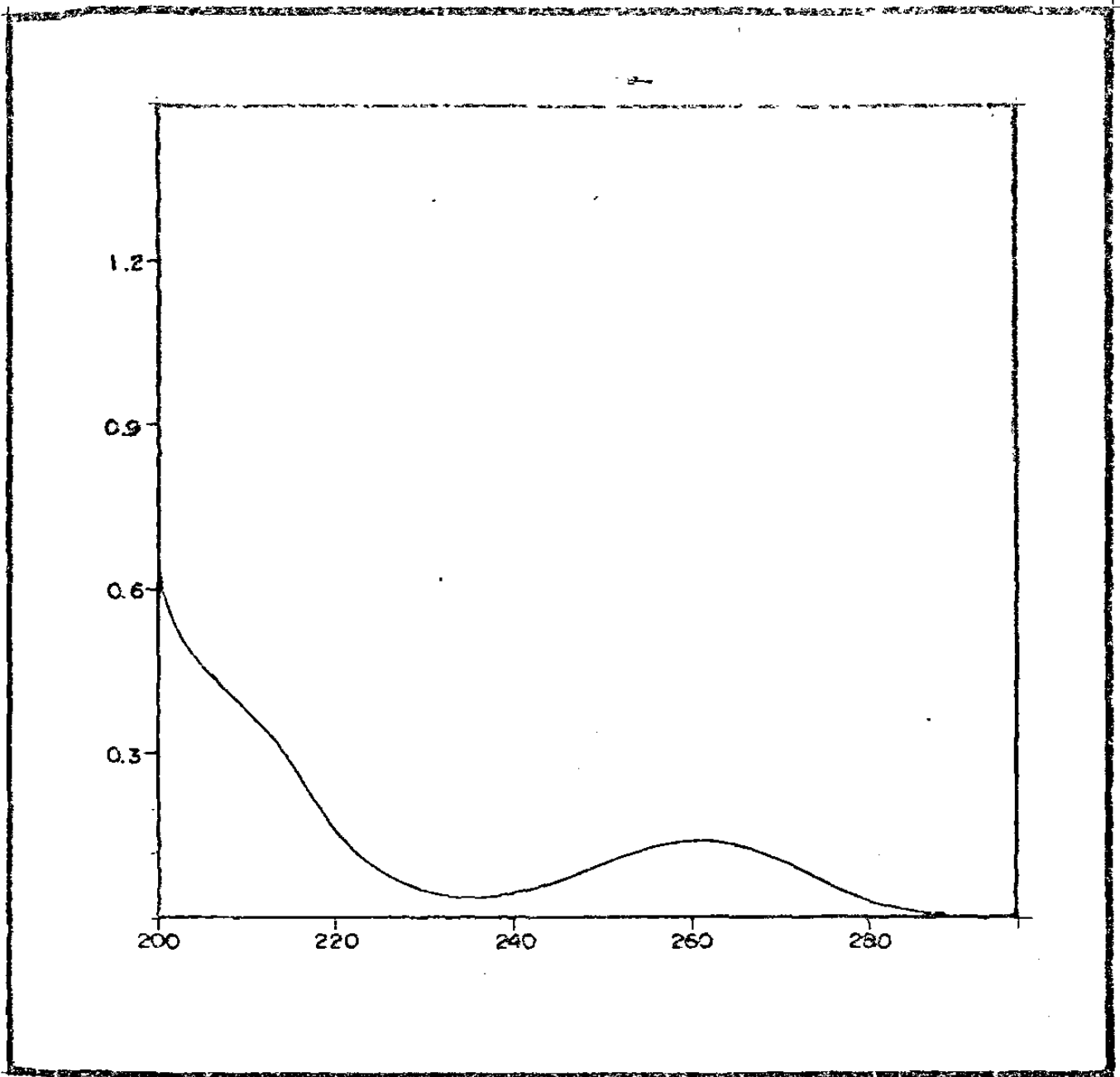


Fig. 8 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa HD-41 (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*), después del tratamiento de precipitación con etanol.

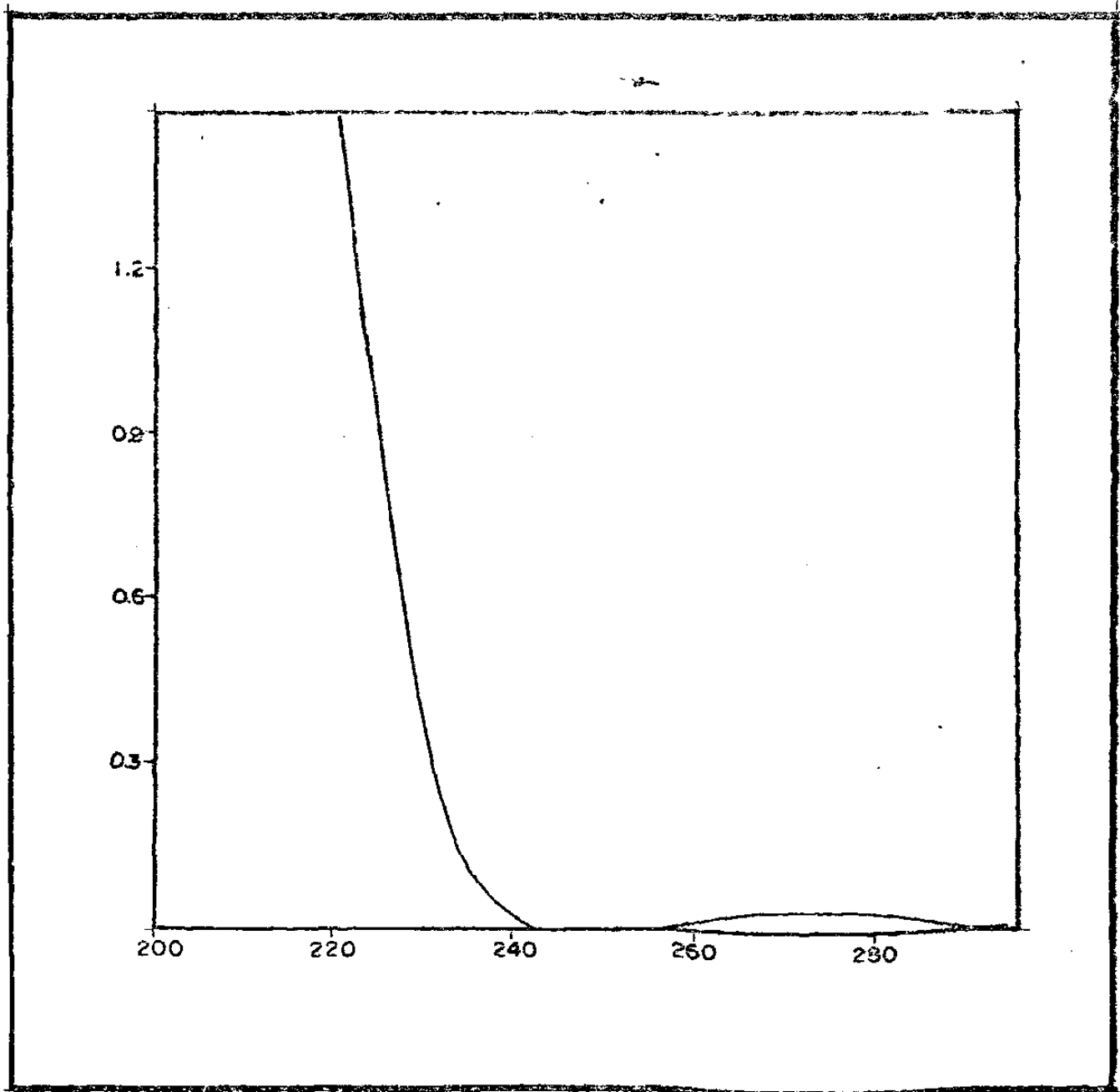


Fig. 9 Espectro de absorción ultravioleta del Medio de Cultivo Estéril (Blanco), después del tratamiento de precipitación con Etanol.

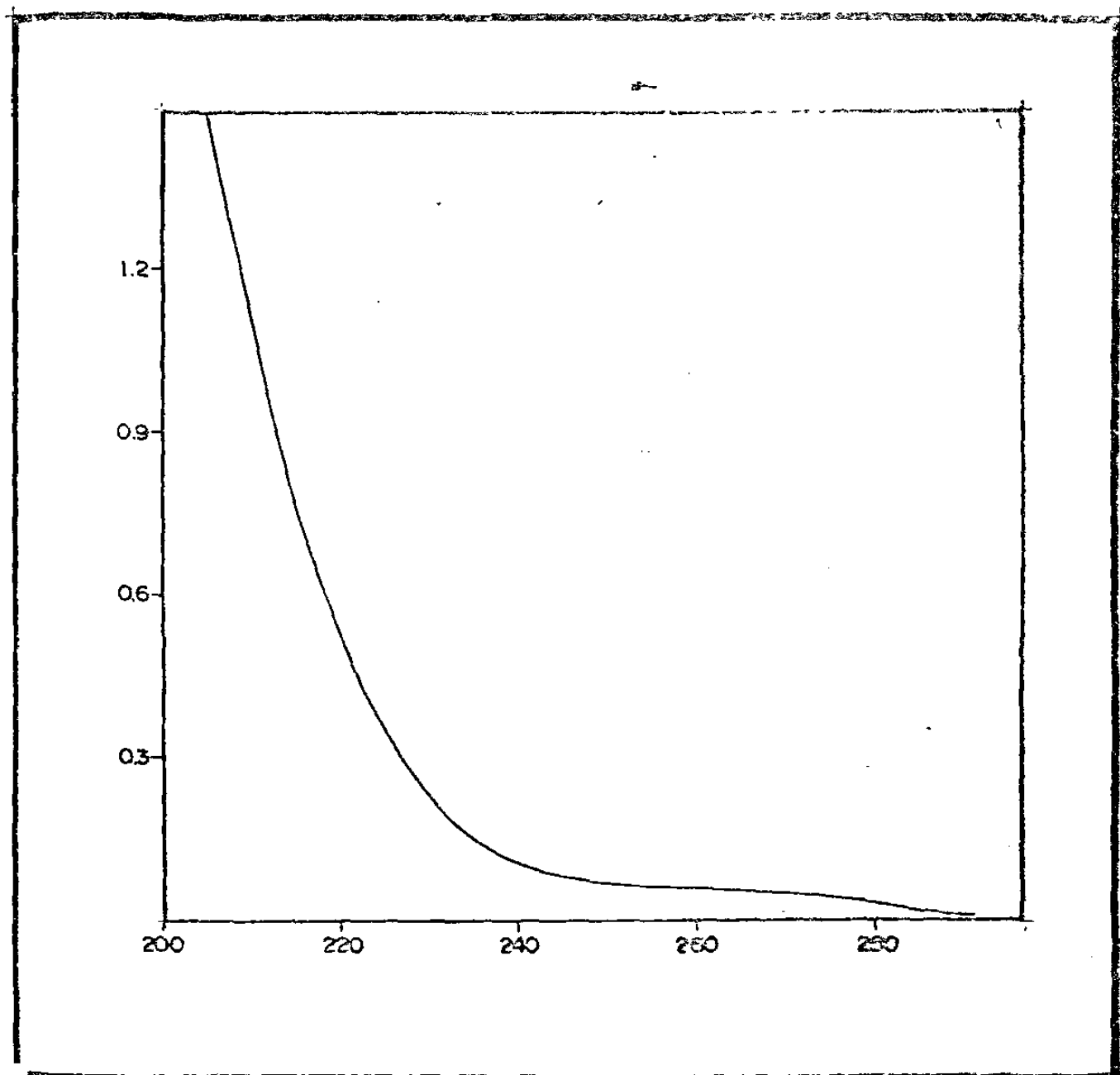


Fig. 10 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa HD-1, después del tratamiento de precipitación con etanol.

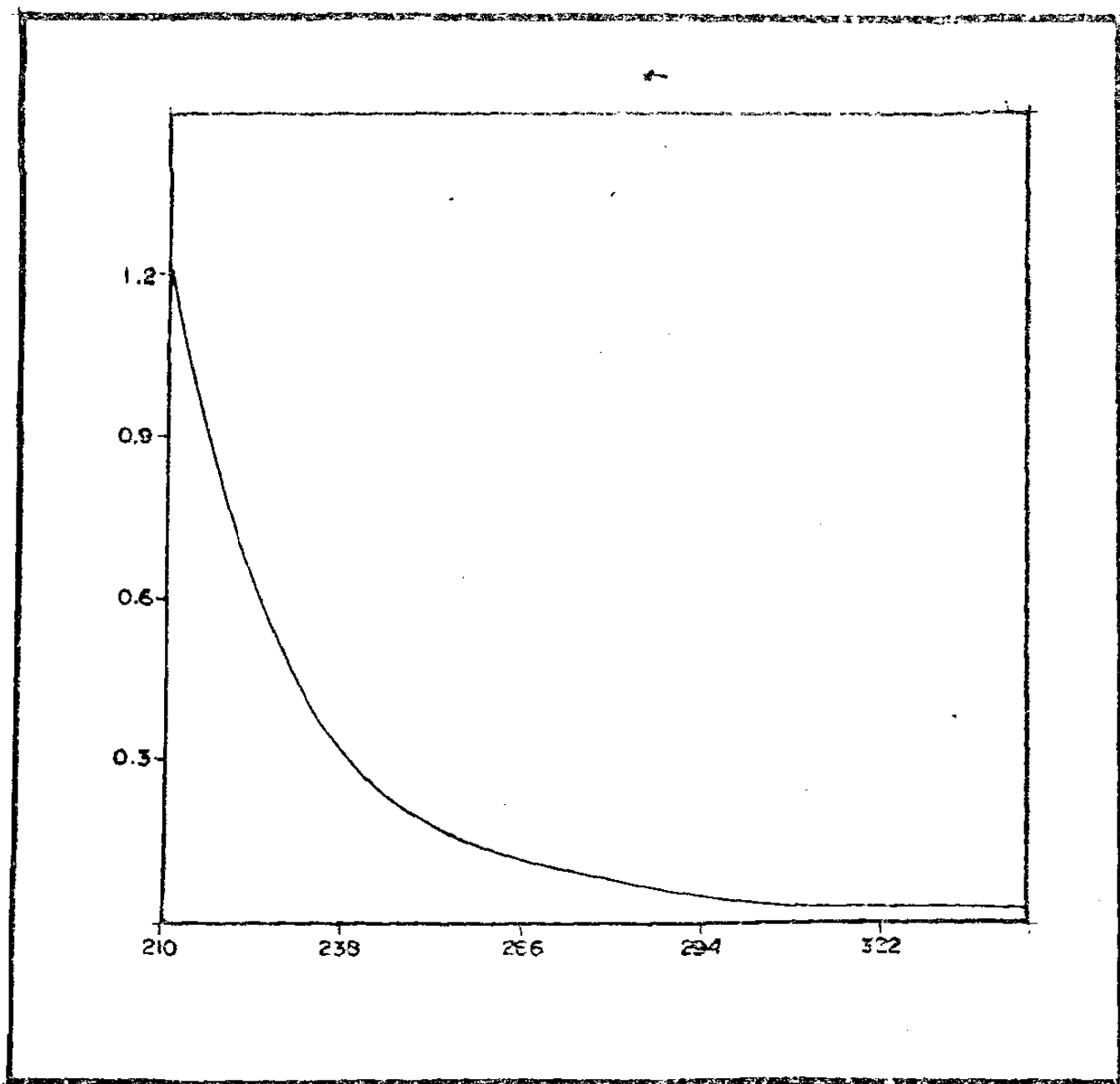


Fig. 11 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la Cepa GM-7, después del tratamiento de precipitación con Etanol.

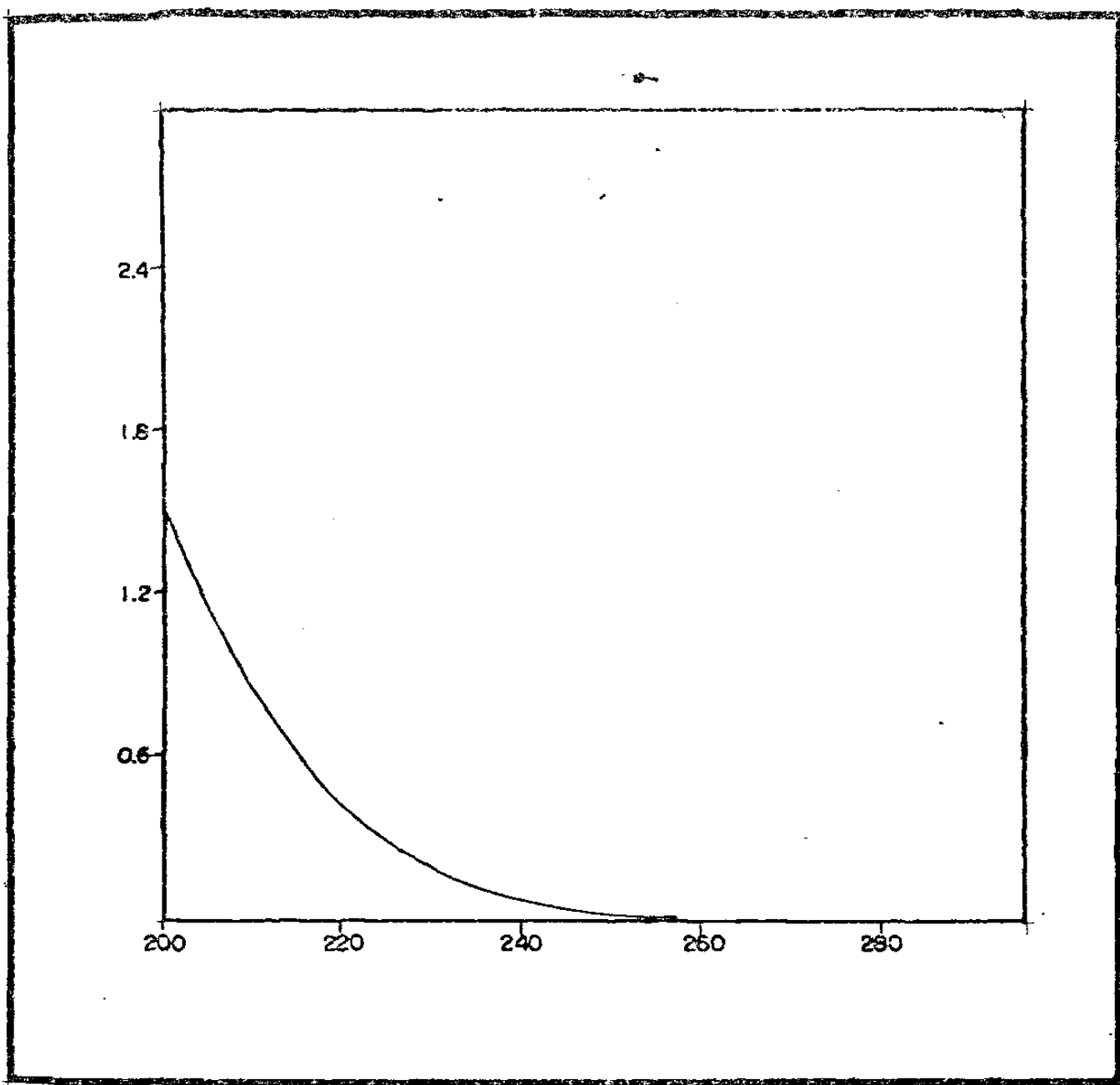


Fig. 12 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-10, después del tratamiento de precipitación con etanol.

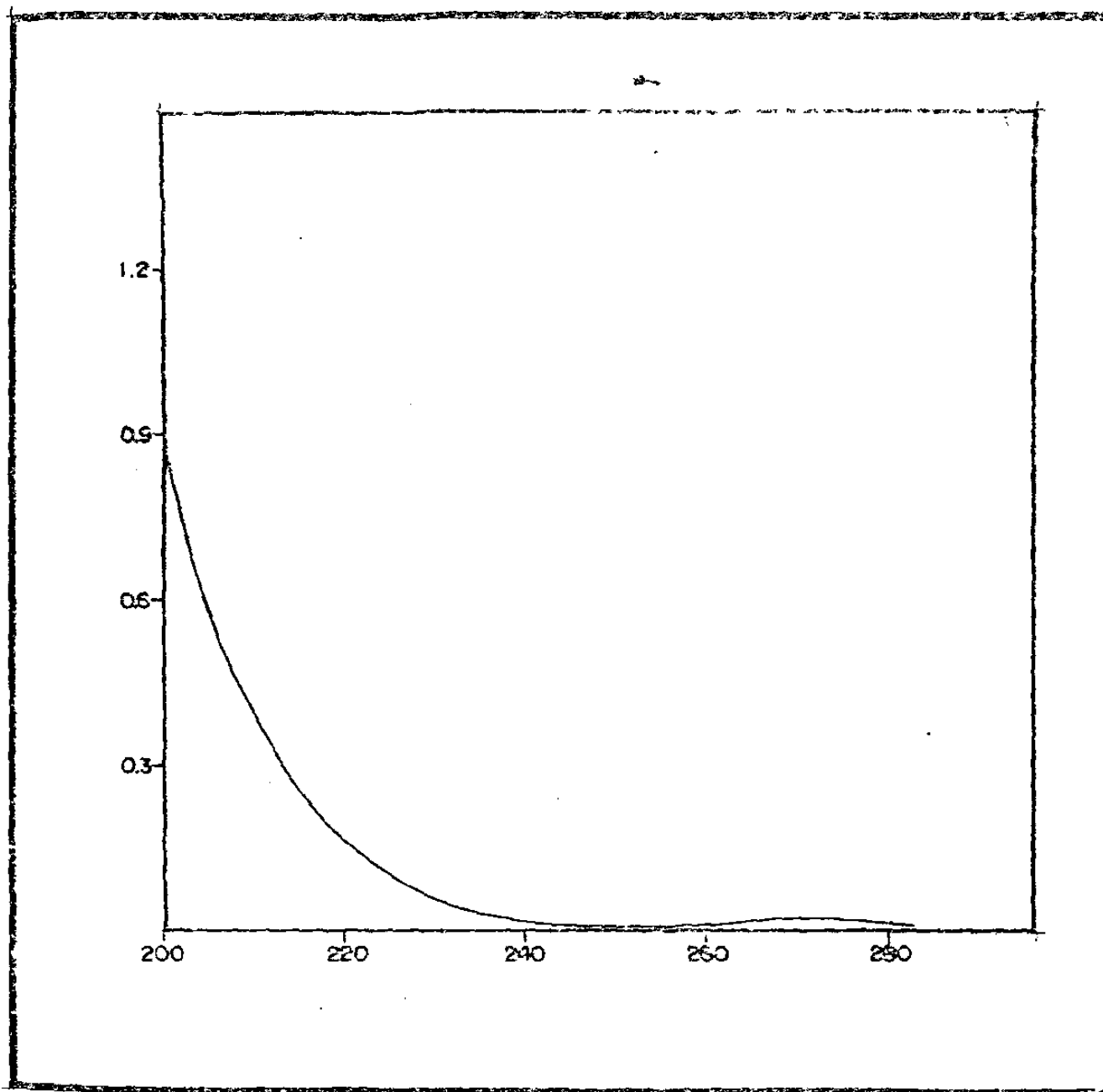


Fig. 13 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-18, después del tratamiento de precipitación con etanol.

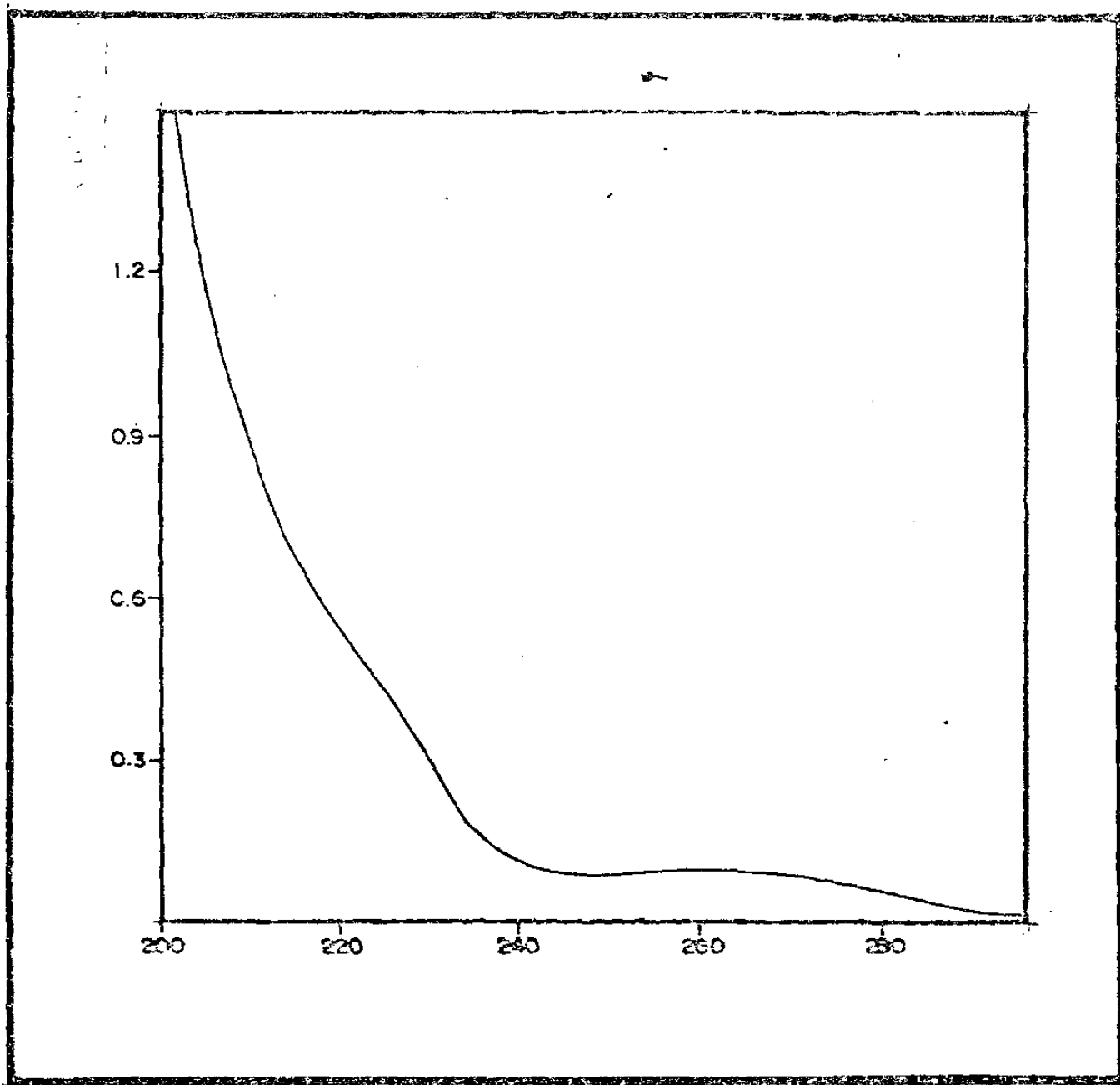


Fig. 14 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-23, después del tratamiento de precipitación con etanol.

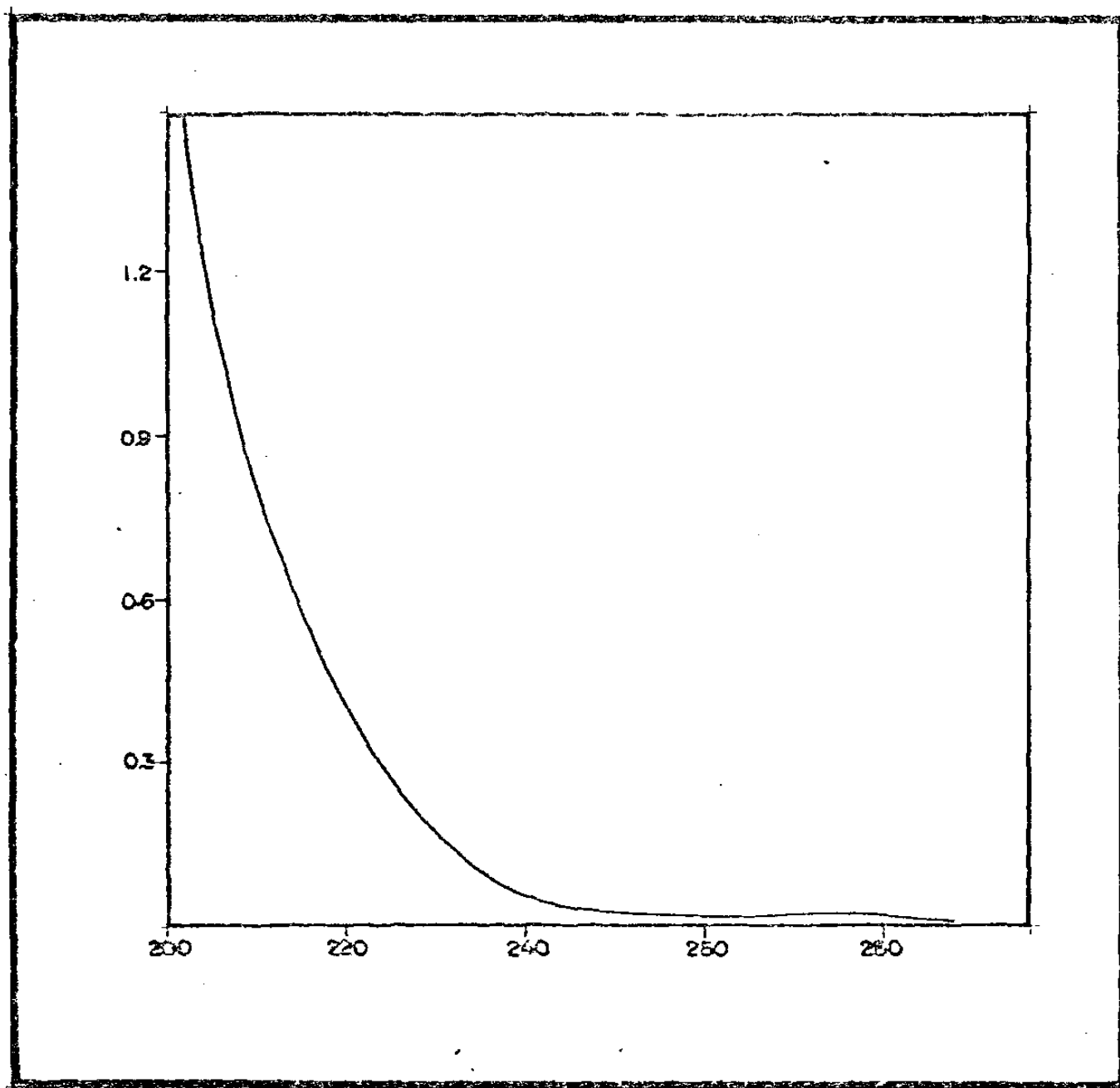


Fig.15 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la Cepa GM-34, después del tratamiento de precipitación con Etanol.

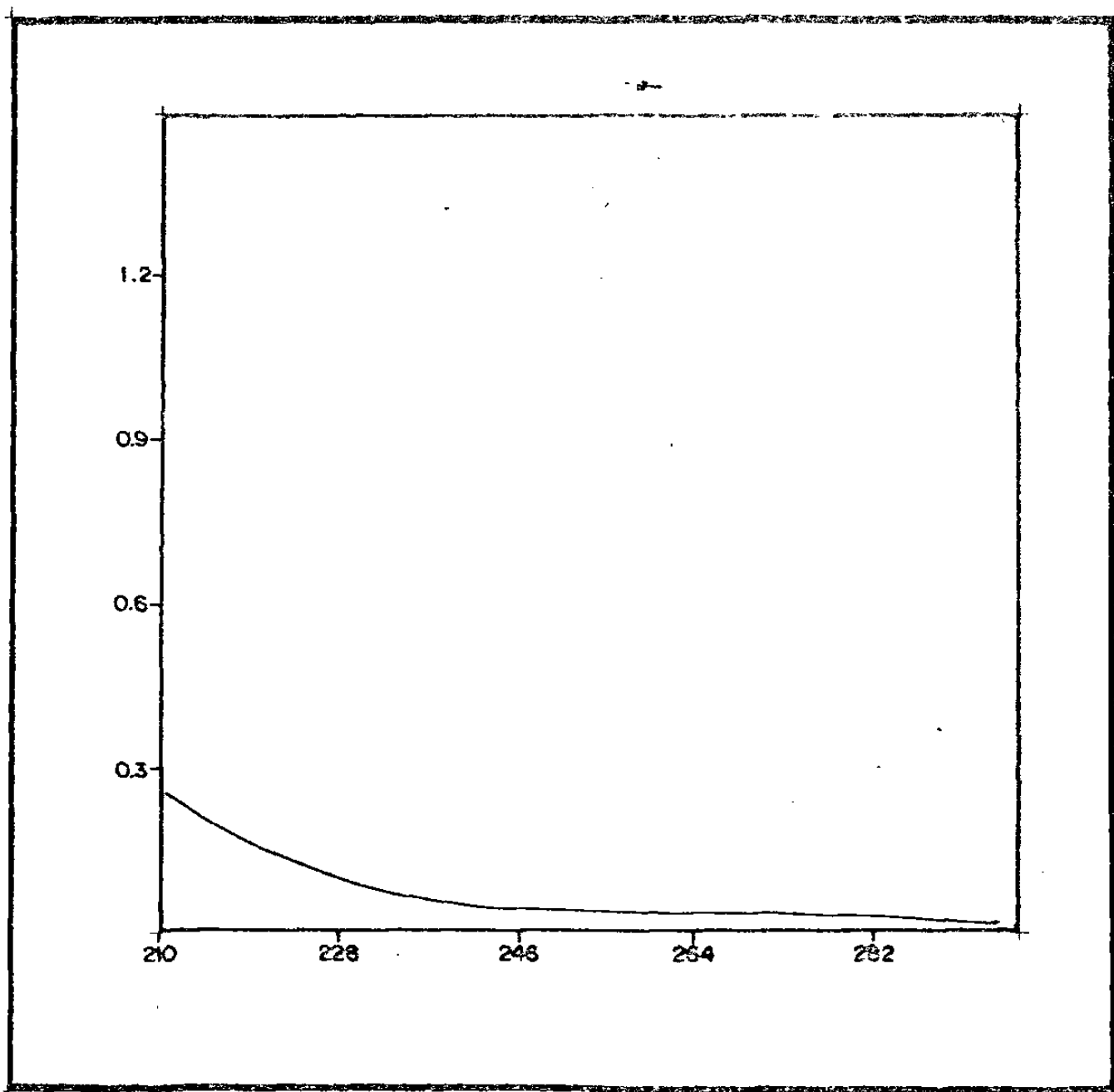


Fig. 16 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-38, después del tratamiento de precipitación con etanol.

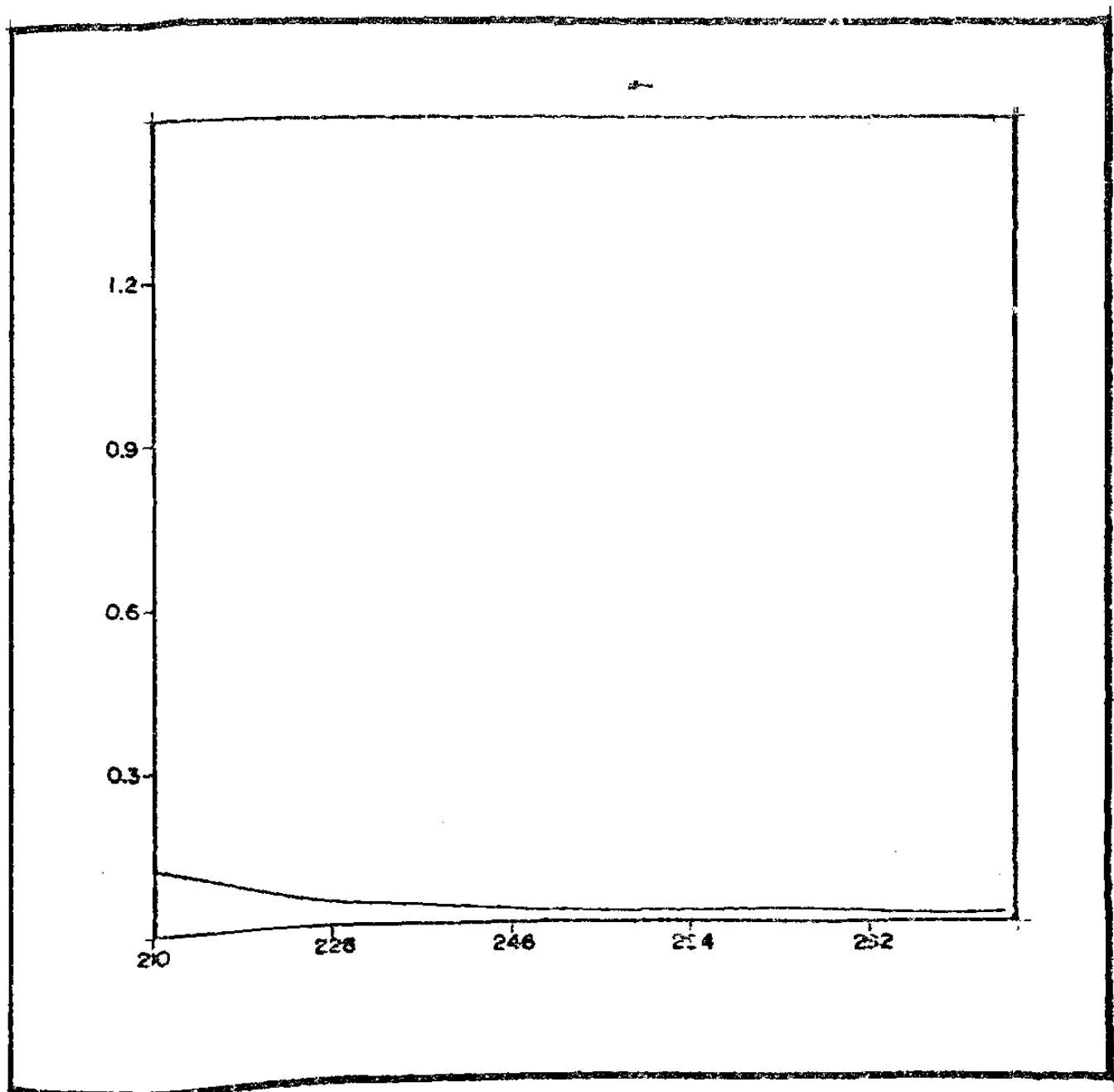


Fig. 17 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-40, después del tratamiento de precipitación con etanol.

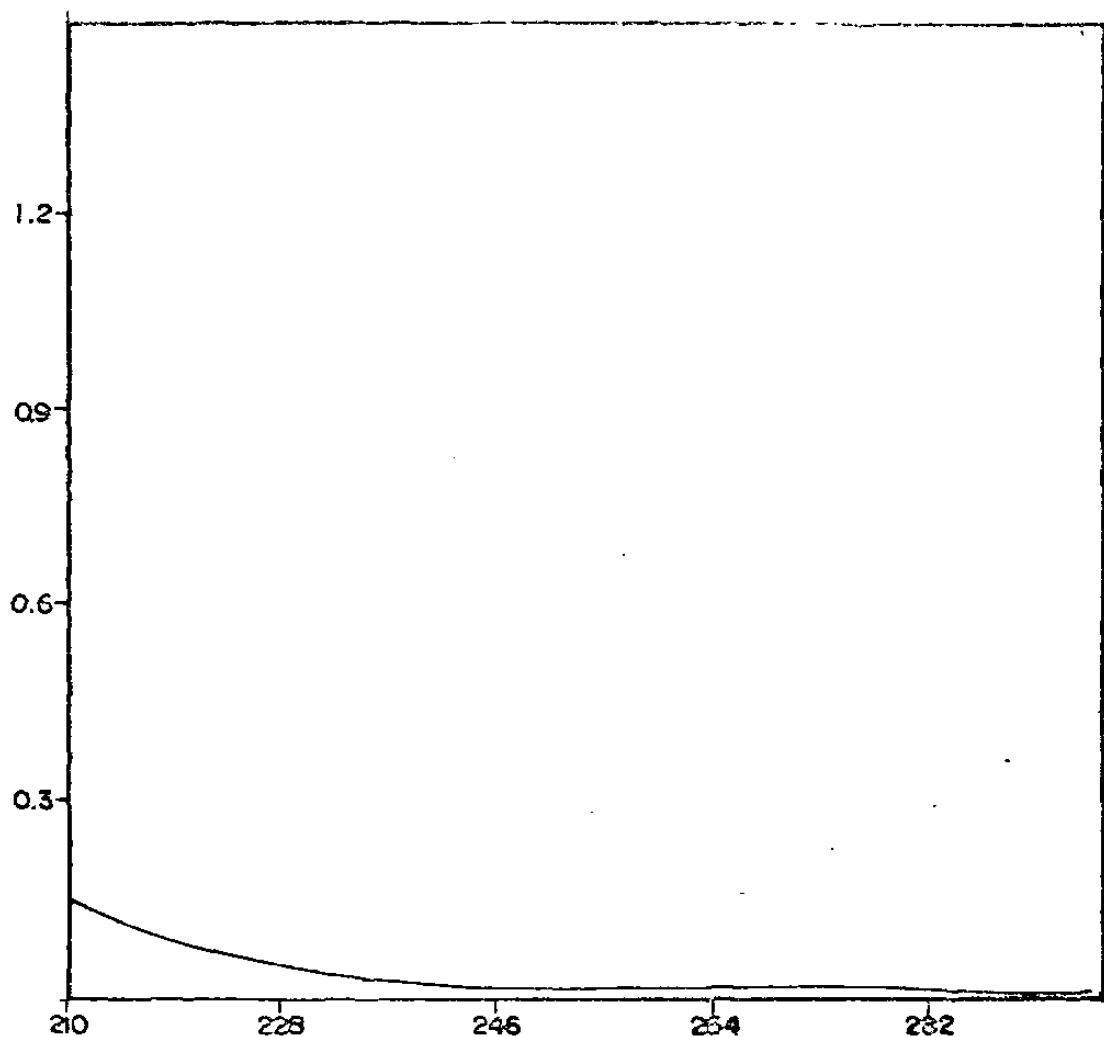


Fig.18 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-47, después del tratamiento de precipitación con etanol.

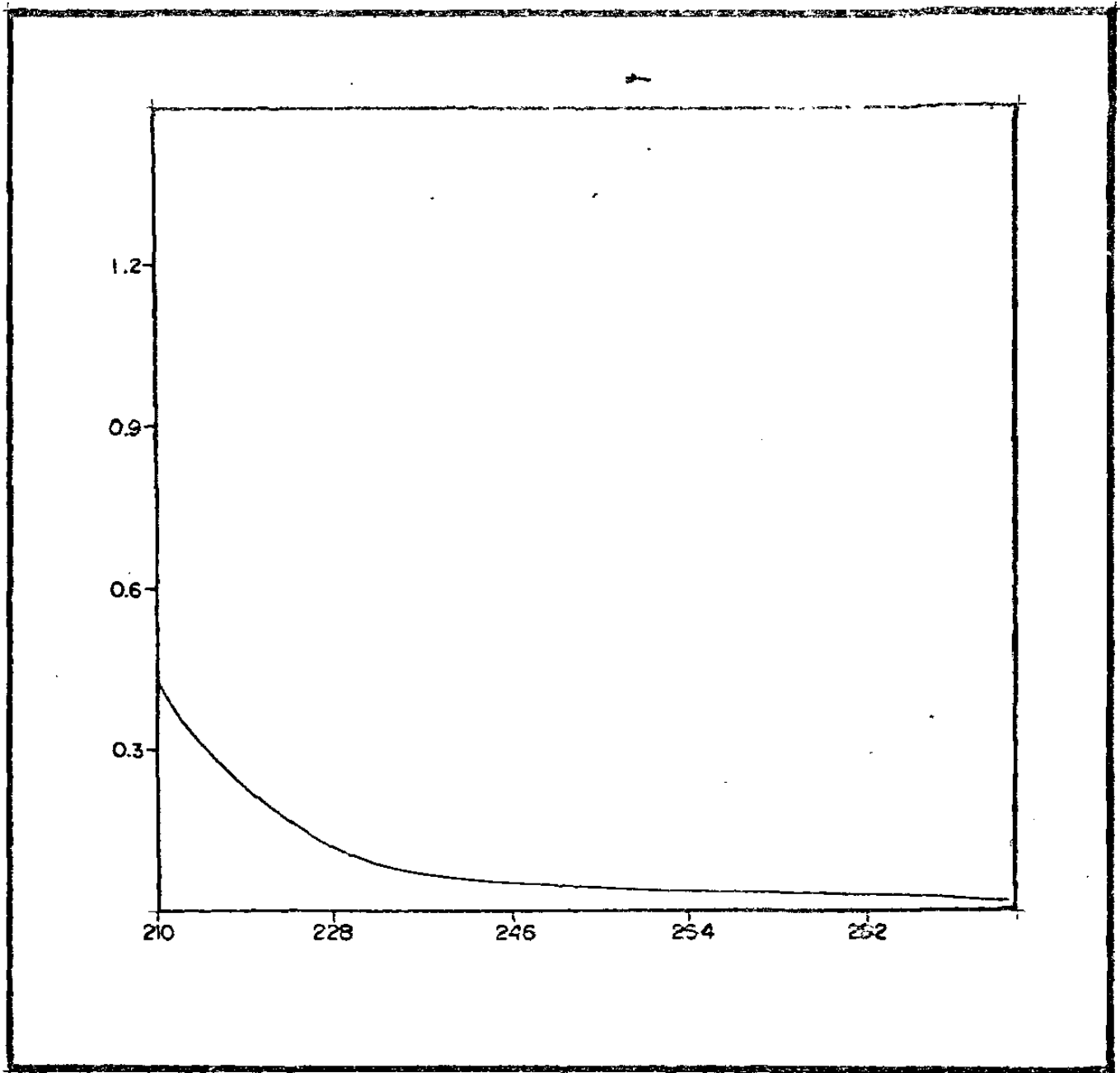


Fig. 19.- Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la cepa GM-48, después del tratamiento de precipitación con etanol.

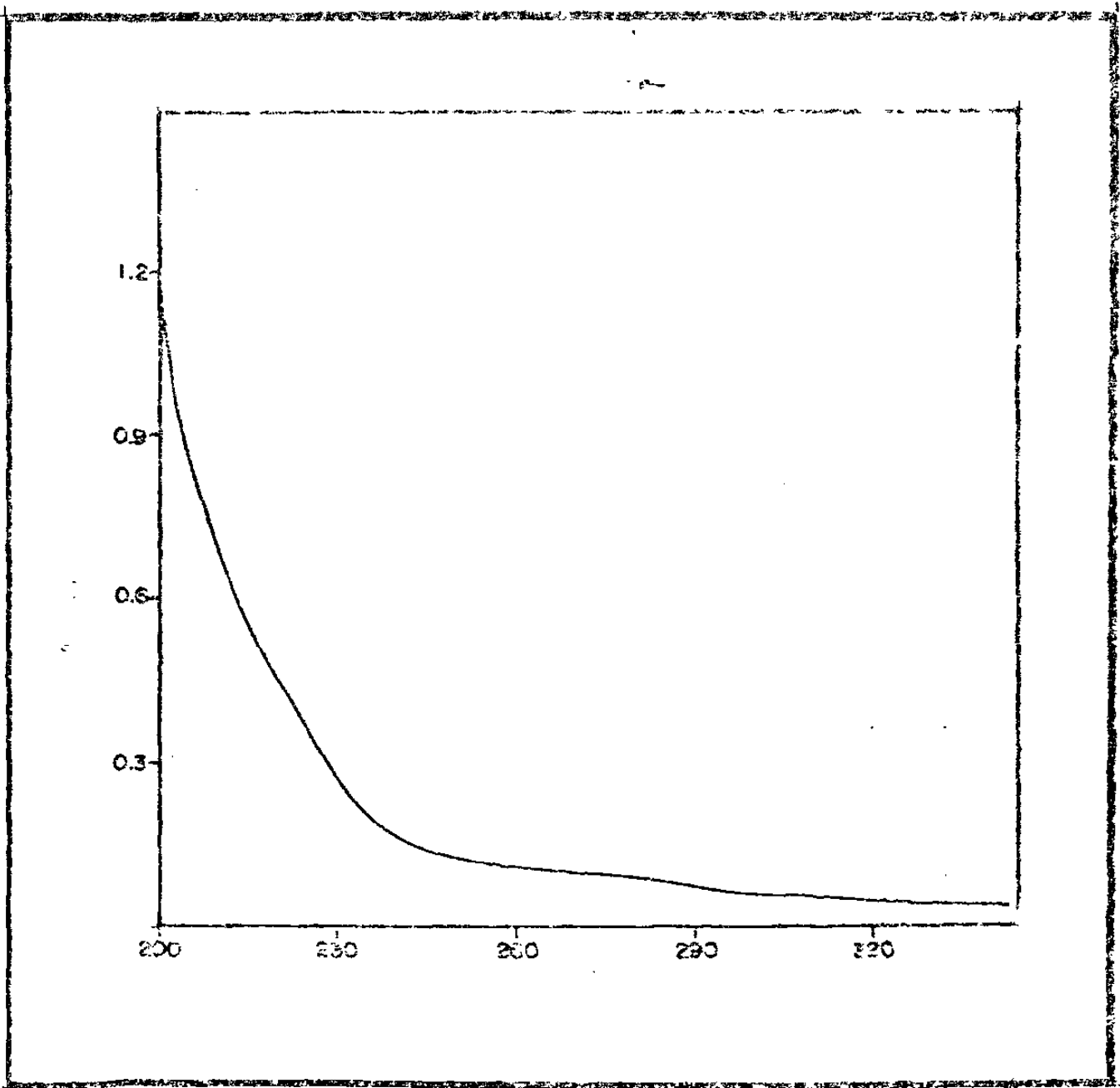


Fig. 20 Espectro de absorción ultravioleta del sobrenadante de la Cepa GM-78, después del tratamiento de precipitación con Etanol.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Abbot Laboratories. 1986. Di Beta, Miticide-Isecticide. Bol. Tec.
- 2.- Benz G. 1966. On the Chemical Nature of the Heat-Stable Exotoxin of Bacillus thuringiensis. Experientia. - 22: 81-82,
- 3.- Bond R.P.M., C.B.C. Boyce & S.J. French. 1969. A Purifi-
cation and Some Properties of an Insecticidal Exo-
toxin from Bacillus thuringiensis Berliner. Bio --
chem. J. 477-487.
- 4.- Briggs J.D. 1960. Reduction of Adult House fly emergen-
ce by the effects of Bacillus sp. on the develop-
ment of immature forms. J. Insect. Pathol. 2: 418-
432.
- 5.- Bubenschikova S.N., V.K. Kagramanova & L.A. Baratova. -
1983. Determination of Heat-Stable Exotoxin of --
Bacillus thuringiensis by High-Performance Anion -
Exchange Chromatography. J. Invertebr. Pathol. 42:
344-347.
- 6.- Burges H.D. 1975. Teratogenicity of the thermostable --
beta exotoxin of Bacillus thuringiensis in -
Galleria mellonella. J. Invertebr. Pathol 26: 419-
420.
- 7.- Burgerjon A. & H. De Barjac. 1967. Another Serotype ---
(4:4a,4c) of Bacillus thuringiensis. Wich Produces
Thermostable Toxin. J. Invertebr. Pathol 9:(4) --
574-577.
- 8.- Campbell P.D., D.E. Dieball & J.M. Brackett. 1987. Ra--

pid Assay for the beta exotoxin of - - - - -
Bacillus thuringiensis. J. of Agricult. and Food
 Chemistry. 35(1): 156-158.

- 9.- Cantwell E.G. 1982. Activity of a Thermostable Exoto--
 xin of Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni in
 the Salmonella/Microsomal Assay for the Bacterial
 Mutagenicity. J. Invertebr. Pathol 40: 350-358.
- 10.- Cantwell E.G., A.M. Heimpell & M.J. Thompson. 1964. --
 The Production of an Exotoxin by various Crystal
 Forming Bacteria Related to Bacillus thuringiensis
 var. thuringiensis Berliner. J. Invertebr. Pathol.
6: 466-480.
- 11.- Cantwell E.G., E.Dougherty & W.W. Cantelo. 1983. Activi
 ty of the beta exotoxin of Bacillus thuringiensis
 var. thuringiensis against the Colorado Potato --
 Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) an Bacterial --
 Mutagenic Response as Determined by the Ames Test.
 Environm. Entomol. 12(5): 1424-1427.
- 9
- 12.- Carlberg G. 1973. Biological Effects of the thermosta--
 ble beta exotoxin Produced by Different Serotypes
 of Bacillus thuringiensis. Academic Disertation --
 for Public Criticism, Univ. of Helsinki.
- 13.- Dash S.K., P.M. Achary & C.B.S.R. Sharma. 1978. Metapha
 se arrest in the bone marrow cells of - - - - -
Rattus norvergicus by the beta exotoxin of - - - - -
Bacillus thuringiensis Acta Biol. Acad. Sci. Hug.
29(2): 189-191.
- 14.- Dunn P.H. 1960. Control of House flies in bovine feces
 by a feed additive containing - - - - -
Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berli --

- ner. J. Insect. Pathol. 2: 13-16.
- 15.- De Barjac H., A. Burgerjon & A. Bonnefoi. 1966. The Production of Heat-Stable Toxin by Nine Serotypes of Bacillus thuringiensis (notes). J. Invertebr. Pathol. 8(4); 536-538.
- 16.- De Barjac H. & J. Y. Riou. 1969. Action de la toxine -- thermostable de Bacillus thuringiensis var. -- thuringiensis administré a'des souris. R. de Pathol. Comparé. T 6-6 805: 368-374.
- 17.- De Barjac H. & M. M. Lecadet. 1976. Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de - - - - - Bacillus thuringiensis d'apres l'inhibition d'ARN polymerases bacteriennes (Note). C.R. Acad. Sc. -- Paris. 260: 7050-7053.
- 18.- De Barjac H. & M. R. Dedonder. 1965. Isolement d'un nucléotide identifiable a'la "toxine thermostable" -- de Bacillus thuringiensis var. Berliner (Note). C. R. Acad. Sc. Paris. 260: 7050-7053.
- 19.- De Barjac H. & R. Dedonder. 1968. Purification de la -- toxine thermostable de Bacillus thuringiensis var. thuringiensis et analyses complémentaires. Bulletin de la Societé de Chimie Biologique. 50(4): 941-944.
- 20.- De Barjac H. & V. C. Dumanoir. 1974. Comparaison entre les exotoxines thermostables de différents sérotypes de Bacillus thuringiensis (Note). C. R. Acad. Sc. Paris. 278: 2843-2845.
- 21.- Farkas J., K. Sebesta, K. Horská, Z. Samek & F. Sorm. -- 1976. Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from Bacillus thuringiensis. Collection -- Czechoslov. Chem. Commun. 42: 909.

- 22.- Faust Robert M., A. Lee Jr. Bulla. 1982. Bacterial and their toxins as Insecticides Microbial and Viral - Pesticides. Ed. Eduard Kurstaki. 3: 75-206.
- 23.- Hall M. I., D. K. Hunter & K. Y. Arakawa. 1971. The Effect of the beta exotoxin fraction of - - - - - Bacillus thuringiensis on the Citrus Red Mite. J. Invertebr. Pathol. 18: 359-362.
- 24.- Herbert D. Ames & J. D. Harper. 1985. Bioenssay of a -- beta exotoxin of Bacillus thuringiensis against: -- Heliothis zea larvae. 46: 247-250.
- 25.- Holmberg A. & R. Sievanen. 1980. Fermentation of - - - Bacillus thuringiensis for Exotoxin Production : Analysis Study. Biotechnology and Bioengineering. 22 : 1707-1724.
- 26.- Ignoffo C. M. & B. Gregory. 1972. Effects of - - - - - Bacillus thuringiensis beta exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity and egg viability in several species of Lepidoptera. Entomological Society of America. 1(3): 269-272.
- 27.- Ignoffo C. M. & R. F. Anderson. 1979. Bioinsecticides.- Microbial Technology. 2nd. ed. Vol. 1 Chapter 1. -- 1-27.
- 28.- Johnson E. Donovan & R. E. Peterson. 1983. Limitations of HPLC for the detection of beta exotoxin in Culture Filtrates of Bacillus thuringiensis Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol. 17: 231-234.
- 29.- Johnson E. Donovan. 1978. Inhibition of RNA polymerase from Bacillus thuringiensis and Escherichia coli by beta exotoxin. Can. J. Microbiology. 24: 537-543.

- 30.- Kahkonen M., U. Gripenberg, G. Carlberg & M. Sorsa. --
1979. Mutagenicity of Bacillus thuringiensis exotoxin III. Sister chromatid exchange in rats in vivo. Hereditas. 91: 1-3.
- 31.- Kalvadova L., M. Prystas & F. Sorm. 1973. Synthesis of exotoxin produced by Bacillus thuringiensis. Tetrahedron Letters. 47: 4671-4674.
- 32.- Khachatourians G. George. 1986. Production and use of -
Biological Pest Control Agents. Tibtech.
- 33.- Larget-Thiery I., S. Hamon & H De Barjac. 1984. Sensi-
bilité des Culicidae a la beta exotoxine de - - - -
Bacillus thuringiensis. Entomophaga. 29(1): 95-108.
- 34.- Lecadet Marguerite M. & H. De Barjac. 19 . - - - - -
Bacillus thuringiensis beta exotoxin. Pathogenesis
of Invertebrate Microbial Diseases. Davidson Ed. --
Chapter 11.
- 35.- Linnainmaa K., Marja Sorsa, G. Carlberg, U. Gripenberg
& T. Meretoja. 1977. Mutagenicity of - - - - -
Bacillus thuringiensis exotoxin. Hereditas. 85: --
113-122.
- 36.- Marec F., V. Matha & J. Weiser. 1989. Analysis of Geno-
toxic Activity of Bacillus thuringiensis beta exo-
toxin by means of the Drosophila wing spot test. J.
Invertebr. Pathol. 53: 347-355.
- 37.- Metcalf C. L., W. D. Flint. 1976. Insectos Destructivos
e Insectos Beneficos. C.E.C.S.A. 8^a Impresión. 1071
-1176.
- 38.- Mohd-Salleh M. B. & C. C. Beegle. 1980. Fermentation --
Media and Production of Exotoxin by three varieties

- of Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 35: 75-83.
- 39.- Mohd-Salleh M. B. & L. C. Lewis. 1981. Feeding dete---
rrent response of Corn Insects to beta exotoxin of
Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 39:-
323-328.
- 40.- Oehler D. Delbert, R. E. Gringrich & M. Haufler. 1982.
High-Performance-Liquid-Chromatographic Determina-
tion of beta exotoxin produced by - - - - -
Bacillus thuringiensis. J. Agric. Food Chem. 30 --
(2): 407-408.
- 41.- Ohba M. A. T. & K. Aizawa. 1981. Production of Heat-Sta-
ble Exotoxin by Bacillus thuringiensis and related
bacteria. J. Invertebr. Pathol. 38: 26-32.
- 42.- Panda B. B., R. K. Sahu & C.B.S.R. Sharma. 1979. Selec-
tive Clastogenesis and Spindle inhibitiion in some
plant mitotic systems by the exotoxin and the ine-
ffectiveness of the delta endotoxin protein of - --
Bacillus thuringiensis . Mutation Research. 67: --
161-166.
- 43.- Sebesta K., J. Farkas, K. Horská & J. Vanková. 19 . -
Thuringiensin, the Beta exotoxin of - - - - -
Bacillus thuringiensis. Chapter 13.
- 44.- Sebesta K. & K. Horská. 1967. Isolation, Purification -
and Toxicity of a thermostable exotoxin from the -
strain of Bacillus geleachie. Auct. Collection Cze
choslov. Chem. Commun. 34: 891-900.
- 45.- Sebesta K. & K. Horská . 1968. Inhibition of DNA-depen-
dent RNA polymerase by the exotoxin of - - - - -
Bacillus thuringiensis var. geleachie (Note). Bio-

chem. Biophys. 169: 281-282.

- 46.- Sebesta K., K. Horská & J. Vanková. 1969. Isolation and Properties of the Insecticidal Exotoxin of - - - - Bacillus thuringiensis var. geleachie. Auct. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 34(1): 89-93.
- 47.- Sebesta K., K. Horská & J. Vanková. 1972. Estimation of exotoxin production by different strains of - - - - Bacillus thuringiensis using ³²P-labelled exotoxin. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 38: 298-303.
- 48.- Sebesta K. & K. Horská. 1973. The fate of exotoxin -- Bacillus thuringiensis in mice. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 38: 2533-2537.
- 49.- Sharma C.B.S.R., S. Panigrahi & R. K. Sahu. 1977. Mitodepressive Activity of two Bacterial Toxins in the root mesistems of Allium cepa. Z. Pflanzen. physiol. Bd. 84: 163-166.
- 50.- Sharma C.B.S.R., R. K. Sahu & S. Panigrahi. 1978. Inhibition of Cytokinesis by a Bacterial Toxin, Thuringiensin. A. Caryologia. 31(1): 89-93.
- 51.- Stewarth G. G. & I. Rusell. 1987. Critical Reviews in - Biotechnology. 6(1).C. R.S. Press.
- 52.- Vanková J., K. Horská & K. Sebesta. 1974. The fate of - Bacillus thuringiensis in Galleria mellonella caterpillars. J. Invertebr. Pathol. 23: 209-212.
- 53.- Wasti S., C.R. Mahadeo & J. D. Knell. 1973. Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis Berliner against two species of flies. Z. ang. Ent. 74: 157-160.
- 54.- Wolfenbarger Dan A., A. Guerra, H. T. Dulmage & R. D. -

García. 1972. Properties of the beta exotoxin of --
Baccillus thuringiensis IMC 10 001, against the To-
bacco Budworm. J. of Economic Entomology. 65(5): --
1245-1248.

55.- Young T. K. & H. T. Huang. 1970. The beta exotoxin of
Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 15: -
100-108.

