

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



**SELECCION DE CEPAS NATIVAS Y DE EXTRACTOS DE
FERMENTACION DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA
Trichoplusia ni (Hübner) *Heliothis virescens* (Fabricius)
(Lepidóptera: Noctuidae)**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

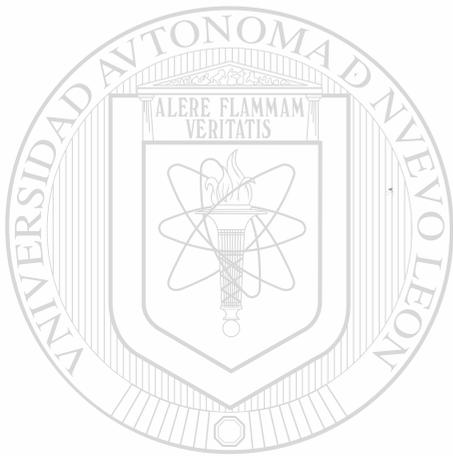
POR

M.C. LUIS JESUS GALAN WONG

MONTERREY, N.L., MEXICO.

MARZO DE 1993

TD
Z5320
FCB
1993
G3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



**SELECCION DE CEPAS NATIVAS Y DE EXTRACTOS DE
FERMENTACION DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA
Trichoplusia ni (Hübner) Y *Heliothis virescens* (Fabricius)
(Lepidóptera: Noctuidae)**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

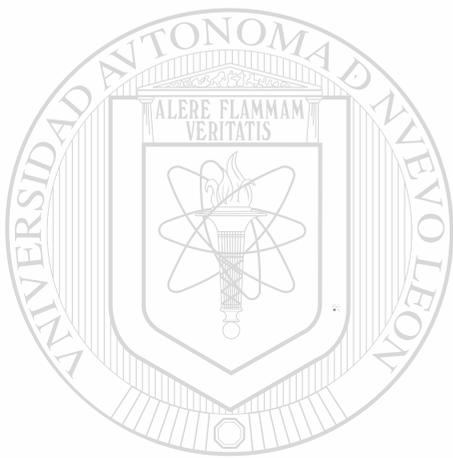
POR

M.C. LUIS JESUS GALAN WONG

MONTERREY, N.L., MEXICO.

ABRIL DE 1993

TD
Z5320
FCB
1993
G3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO TESIS

32613

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SELECCION DE CEPAS NATIVAS Y DE EXTRACTOS
DE FERMENTACION DE *Bacillus thuringiensis*
CONTRA *Trichoplusia ni* Y *Heliothis virescens* FAB**

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

POR

M.C. LUIS JESUS GALAN WONG

**APROBADA:
COMISION DE TESIS**


DR. RODOLFO QUINTERO RAMIREZ
Director (Externo)
Presidente


DRA. LAURA MARIA TREJO AVILA
Co-Director
Secretario


DR. REYES SILVESTRE TAMEZ GUERRA
Asesor
Vocal

INDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
I <i>Bacillus thuringiensis.</i>	5
1.- Control biológico.	5
2.- Desarrollo.	5
3.- Tipo de toxinas.	7
4.- Mecanismo de acción de la δ -endotoxina	10
5.- Resistencia.	11
6.- Persistencia.	13
7.- Ventajas y desventajas del uso de <i>B. thuringiensis</i> en control biológico.	14
8.- Insectos blancos.	16
9.- Productos tradicionales y de nueva generación.	19
II Mercado de productos con <i>B. thuringiensis.</i>	23
1.- Mercado mundial.	23
2.- Productos comerciales disponibles y compañías productoras.	26
3.- Dosis de aplicación contra plagas agrícolas, forestales, mosquitos y moscas negras.	26
4.- Requisitos básicos para investigación y desarrollo de bioinsecticidas.	29

III	Biotecnología.	29
1.-	Aplicación genética a <i>B. thuringiensis</i> .	29
2.-	Medios de fermentación.	31
3.-	Parámetros de fermentación y condiciones de crecimiento.	37
4.-	Escalamiento de un proceso de fermentación para <i>B. thuringiensis</i> .	40
5.-	Recuperación del bioinsecticida.	42
6.-	Bioensayos y estandarización.	43
IV	Bioseguridad y ecología de <i>B. thuringiensis</i>.	45
1.-	Normas establecidas en México.	45
2.-	Distribución y frecuencia de <i>B. thuringiensis</i> .	45
3.-	Control de calidad y registro.	47
4.-	Bioseguridad y ecología.	47

MATERIAL Y METODOS 53

I	Aislamiento, registro, conservación e identificación de cepas de <i>B. thuringiensis</i>.	53
II	Estrategias de selección de cepas HD de los datos de archivo y de extractos de fermentación almacenados. Así como de las cepas nativas recuperadas en México.	53
III	Experimentos a nivel de matraz y fermentadores con las cepas nativas claves GM.	56
IV	Escalamiento del proceso en fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.	64

RESULTADOS 67

I	Cepas y serotipos de <i>B. thuringiensis</i> evaluados y seleccionados.	67
1.-	De los datos de archivo de resultados de fermentación analizados.	67
2.-	Serovariedades de las cepas HD evaluadas contra <i>T. ni</i> y <i>H. virescens</i> para su selección de los extractos de fermentación almacenados por diferentes períodos de tiempo.	68
3.-	Cepas nativas recuperadas en México de <i>B. thuringiensis</i> .	68

II	Bloensayos de las cepas de <i>B. thuringiensis</i>.	68
1.-	De los datos de archivo analizados.	68
2.-	De los extractos de fermentación almacenados de las cepas HD que presentan las mejores toxicidades.	71
3.-	Toxicidad de las mejores cepas nativas GM.	72
4.-	Comparación de la actividad tóxica del extracto almacenado clave 3053 (año - 1980) y el producido recientemente.	73
5.-	Comparación de la actividad tóxica del cultivo total y del extracto de fermentación.	73
III	Producción de <i>B. thuringiensis</i> en fermentadores de 14 l de capacidad.	73
1.-	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	73
2.-	Azúcares reductores iniciales y finales del proceso.	77
3.-	Resultados de la toxicidad, producción, Unidades Formadoras de Colonias de esporas en los extractos y coeficiente de rendimiento.	78
4.-	Cinética del consumo de oxígeno disuelto.	82
5.-	Efecto de la aereación y agitación sobre la producción de <i>B. thuringiensis</i> cepas GM-7 y GM-10.	84
IV	Escalamiento a nivel de fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.	87
1.-	Característica de los fermentadores y condiciones de crecimiento.	87
2.-	Resultados más importantes que se obtuvieron durante el escalamiento para <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-7 en fermentadores de 500 l y GM-10 en fermentadores de 130 l de capacidad total.	89
3.-	Producción y toxicidad.	90
	DISCUSION Y CONCLUSIONES	91
	RECOMENDACIONES	99
	LITERATURA CITADA	101

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Area transversal (m ²)	Q	Velocidad de flujo
BM	Biomasa	r.p.m.	Revoluciones por minuto
B.	<i>Bacillus</i>	S _E	Superficie específica (m)
C _l	Concentración de oxígeno en el medio de cultivo (mg/l)	sp.	Especie
C	Concentración de oxígeno en equilibrio (mg/l)	subsp.	Subespecie
col.	Colaboradores	<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
D	Diámetro del fermentador (m,cm)	UFC	Unidad (es) Formadora (s) de Colonia (s)
DL ₅₀	Dosis Letal Media (g/ml)	UI	Unidades Internacionales (por mg)
g/l	Gramo (s) por litro (s)	var.	Variedad
h	Hora (s)	V	Volumen
ha	Hectárea (s)	V _s	Velocidad superficial (m/s)
Hr ⁻¹	Hora (s) a la menos uno	V _{tip}	Velocidad de punta del impulsor (m/s)
<i>H. vi.</i>	<i>Heliothis virescens</i>	VVM	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
K	Constante	µg	Microgramo (s)
Kpb	Kilopares de bases	Yx/s	Rendimiento celular en base a sustrato (g de células secas/g de sustrato)
KDa	Kilodaltones	QO ₂	Velocidad específica de consumo de oxígeno (gO ₂ /gBM x h)
K _{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Hr ⁻¹)		
Km ²	Kilómetro (s) cuadrado (s)		
l	Litro (s)		
l/ha	Litro (s) por hectárea		
lb	Libra (s)		
LMC	Litro de Medio de Cultivo	α	Constante
m	Constante	β	Constante
min	Minuto (s)	δ	Constante
ml	Mililitro (s)	γ	Constante
Na	Demanda biológica de oxígeno (g O ₂ /LMC X h)	μ	Velocidad específica de crecimiento (Hr ⁻¹)
N _p	Número de Potencia (adimensional)		
N _{Re}	Número de Reynolds (adimensional)		
%	Porcentaje		
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno (g/l.h)		
Po	Potencia (kg m/seg, HP)	α	Alfa
P	Presión (atm)	β	Beta
ppm	Parte (s) por millón	γ	Gamma
P _o	Potencia gaseada (H _p)	δ	Delta
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H ⁺		
PsCl	Proteínas cristal insecticidas		

SUBINDICE

GRIEGAS

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Esquema de producción de un plaguicida natural y/o tradicional de <i>B. thuringiensis</i> .	22
2	Esquema de los métodos utilizados para el aislamiento, identificación, registro y conservación de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .	54
3	Esquema de obtención del complejo espora-cristal.	58
4	Esquema de bioensayos.	59
5	Consumo de oxígeno por <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-7 bajo diferentes condiciones de VVM y r.p.m. en fermentadores de 14 l de capacidad.	83
6	Consumo de oxígeno por <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-10 bajo diferentes condiciones de VVM y r.p.m. en fermentadores de 14 l de capacidad.	85
7	Efectos de los diferentes tratamientos (agitación y aereación) sobre la producción de <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-7.	86
8	Efectos de los diferentes tratamientos (agitación y aereación) sobre la producción de <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-10.	88

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página
1	Características ideales y estrategias de selección para cepas de <i>B. thuringiensis</i>.	9
2	Actividad biológica de variedades de <i>B. thuringiensis</i>.	10
3	Insectos blanco más importantes para Proteínas Cristal Insecticida (PsCI).	17
4	Importancia a nivel mundial de los insectos plaga (Lepidópteros).	18
5	Lepidópteros plaga que son controlados con <i>B. thuringiensis</i> a nivel mundial, en orden de importancia.	18
6	Tipos de cultivos afectados por <i>T. ni</i> y <i>H. virescens</i>, susceptibles de ser controlados por <i>B. thuringiensis</i>.	20
7	Cultivos en los cuales se ha autorizado utilizar <i>B. thuringiensis</i> en México.	21
8	Mercado global en millones de dólares para productos con <i>B. thuringiensis</i>. (Año 1990).	23
9	Crecimiento del mercado para productos de <i>B. thuringiensis</i> en millones de dólares. (Hasta el año 2,000).	24
10	Tipos de plaguicidas vendidos en EUA (total: 7,300 millones de dólares). Año 1990.	25
11	Productos basados en <i>B. thuringiensis</i> disponibles comercialmente a nivel mundial.	27
12	Compañías involucradas con investigación, desarrollo y producción de <i>B. thuringiensis</i>.	28

13	Clasificación de las proteínas del cristal producidas por <i>B. thuringiensis</i>, de acuerdo a su organización proteica y rango de huésped.	32
14	Clasificación en México, de los plaguicidas según su peligrosidad.	46
15	Pruebas bioquímicas para la identificación de una subespecie de <i>B. thuringiensis</i>.	55
16	Características y condiciones de los fermentadores de 130 y 500 litros de capacidad total utilizados durante el escalamiento para la producción de <i>B. thuringiensis</i> cepas GM-7 y GM-10.	65
17	Cepas de <i>B. thuringiensis</i> HD y sus serotipos de datos analizados en los datos de archivo para su selección y evaluación.	67
18	Serovariedades y resultados de los bioensayos de los extractos de fermentación almacenados de las cepas HD evaluadas para su selección.	69
19	Cepas y serotipos a las cuales pertenecen las cepas clave GM nativas de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas.	70
20	Resultados de bioensayos del extracto de fermentación almacenado (HD-263) y comparación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) y porcentaje de mortalidad. Con el estándar internacional y Javelin.	72
21	Resultados de bioensayos efectuados para cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> clave GM contra <i>T. ni</i> y <i>H. virescens</i>.	74
22	Actividad tóxica de extracto almacenado (HD-530) clave 3035 del año 1980 y producido recientemente contra <i>T. ni</i>.	75
23	Toxicidad del cultivo total y del extracto de las cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> clave GM contra larvas de <i>H. virescens</i> y <i>T. ni</i>.	75
24	Composición de los medios de cultivo y condiciones	76

de fermentación encontrados en los datos de archivo analizados para las cepas de *B. thuringiensis* clave HD y los utilizados para las cepas GM-7 y GM-10.

25	Resultados de consumo de azúcares reductores de la fermentación de <i>B. thuringiensis</i> GM-7.	77
26	Resultados de consumo de azúcares reductores de la fermentación de <i>B. thuringiensis</i> GM-10.	78
27	Toxicidad de los extractos de <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-7 recuperados a nivel de fermentadores de 14l de capacidad total y producidos bajo diferentes condiciones de agitación y aereación.	79
28	Resultados de los datos de la fermentación de <i>B. thuringiensis</i> GM-7 propagada en diversas condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l de capacidad total.	80
29	Toxicidad de los extractos de <i>B. thuringiensis</i> cepa GM-10 recuperados a nivel de fermentadores de 14 l de capacidad total y producidos bajo diferentes condiciones de agitación y aereación.	80
30	Resultados de los datos de la fermentación de <i>B. thuringiensis</i> GM-10 propagada en diversas condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l de capacidad total.	81
31	Resultados de cuentas de esporas (UFC) y bioensayos de las muestras recuperadas por coprecipitación de lactosa-acetona para las cepas de <i>B. thuringiensis</i> GM-7 y GM-10 propagadas en fermentadores de 500 y 130 l de capacidad total respectivamente.	82
32	Efecto de la escala del fermentador sobre la producción y toxicidad de las cepas GM-7 y GM-10.	94

DEDICATORIA

Al gran arquitecto del universo : Dios

Por haberme permitido terminar esta obra
en la compañía y recuerdo de mis seres
más queridos

A mis padres:

Mayor José Luis Galán Muzquiz. (†)
Sra. Lucila René Wong Guerrero
Con admiración y respeto por su recuerdo
y educación de la vida.

A mi esposa:

Nelly, con mi amor y cariño por el apoyo
para lograr este objetivo y felicidad brindada.

A mis hijos:

José Luis, Lucila Adriana, Nelly María, por
ser nuestros motivos y apoyo de superación.

A mis tíos:

Gustavo Wong Guerrero (†), **Hector, Nicolás Rodríguez**.
por sus valiosos consejos y apoyo de siempre.

A mis amigos y compañeros:

**Reyes Tamez, Luis A. Elizondo, Lezmes Valdéz, Guillermo
Compeán, Samuel de la Garza, Filiberto de la Garza, Pedro
Guajardo, Oscar Medrano, Cristina Rodríguez, Hiram
Medrano, Juan José Peña**. Por su amistad siempre brindada.

" Por valores académicos como nuestro deber ser universitarios "

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterrey, N.L., y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos, México; a ambas instituciones mi más grande agradecimiento al apoyo brindado. Si deseara citar en orden de importancia a las diversas personas, compañeros y colegas, integrantes de las anteriores instituciones y de otras, por sus contribuciones para la terminación de esta obra, me temo que no podría reconocer con justicia en orden todos sus nombres, ya que sus comentarios y aportaciones individuales e institucionales fueron muy diversas y valiosas, sin ninguna excepción. Sin embargo, desearía expresar mi más profundo reconocimiento a:

Dr. Rodolfo Quintero Ramirez, por sus aportaciones y brillante dirección de tesis.

Dra. Laura M. Trejo Avila, por su excelente coodirección y asesoría brindada.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra, por su revisión y conocimientos aportados.

Dra. M. Cristina Rodríguez Padilla, por haber apoyado esta línea de investigación, así como por sus valiosas contribuciones científicas generadas en conjunto.

Dr. Howard T. Dulmage, del USDA-ARS por haber impulsado dentro de nuestra Universidad esta semilla, que el planto, y que actualmente sigue creciendo.

Dr. Filoyd P. Horm del USDA-ARS por su apoyo brindado.

Dra. H. de Barjac del Instituto Pasteur de Paris Francia, por su colaboración y amistad brindada durante el inicio de esta línea de investigación.

Dr Manuel Silos Martinez, Rector de nuestra Universidad por el apoyo y amistad brindada de largo tiempo.

Dr. Fernando Jimenez Guzmán, Director de nuestra Facultad por su cooperación de siempre y valiosa amistad.

Dra. Julia Verde Star, Jefe de la División de Posgrado F.C.B., U.A.N.L. por las facilidades brindadas y revisión.

Al apoyo de SESIC-SEP, CONACYT, y Centro Internacional de Biología Molecular[®] y Celular.

Al USDA-ARS, División Sureste de Texas y a la Compañía Celanese Mexicana.

Al trabajo de edición, revisión y aportaciones del **Dr. Benito Pereyra** y **M. C. Hugo Alberto Luna**. Así como a la **M. C. Kathiuska Arévalo**.

Al **M. C. Roberto Mercado** y **M. C. Rafael Castro** por su apoyo en estadística.

A la **Sra. Norma González** por su cooperación en el escrito del trabajo

Finalmente a los integrantes del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo "Dr H.T. Dulmage" y sus Unidades de: Genética de Microorganismos y Biología Molecular, Bioensayos y Planta Piloto, del Departamento de Microbiología e Inmunología, por haber compartido conmigo el iniciar y buscar la generación del conocimiento a través del trabajo de equipo y de su meta de:

" Una cepa y su producto es el proceso; y el proceso es el producto de la cepa "

RESUMEN

Durante las últimas tres décadas, *Bacillus thuringiensis* ha sido una bacteria importante dentro de la microbiología industrial por su uso en control biológico de insectos plaga (recientemente para nemátodos y protozarios) y sus aspectos de seguridad y manejo. Actualmente, entre las principales estrategias para impulsar el desarrollo de los plaguicidas biológicos de *B. thuringiensis* están la búsqueda de nuevas cepas y/o el mejoramiento genético de las mismas, con el fin de que presenten nueva actividad, así como estudios de procesamiento a nivel de escala industrial que permitan conservar la actividad de la cepa con mejores rendimientos de producción y el mejoramiento de formulaciones para aumentar su efectividad. Por lo anterior, con objeto de seleccionar nuevas cepas activas, se evaluó la toxicidad de 48 extractos almacenados de fermentación, encontrándose una elevada potencia en las cepas HD-193, HD-263 y HD-530, variedades *galleriae*, *kurstaki* y *morrisoni*, respectivamente. La más potente fue la cepa HD-263 año 1980, clave (3264), la cual presentó una toxicidad de 66 % contra *Trichoplusia ni* y 58 % contra *Heliothis virescens*, en dosis de 50 µg/ml de dieta, lo que nos indica el valor de la persistencia en la potencia y toxicidad para esta cepa en el extracto almacenado, lo cual representa un criterio importante para estudios futuros. Se analizaron 100 cepas nativas de *B. thuringiensis* de nuestra colección, resultando mejores con respecto a su potencia y toxicidad contra *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*, las que pertenecen al serotipo 7 var. *atzawai*, claves GM-1, GM-7, GM-9, GM-10, GM-58 y GM-92. De éstas fueron seleccionadas las cepas GM-7 y GM-10 para efectuar estudios de optimización de las condiciones de operación a nivel de fermentadores de 14 l y escalamiento a nivel de 130 y 500 l de capacidad total, para lo cual se usó un método estadístico de matriz plan Puebla Turrent 1970, de 2 factores (agitación y aereación) en 8 tratamientos por triplicado, buscando encontrar la máxima toxicidad y producción en fermentadores de 14 l. Para la cepa GM-7 propagada en un medio de cultivo denominado A-1, la mejor producción de extracto de fermentación fue de 18 g/l, en condiciones de 500 r.p.m. y 0.75 VVM, con una actividad tóxica de 91 % para *T. ni* y de 48 % para *H. virescens*, empleando dosis de 50 µg/ml de dieta. Para la cepa GM-10 se encontró una producción de 14.6 g/l a 500 r.p.m. y 1 VVM con una toxicidad de 96 % para *T. ni* y 29 % para *H. virescens*. Sin embargo, la mejor producción de 19 g/l a 700 r.p.m. y 1 VVM produjo una toxicidad de 90 % para *T. ni* y 17 % para *H. virescens*, empleando la misma dosis. Para aspectos de escalamiento se estableció que un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_L) de 145 Hr⁻¹ es el óptimo para asegurar la producción en fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total. Con lo anterior, los extractos de fermentación recuperados de GM-7 del fermentador de 500 l fueron de 16.2 g/l y una toxicidad de 100 % contra *T. ni* y 68 % contra *H. virescens*, con una dosis de 50 µg/ml; mientras que para GM-10, en el fermentador de 130 l se obtuvo una producción de 12.0 g/l y una toxicidad de 96 % para *T. ni* y 56 % para *H. virescens*, con la misma dosis. Finalmente se aporta un procedimiento de escalamiento industrial en base al K_L para cepas activas seleccionadas de *B. thuringiensis* var. *atzawai*, cepas GM-7 y GM-10, en donde es posible determinar los criterios esenciales de toxicidad y producción en fermentadores de 14 l y reproducirlos en el escalamiento a fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.

ABSTRACT

During the last three decades, *Bacillus thuringiensis* has been an important bacteria within the industrial microbiology for the use of biological control of insect plague (recently for nematodes and protozoan) by the aspects of security and handling. At the present time, principal strategies to impulse the development of biological plaguicides of *B. thuringiensis* are: the search for new strains and/or genetical improvement of the same., to show new activity and formulation improvements to raise its potency. By the before mentioned with the objective to choose new active strains, the toxicity of 48 stocked extracts of fermentation were evaluated, finding a high potency in strains HD-183, HD-263 and HD-530, varieties *galleriae*, *kurstaki* and *morrisoni*. The most potent was strain HD-263 of 1980 clue (3264), which presented toxicity of 66 % against *Trichoplusia ni* and 58 % against *Heliothis virescens* in a dose of 50 µg/ml of diet, which tells us the persistency of the potencial and toxicity for this strain in the stocked extract, which represents an important option for future studies. 100 native strains of *B. thuringiensis* from our collection were analyzed, the ones which resulted much better with respect to its potency and toxicity belong to the serotype 7 var. *aizawai* clue GM-1, GM-7, GM-9, GM-10, GM-58 and GM-92, these strains GM-7, and GM-10 were chosen for studies of optimization of the operative conditions at level of fermentators of 14 l and the scale-up at the level of 130 and 500 l of total capacity, for which a statistical matrix method of Turrent Puebla plan (1970) was used from 2 factors (agitation and aereation) in 8 treatments triplicated, trying to find maximum toxicity and fermentator production of 14 l. For the strain GM-7 growth in a medium culture denominated A-1, the best production in extract of fermentation was 18 g/l, under conditions of 500 r.p.m. and 0.75 VVM with a toxic activity of 91 % for *T. ni* and of 48 % for *H. virescens* using a dose of 50 µg/ml of diet. For the strain GM-10, a production of 14.6 g/l under 500 r.p.m. and 1 VVM with a toxicity of 96 % for *T. ni* and 29 % for *H. virescens*; however, the best production of 19 g/l under 700 r.p.m and 1 VVM, produced a toxicity of 90 % for *T. ni* and 17 % for *H. virescens*, using the same dose. For the scale-up aspects, a volumetric coefficient of oxygen transfer (K_L) of 145 hr⁻¹ was established. It is the best to assure the production of fermentators of 130 and 500 l of total capacity. Regarding to the before mentioned, the recovered extracts of fermentation of GM-7 of the fermentator of 500 l with a yield of 16.2 g/l and a toxicity of 100 % for *T. ni* and 68 % for *H. virescens* with a dose of 50 µg/ml, while for GM-10, in the fermentator 130 l, with a yield of 12.0 g/l and a toxicity of 96 % for *T. ni* and 56 % for *H. virescens* with the same dose. Finally, a procedure of industrial scale-up is given based at K_L for selected active strains of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, strains GM-7 and GM-10 in which toxicity and production criteria are posible to be determined in fermentators of 14 l and reproduce them in the scale-up by the fermentator 130 and 500 l of total capacity.

INTRODUCCION

Bacillus thuringiensis es una bacteria importante en el manejo integral de insectos plaga,¹⁸⁸ la cual produce cuerpos paráesporales también denominados δ -endotoxina, que puede contener una o varias diferentes proteínas cristal insecticidas (PsCI) tóxicos para lepidópteros,¹⁵⁶ dípteros,^{3,319} coleópteros,^{153,182,276} y más recientemente contra nemátodos^{98,208} y protozoarios.³¹⁰ Por lo anterior, resulta de gran interés tanto como un objeto de estudio científico como por su potencial comercial. Esta bacteria ha sido ampliamente evaluada por su especificidad contra insectos, bajos costos de desarrollo y compatibilidad con el medio ambiente. Por otra parte, constituye una interesante y útil fuente de genes disponibles, los cuales por métodos de ingeniería genética, han sido transferidos a otros organismos.¹⁶⁸

Esta bacteria es un bacilo esporulado Gram positivo con flagelos peritricos,²⁹⁴ a excepción de un biotipo.⁶⁹ Por otra parte, hasta 1990 se conocía un total de 30 grupos de variedades en base a sus antígenos flagelares, así como 7 subgrupos, en un total de 37 serotipos,^{69,239,271,272} dentro de los cuales nuestro grupo de investigación en la Universidad Autónoma de Nuevo León aisló y ha aportado dos: *B. thuringiensis* var. *neoleonensis*²⁷² y *B. thuringiensis* var. *mexicanensis*,²⁷¹ serotipos H-24 y H-27, respectivamente.⁶⁹ Más recientemente, en Marzo de 1992, se reportó el último grupo H-30, el cual resultó tóxico para dípteros.²³⁹

Por otra parte, es bien conocido que el cristal glicoproteico de *B. thuringiensis* está formado por polipéptidos denominados δ -endotoxina.³²⁵ Estos péptidos son sintetizados en forma de protoxina, mismos que son solubilizados y procesados en el intestino del insecto susceptible para generar el fragmento tóxico (toxina). Las PsCI varían en tamaño, sin embargo, en general, el fragmento tóxico radica en la mitad amino terminal de la protoxina,³³³ por ejemplo para lepidópteros, la protoxina es de 120-160 KDa y la toxina de 60 KDa,^{190,330} algo muy similar es para dípteros.^{12,62} Para coleópteros se ha encontrado una fracción tóxica de 64 KDa.^{78,286}

Las investigaciones han estado orientadas a intentar elucidar los siguientes puntos: a) los sitios blanco para las toxinas (fracciones activas), b) los mecanismos específicos citotóxicos para estas fracciones polipeptídicas, c) la selección de nuevas cepas altamente potentes a partir de la naturaleza y de colecciones existentes y su posterior mejoramiento genético, d) comportamiento en el medio ambiente y e)

desarrollo de nuevas formulaciones más eficaces y eficientes para bioinsecticidas.^{93,114,193,195}

Actualmente se cuenta con un total de 106 cepas nativas dentro de nuestra colección internacional de alrededor de 1,650 cepas existentes hasta Septiembre de 1992.²⁷³ A las cepas nativas se les ha denominado con la clave GM, mismas que se han recuperado de suelo, insectos y granos almacenados.^{117,118,273}

Esto nos brinda la oportunidad de seleccionar cepas nuevas y toxinas de diversos serotipos de *B. thuringiensis* que hasta ahora no han sido investigadas, con el objeto de encontrar bioinsecticidas altamente potentes para insectos lepidópteros plaga de importancia agrícola a nivel nacional y mundial, y poder en un futuro establecer los criterios de escalamiento para el desarrollo biotecnológico de un proceso industrial con algunas de estas cepas nativas de *B. thuringiensis*.

Por lo mencionado anteriormente y tomando en cuenta que la línea de investigación sobre bioinsecticidas que se desarrolla en nuestra Facultad,^{122,321} tiene fuerte impacto a nivel nacional e internacional, propusimos la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPOTESIS

Se podrán seleccionar cepas nativas potentes de *B. thuringiensis* que sean factibles de propagarse y efectuar su escalamiento a nivel planta industrial para el control biológico de *Trichoplusia ni* (Hubner) y *Heliothis virescens* (Fabricius).

OBJETIVOS

- 1.- Selección de cepas potentes de *B. thuringiensis* para el control biológico de *T. ni* y *H. virescens* a partir de nuestra colección de extractos de fermentación almacenados y cepas nativas de *B. thuringiensis* clave GM.
- 2.- Optimización de condiciones de operación y producción para la cepa seleccionada en fermentadores de 14 l de capacidad total.
- 3.- Escalamiento del proceso en fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.

ANTECEDENTES

I.- *Bacillus thuringiensis*.

1.- Control biológico.

Desde hace 1700 años el control biológico de insectos plaga en la agricultura se practica en el lejano Oriente, y hace más de 100 años en Europa y E.U.A.¹¹⁴ En 1964, Paul De Bach define a dicho control como la acción de parásitos, predadores y patógenos en mantener a otra población de organismos a una densidad más baja en promedio, misma que deberá ocurrir en la ausencia de ellos. Posteriormente en 1987, se redefine este concepto como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente, genes o sus productos para reducir los efectos de organismos plaga.¹¹⁶

Los insectos son blanco susceptibles al ataque de una gran variedad de microorganismos, entre los que destacan virus,^{140,301} bacterias,^{3,286} hongos^{297,305} y protozoarios.^{26,151,300} Actualmente se conocen más de 100,000 especies de microorganismos, destacándose como entomopatógenos alrededor de 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y cerca de 100 especies de bacterias. Estos microorganismos se usan en el control microbiano de poblaciones de insectos plaga de importancia agrícola, forestal, ornamental y salud pública. La mayoría de estos microorganismos son poco conocidos, mientras que algunas variedades de *B. thuringiensis*,¹⁸ y virus han sido estudiados con más detalle.^{67,301} *B. thuringiensis* es un producto comercial y de gran uso en el manejo integral de plagas.²⁴²

2.- Desarrollo.

En 1901, el japonés Ishiwata descubrió a *B. thuringiensis*.¹⁶¹ Posteriormente, en 1911, Berliner también aisló de un insecto enfermo esta misma bacteria, a la cual denominó *B. thuringiensis*, por Thuringia, una región alemana. También describe que esta bacteria esporulada después de terminar su crecimiento, produce un cuerpo paraesporal. En 1915, Aoki y Chigasaki demostraron que cultivos viejos de *Bacillus sotto* contenían una toxina que causaba muerte en insectos. Posteriormente, en 1927, Mattes confirmó lo de Berliner, observando además que el crecimiento del cuerpo de desecho en la bacteria cambia también la posición de la espora.^{2,93,95}

Hannay, en 1953, utilizando la microscopía electrónica redescubrió este cuerpo y confirmó las anteriores observaciones mientras examinaba la esporulación. Observó

cristales en forma de diamantes libres del esporangio en preparaciones de cultivos esporulados de *B. thuringiensis*, refiriéndose a éstos como un cuerpo paraesporal. Hasta ese tiempo, nadie relacionaba esto con una función de patogenicidad. Sin embargo, Hannay sugiere que los cristales al encontrarse en el intestino medio del insecto, están conectados con la formación de una toxina que induce una septicemia en las larvas.^{107,143,146}

Posteriormente Smith y col., (1946) describen a *B. thuringiensis* como una variedad dentro de *Bacillus cereus*, porque independientemente de su patogenicidad para ciertos insectos y la forma oblicua de la espora en las células, resultaba indistinguible de *B. cereus*.²³¹ Transcurrieron 50 años desde el aislamiento original de *B. thuringiensis* antes que la acción tóxica de este microorganismo fuera reconocida.¹⁴³

En 1951-1952, Toumanoff y Vago aíslan una cepa, la cual denominan *B. cereus* var. *alesti*, que causa toxemia y septicemia en larvas del gusano de seda y observan que estos síntomas varían con la cantidad de cultivo ingerido por la larva.^{143,312}

Las primeras observaciones de Aoki y Chigasaki, así como de Hannay, acerca de la relación entre el cristal y la patogenicidad hacia el insecto, fueron confirmadas por Angus en 1953-1954, quien demuestra que la toxicidad en el insecto está principalmente asociada con la inclusión cristalina del bacilo y requiere ser solubilizada en álcali diluido o jugo intestinal del insecto para ser activo.^{10,47} En 1955, Hannay y Fitz-Jamez reportan que la inclusión cristalina es de naturaleza proteica y su ingestión es suficiente para causar la muerte de larvas de insectos lepidópteros susceptibles.¹⁴³

Entre 1951 y 1956, Stainhaus, en Estados Unidos, publicó varios artículos que estimularon el uso y explotación comercial de *B. thuringiensis* como un agente de control biológico contra algunas plagas de lepidópteros.^{4,96} En 1962, H. de Barjac y A. Bonnefoi proponen por primera vez una clasificación serológica en base a los antígenos flagelares para este grupo de bacterias.⁶⁵

En 1969, H.T. Dulmage aísla una cepa de *B. thuringiensis*, la cual denomina HD-1, que resulta entre 20 y 200 veces más potente que todas las cepas conocidas. Esta cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) es actualmente la base comercial de la mayoría de este tipo de productos contra diversas plagas de lepidópteros de importancia agrícola a nivel comercial.^{79,87,89}

Es importante mencionar el descubrimiento hecho en 1977 por Goldenberg y Margalit, los cuales aíslan la primera cepa de *B. thuringiensis* patógena para larvas de mosquitos^{20,132} y otras especies de dípteros,¹²⁴ la cual también implicó un nuevo serotipo.⁹⁸ Más recientemente, Krieg y col. aíslan una cepa denominada (B1 256-82) que fue activa contra larvas de coleópteros, sin embargo, no resultó un serotipo nuevo, perteneciendo este aislado al serotipo 8a 8b.^{99,162,163}

La patogenicidad de esta bacteria para las larvas de insectos está basada principalmente en las proteínas tóxicas que contiene el cristal paraesporal, sin embargo, la patogenicidad de las cepas de *B. thuringiensis* está restringida a cierto grupo taxonómico de insectos.¹⁶³

3.- Tipos de toxinas.

Actualmente se conocen más de mil toxinas de microorganismos que actúan contra insectos y malezas. Dentro de esas toxinas existen más de 16 clases de plaguicidas de *B. thuringiensis* que han sido comercializadas desde 1960.²²

Esta bacteria y sus variedades sintetizan 7 tipos de toxinas, entre los que se encuentran la α y β -exotoxinas, la δ -endotoxina, "el factor piojo", una bacteriocina (thuricina) y dos inhibidores de la respuesta inmune de los insectos denominados InA e InB.⁹⁷ Las dos primeras toxinas presentan efecto plaguicida sobre un amplio espectro de artrópodos,¹⁸¹ mientras que la δ -endotoxina actúa sobre un grupo reducido de insectos, nemátodos, protozoarios^{98,200,310} y células tumorales,^{258,259} además de presentar otras actividades biológicas como el incrementar la respuesta inmune y actuar como un coadyuvante en mamíferos.²⁵⁷

α -exotoxina, también denominada lecitinasa o fosfolipasa C (E.C.3.1.4.3),¹⁶⁴ puede ser sintetizada por *B. cereus*.¹⁸⁵ Esta enzima termolábil se acumula durante la fase de crecimiento exponencial de algunas variedades, es capaz de lisar muchos diferentes tipos de células y es tóxica para *Galleriae mellonella* y la mosca aserrada de los pinos.⁷⁵

β -exotoxina: Una extensa revisión sobre esta toxina ha sido efectuada por Sebesta y col.^{284,285} La β -exotoxina (Factor Mosca) es una toxina termoestable secretada por algunas variedades durante el crecimiento exponencial, como por ejemplo *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, la cual normalmente produce cerca de 50

mg/l.²⁷⁵ Químicamente, la β -exotoxina es una adenina con un residuo de glucosa y ácido alárico.^{105,338} Es altamente tóxica para moscas y varios otros tipos de insectos.^{42,288} Aunque el modo de acción de esta toxina no es muy claro, se ha demostrado que bloquea la mitosis, ejemplo de que éste es un teratogénico e inhibe a la ARN polimerasa dependiente de ADN de células de mamíferos y de bacterias,^{48,167} causando mutaciones. Se ha encontrado que en células sanguíneas humanas incrementó las aberraciones cromosomales. También se ha demostrado que inhibe la mitosis en meristemos de raíz, simulando el efecto de la colchicina y vinblastina.^{199,285} Por las anteriores propiedades mutagénicas y teratogénicas, su uso como insecticida no está permitido en Norteamérica y Europa, sin embargo, sí es producido y usado en la antigua Unión Soviética.¹¹⁴

δ -endotoxina: De las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, la δ -endotoxina es la más importante.¹⁰⁷ Esta toxina es sintetizada en forma de protoxina durante el proceso de esporulación (Idiofase) dentro de la célula vegetativa. La protoxina aparece como inclusión cristalina, considerándose una característica constante para las variedades de *B. thuringiensis*.^{55,107,196} A esta inclusión se le adjudican algunos sinónimos, tales como cuerpo paraesporal, cristal de proteína (denominado así todo el cuerpo paraesporal), sin embargo, solamente la porción activa debe ser considerada δ -endotoxina.^{44,197,244} A esta porción se le denomina PsCl.¹⁶⁸ Generalmente, las PsCl son codificadas por genes que se localizan en megaplásmidos, pero algunas también se han localizado en el cromosoma bacteriano.²⁴³

Bulla y col., (1976) propusieron que la actividad de la toxina bajo condiciones naturales ocurre como sigue: a) es solubilizada en el pH alcalino del intestino medio y b) es procesada por proteasas específicas.⁴⁰

Asimismo, *B. thuringiensis* produce enzimas extracelulares como quitinasa, en la que reside también su patogenicidad, enzima que daña la membrana peritrófica y facilita el acceso de la δ -endotoxina o bacterias al epitelio del intestino, produciendo otras enzimas de tipo proteasas que están asociadas con el inicio de la esporulación y son necesarias para el completo éxito del proceso de toxicidad. Todas ellas muestran en conjunto una acción de virulencia con la δ -endotoxina y la β -exotoxina.^{154,155,158,179}

Por otra parte, la habilidad que presenta *B. thuringiensis* para producir sus toxinas varía de cepa en cepa y puede depender también de las condiciones del cultivo.^{51,94,96,130,232} Para la selección de cepas de *B. thuringiensis* se deberán tomar

en cuenta un conjunto de características ideales,^{20,39,55,78} mismas que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Características ideales y estrategias de selección para las cepas de *B. thuringiensis*.

-
- 1.- Facilidad de producción en escala masiva a nivel comercial.
 - 2.- Almacenaje por largo período de tiempo sin pérdida de actividad.
 - 3.- Transportable a cualquier lugar del mundo.
 - 4.- Persistencia después de la aplicación en el hábitat natural.
 - 5.- Eficacia y eficiencia para eliminar insectos blancos.
 - 6.- No tóxico para plantas, animales, hombre y otros insectos benéficos.
 - 7.- Bajos costos de producción.
 - 8.- Manipulable y estable genéticamente.
 - 9.- Producción alta (g/l).
 - 10.- Cepa libre de fagos.
-

Adaptada de Barak y col., 1988.

Nosotros hemos reportado el hallazgo de cristales en forma triangular y rectangular, envueltos en exomembranas multilaminares, los cuales son muy difíciles de solubilizar en pH alcalino y no son tóxicos para los insectos hasta ahora probados. Tal es el caso de las cepas *B. thuringiensis* var. *neoleonensis*, forma de cristal triangular²⁷² y *B. thuringiensis* var. *coahuilensis* (serotipo 8), forma de cristal rectangular.¹²⁰ Recientemente se han reportado otras cepas de *B. thuringiensis* que presentan exomembranas y también son no tóxicas, *B. thuringiensis* var. *shandongensis* con forma de cristal esférico.²⁵⁴

En la tabla 2 se muestra la actividad biológica de las diferentes variedades de *B. thuringiensis*. Por último, cabe mencionar que entre las bacterias comercialmente más usadas y consideradas como productoras de cristales están los serotipos H-1, H 3a3b, H 5a5b, H-7, H 8a8b, H-9, H-10 y H-14, dentro de los cuales siguen resaltando por sus actividades para las subespecies del serotipo 3a3b.^{55,67,96,137,163,226,241,244,265,275}

Tabla 2. - Actividad biológica de variedades de *B. thuringiensis*.

Organismo blanco	Variedades de <i>B. thuringiensis</i>
Lepidópteros	<i>aizawai</i> , <i>alesti</i> , <i>canadiensis</i> , <i>darmstadiensis</i> , <i>dendrolimus</i> , <i>entomocidus</i> , <i>fukuokaensis</i> , <i>galleriae</i> , <i>kenyae</i> , <i>kurstaki</i> , <i>kyushuensis</i> , <i>morrisoni</i> , <i>ostrinae</i> , <i>pondicheriensis</i> , <i>shandogiensis</i> , <i>sotto</i> , <i>subtoxicus</i> , <i>thompsoni</i> , <i>thuringiensis</i> , <i>tohokuensis</i> , <i>tolworthi</i> , <i>wuhanensis</i> , <i>yunnanensis</i> , <i>mexicanensis</i> *
Dípteros	<i>aizawai</i> , <i>fukuokaensis</i> , <i>israelensis</i> , <i>kenyae</i> , <i>kyushuensis</i> , <i>morrisoni</i> , <i>thuringiensis</i> , <i>tolworthi</i> , <i>medellin</i> *
Coleópteros	<i>morrisoni</i> , <i>tenebrionis</i> ¹ , <i>san diego</i> ¹ , otras
Nemátodos	Cinco cepas sin clasificar patentado por la Cía. Mycogen
Protozoarios**	Un cepa sin clasificar patentado por la Cía. Mycogen

Nota: Las variedades en negritas son usadas en preparaciones comerciales.

* = Variedades no incluidas en la descripción de Frost y Sullivan, 1990.

** = Tomado de Thompson M., 1992.

¹ = Son considerados biotipos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.- Mecanismos de acción de la δ -endotoxina.

Percy y col., (1983) al estudiar cambios estructurales causados por la toxina de *B. thuringiensis* var. *san diego* y comparar su actividad tóxica con *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, se encuentra que la hinchazón causada es muy semejante a la provocada por *B. thuringiensis* var. *san diego* y *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Entre las diferencias que fueron observadas se indican las siguientes: ausencia de lesiones de membranas y daño microvillar, así como una respuesta comparativa mas lenta para la toxina de *B. thuringiensis* var. *san diego*.²⁴⁶ En 1992, Bauer utiliza el insecticida M-One^R contra el

escarabajo *Plagioderia versicolora*. Finalmente encuentra que *B. thuringiensis* var. *san diego* está presente en ese formulado y realmente suprime el crecimiento del estado larval. Sin embargo, se requieren repetidas aplicaciones para los adultos. Las larvas del segundo estadio resultaron más susceptibles con las de tercer estadio que los adultos de un día. *P. versicolora* resulta más tolerante para *B. thuringiensis* var. *san diego* que el escarabajo colorado de la papa.^{23,24}

B. thuringiensis var. *kurstaki* causa trastornos en el plasma, en las membranas mitocondriales y en la membrana nuclear, así como pérdida de la estructura interna microvillar después de 15 minutos de haber sido ingerida.^{189,246} Se concluye que la causa de hinchamiento por la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *san diego* después de aparecer la lisis celular, consiste en un modelo de lisis osmótico coloidal propuesto ya inicialmente.¹⁰¹ Sin embargo, ellos no encuentran lesiones de membrana, daños moleculares y una respuesta lenta comparativamente en el epitelio. Sugieren que existan mecanismos diferentes de acción para la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *san diego*. Estas diferencias resultantes se deben a variaciones en el medio ambiente del intestino del huésped, solubilidad de la toxina Cry, bioquímica de la toxina e interacción de ésta con receptores de la membrana o bicapa lipídica.

5.- Resistencia.

Es conocido que dos especies de mosquito han desarrollado resistencia a *B. thuringiensis* var. *israelensis*, así como un incremento de 11 veces más para *Culex quinquefasciatus*, resistencia que fue encontrada después de 32 generaciones bajo una presión selectiva de LC_{95} , así como dos veces menos resistente para una cepa de *Aedes aegypti*, fenómeno de resistencia que fue observado después de 14 generaciones a LC_{50} bajo presión selectiva.³³⁴ Estos concluyen que en la resistencia a insecticidas microbianos probablemente involucra lo concerniente a cambios genéticos de 2 ó más loci. Otras investigaciones dirigidas en este sentido no fueron capaces de demostrar desarrollo de resistencia al complejo de δ -endotoxina-espora.¹⁸⁸

N. Becker, de la Universidad de Heidelberg, describe que entre 1981-1989 más de 40,000 ha (400 Km²) de criaderos de mosquitos en Alemania Federal fueron tratados con 17,000 l y 17 toneladas de formulados de *israelensis* y más del 90 % de las poblaciones de mosquitos fueron reducidas. No tienen incidencia de reportes de resistencia.²⁸

B. thuringiensis var. *israelensis* fue usada en 1981 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el oeste de Africa para el control de *Simulium damnosum*, insecto vector transmisor de la Oncocercosis (Ceguera del Río). El control del programa ahora cubre 50,000 Km de ríos y ha usado 700,000 l de *israelensis* por año en China. Una cepa similar (*B.t-187*) es usada en los campos de arroz para el control de *Anopheles sinensis*. El agente es aplicado para cubrir 12,000 ha (120 Km²) por año y reduce la incidencia de mosquito por un factor de 10 sobre los pasados 4 años. Investigadores han visto que cepas alternativas de *israelensis*, en el caso de plagas de dípteros desarrollan resistencia después. Otras cepas utilizadas para el control de dípteros son *B. thuringiensis* var. *morisoni* cepa PG-14 y subespecies H y 1 contra *S. vittatum* y *Aedes triseriatus*. Sin embargo, son menos efectivas que *B. thuringiensis* var. *israelensis*.²⁸

Durante los 30 años de uso, hay solo dos ejemplos de desarrollo de resistencia de lepidópteros a *B. thuringiensis*: la palomilla de la harina india, en granos almacenados (*P. interpunctella*) y la palomilla del dorso de diamante (*Plutella xylostella*). En ambas situaciones las plagas fueron sujetas a repetidos e intensivos usos de *B. thuringiensis*.¹⁶⁸

Esta bacteria produce varias toxinas que tienen una alta resistencia pasiva a los sistemas inmunes de los huéspedes,⁹⁷ aunque la literatura solamente contiene tres reportes sobre el desarrollo de resistencia a la δ -endotoxina. Uno es el desarrollo de resistencia de hasta 100 veces más a una formulación comercial utilizada para la palomilla del granero *P. interpunctella*, que fue observada después de 15 generaciones,⁷⁴ lo anterior es un ejemplo ideal de cómo el medio ambiente puede inducir el desarrollo de resistencia para esta bacteria, porque este insecto habita principalmente en los almacenes de granos. Bajo estas condiciones, los agentes tóxicos de *B. thuringiensis* son mas estables, lo cual favorece la selección de resistencia.

Dentro de las especies de insectos blanco no todas son igualmente sensibles a las PsCI, por ejemplo el gusano soldado es menos susceptible que el falso medidor. Entre las desventajas de la exposición de larvas de insectos a altas dosis de una toxina está el desarrollo a la resistencia para un plaguicida efectivo. Expresar PsCI es considerada como una muy útil herramienta en los programas de manejo integrado de plagas.¹⁶⁸ Algunos investigadores han llamado la atención acerca del desarrollo potencial de la resistencia de plantas modificadas genéticamente,¹³⁹ ya que esto

prolongaría la efectividad y traería como consecuencia un desarrollo de la resistencia para PsCI; para esto se ha sugerido que las poblaciones de insectos deberán ser expuestas a una combinación de diferentes toxinas. Otras medidas deberán ser solamente restringir la expresión de la proteína del cristal en cuanto a tiempo o limitando éstas a los órganos importantes económicamente de la planta, permitiendo solamente menos daños en otras partes.

Actualmente se conoce que a varias especies de insectos plaga,²¹⁶ dentro de las cuales se incluyen *H. virescens*, *Leptinotarsa decemlineata*, *P. interpunctella* y *P. xylostella*, les ha sido demostrada a nivel de laboratorio su habilidad para adaptarse a las toxinas de *B. thuringiensis* y desarrollar resistencia. *P. xylostella* se ha encontrado ampliamente resistente a nivel de campo, por lo cual se han propuesto varias alternativas para manejar este desarrollo de resistencia en los insectos plagas.²⁰⁵

Finalmente *B. thuringiensis* es un agente de bastante utilidad para utilizarse en el manejo integral de insectos plagas,^{52,103,128,178} debido a que el fenómeno de resistencia es casi nulo para los insectos blanco.^{129,136,204,325} Por lo anterior, las cepas de *B. thuringiensis* se dispersan ampliamente e invitan a desarrollar menos resistencia de los insectos plaga, por lo cual, una estrategia futura sería la de probar toxinas nuevas de las diversas cepas y sus cristales, actualmente y depositadas en las colecciones contra nuevos insectos blanco.^{2,102,188}

6.- Persistencia.

La limitada persistencia es una desventaja y está calculada para *B. thuringiensis* de 1 a 2 días en el campo y de dos semanas si se aplica forestalmente, debido a que se destruye la toxina por la luz ultravioleta y es mejor su persistencia para plagas forestales que de campo, debido en parte por los bajos niveles que toleran las plagas forestales, sin embargo, el gran número de generaciones de plagas por sesión expuestas en los campos de cosecha, elevan más los riesgos de aparición de resistencia.²⁸ Aumentar el uso combinado de *B. thuringiensis* con nuevas formulaciones e ingeniería genética para mejorar persistencia, podría inducir resistencia. *B. thuringiensis* deberá enfocarse a programas de manejo integral de plagas. Lo anterior se demuestra por estudios con cultivos en apio y el manejo integral con *B. thuringiensis* que ha dado en California una ganancia neta de 1,047 dólares/ha, comparada con 393 dólares/ha para un programa convencional de plaguicida. Los méritos relativos de aplicación de *B. thuringiensis* en una mezcla o rotación con los plaguicidas

convencionales y otros agentes microbianos son fuertemente debatidos. Opiniones aparecen a favor de la rotación, sin embargo, las mezclas deberían ser apropiadas para con agentes de similar persistencia. En pruebas de campo se encontró que la cepa del producto comercial Delfín (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD-945) fue mejor que la cepa HD-1 usada localmente.

Actualmente es esencial la caracterización de cepas de *B. thuringiensis*, tanto en su producción como en su evaluación de persistencia en el medio ambiente.³⁴

a) Potencia contra persistencia.

El incrementar la potencia es considerado mas importante que incrementar la persistencia como estrategia de mejora. A este respecto, K. Van Frankenhuisen, del Departamento Forestal de Canadá, menciona que a pesar de los avances en las formulaciones, existe una variación anual en las pruebas en contra del gusano del Abeto en Canadá. Las condiciones del clima, seguidas a la aplicación que afecta el comportamiento de alimentación producen resultados variables en el control, previniendo la ingestión de la plaga a la toxina.^{322,323} El sugiere pruebas de laboratorio en condiciones simuladas forestales, indicando que el 50 % de la población de la plaga que ha ingerido la dosis letal con 1 día de aplicación y el incremento en el tiempo de exposición, tienen poco efecto en la dosis de mortalidad; así al ser ingerida la toxina puede resultar una inhibición en la alimentación. La plaga quizá detiene su alimentación antes de que ésta tenga que ser absorbida como una dosis letal de la toxina. Un incremento de 10 veces en la potencia del producto deberá dar como resultado una rápida toma de la dosis letal, pero esto no es técnicamente posible. Alternativamente un incremento en el promedio esparcido en tamaño de la gota, tal vez permita una toma mas grande, reduciendo así la mejora de variabilidad. La necesidad de realizar más investigaciones aplicadas por aspersión es una manera de obtener una mejoría implementada. Se conoce que un 30 % del producto no da alcance a la plaga cuando se aplica en forma de aspersión y son mejores las aplicaciones en aspersiones en alta (7 l/ha) que en baja (2.4 l/ha).²⁸

7.- Ventajas y desventajas del uso de *B. thuringiensis* en control biológico.

Varios factores están influyendo para incrementar significativamente el uso de *B. thuringiensis*: a) la mayoría de los insectos plaga de importancia económica y salud

humana está desarrollando resistencia a varias clases diferentes de insecticidas químicos utilizados contra ellos, b) el costo social asociado con el uso de insecticidas químicos, está incrementándose debido a daños al medio ambiente y a la salud humana y c) los costos directos del desarrollo y producción de los insecticidas químicos derivados de la petroquímica están en constante escalamiento. Por otra parte, la toxina de *B. thuringiensis* no promueve un desarrollo rápido de resistencia. La investigación de *B. thuringiensis* se ve favorecida por tres grandes tendencias a nivel mundial: 1) una mayor demanda para el control biológico de insectos plagas,^{169,172} 2) la relativa inestabilidad en el medio ambiente de los productos de *B. thuringiensis* y 3) la frecuencia de éxito de actividad insecticida encontrada (1:20), en comparación con los compuestos químicos sintéticos.⁷⁵ El producto aplicado es de 10-50 g alrededor de 10^{20} moléculas por acre. La potencia molecular de las toxinas de *B. thuringiensis* comparada con otros plaguicidas es 300 veces más alta que los piretroides sintéticos, ya que se aplican 3×10^{22} moléculas por acre y 80,000 veces más alta que los organofosforados, de los cuales aplican 10^{24} moléculas por acre.¹⁰⁸

A continuación se mencionan las ventajas y desventajas que afectan la viabilidad económica del control biológico, así como otros factores.²⁴²

Ventajas:

- a) Alta especificidad. Ejemplos: ausencia de efectos tóxicos en organismos no blanco y mamíferos; uso permitido hasta fechas cercanas a la cosecha de los cultivos.
- b) Bajas expectativas a desarrollar resistencia en los insectos observados.
- c) Adaptable a múltiples tipos de formulaciones; potencial de incorporarle a estimulantes que incrementen el apetito, o cebos para hacerlos más atractivos en las formulaciones contra insectos.
- d) Probabilidad de producir más potentes formulaciones y bajar los costos de producción a través de sistemas nuevos de tecnología de fermentación.
- e) Altas probabilidades de que la cepa seleccionada y/o modificada genéticamente pueda ser utilizada como mejor control sobre el insecto plaga que la cepa silvestre que había sido encontrada; o bien, crear cepas de *B. thuringiensis* que tengan nuevos espectros de actividad contra el huésped o incrementar la actividad tóxica.

Desventajas:

- a) Espectro de huésped reducido.

- b) Carecer de protección en las patentes para las cepas silvestres.
- c) Se requiere un cabal tiempo de aplicación y además, sus efectos son mas lentos que los insecticidas químicos.
- d) La actividad tóxica depende de la ingestión, por lo tanto, la actividad de alimentación es vital para su acción, la cual depende de las condiciones ambientales.
- e) Costos relativamente más altos comparados con los insecticidas químicos, lo cual provoca que su distribución y uso esté limitado.
- f) Baja persistencia en el medio ambiente.

Por otra parte, los factores que afectan la viabilidad económica del control biológico de insectos,^{231,275} comparados con los métodos químicos tradicionales dependen de las características del insecto plaga, del agente de biocontrol, de la cosecha y de los factores sociales y humanos que se enumeran a continuación: 1) rendimiento contra efectos de calidad, 2) espectro de la plaga, 3) la relatividad de ser menos efectivos técnicamente que los agentes de control químico, 4) riesgos, 5) precios relativos de los agentes de control y 6) costo de implementación.

Finalmente, el costo del desarrollo de un plaguicida microbiano es menor que el de los plaguicidas químicos, ya que se requieren dos millones de dólares y de uno a dos años para su registro, mientras que para un plaguicida químico se requieren 40 millones de dólares y siete años para su registro.^{285,268}

8.- Insectos blanco.

Entre las estrategias de selección de cepas de *B. thuringiensis* para uso de control biológico, está el conocer los insectos plaga blanco más importantes para PsCI.¹⁶⁸ Estos se muestran en la tabla 3.

En países sericultores, particularmente Japón, es deseable que los microorganismos patógenos tengan baja toxicidad para el gusano de la seda y una alta potencia para los insectos blanco. Con este criterio de selección han encontrado una cepa de *B. thuringiensis* serotipo 4a4b, clave AF101, la cual muestra una alta eficiencia para el control biológico de *P. xylostella*, *Hyphantria cunea* y *P. rapae*.^{4,5}

En las tabla 4 se muestra la importancia a nivel mundial de los insectos plaga (Lepidópteros) de vegetales y en la tabla 5 se muestran los lepidópteros plaga que son

controlados con *B. thuringiensis* a nivel mundial,⁴⁶ en la que se reflejan los caminos mas adecuados para el control de los insectos plagas por *B. thuringiensis*. Esta graduación es a criterio personal de las impresiones de una encuesta. Los factores que Dennis Burges consideró altos en la graduación fueron: 1) la ocurrencia de la especie importante en un gran número de países, 2) gran importancia de una simple especie en un país grande y 3) la mención de un gran número de especies en un género. Para el grupo vegetal *Brassica*, fue mencionada una amplia resistencia de los insectos plaga al insecticida químico (diazinon).⁴⁶

Tabla 3.-Insecto blancos más importantes para Proteínas Cristal Insecticida (PsCI).*

Nombre Científico	Nombre Común	Planta Huésped Enfermedad
<i>Plutella xylostella</i>	Palomilla dorso de diamante	<i>Brassica</i> sp.
<i>Spodoptera</i> sp.	Gusano soldado	Polífago
<i>Heliothis virescens</i>	Gusano del fruto	Algodón
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Barrenador europeo del maíz	Maíz
<i>Trichoplusia ni</i>	Falso medidor	<i>Brassica</i> sp.
<i>Phthorimaea operculella</i>	Palomilla del tubérculo de la papa	Papa
<i>Leptinoptarsa decemlineata</i>	Escarabajo colorado	Papa
<i>Aedes</i> sp.	Mosquito	Fiebre amarilla
<i>Anopheles</i> sp.	Mosquito	Malaria
<i>Simuliidae</i>	Mosca negra	Oncocercosis

* Tomada de Bert Lambert y Marnix Peferoen, 1992.

Tabla 4.- Graduación de importancia a nivel mundial de los insectos lepidópteros plaga.

Grado de importancia	Género
1	<i>Plutella</i> (1)
2	<i>Spodoptera</i> (6)
3	<i>Heliothis</i> (3)
4	<i>Pieris</i> (2)
5	<i>Agrotis</i> (3), <i>Chilo</i> (1), <i>Crocidolomia</i> (1), <i>Mamestra</i> (2), <i>Ostrinia</i> (2), <i>Phthorimaea</i> , <i>Trichoplusia</i> (1).
6	<i>Autographa</i> (2), <i>Evergestis</i> (3), <i>Hellula</i> (3)
7	<i>Adoxophyes</i> (1), <i>Erias</i> (2), <i>Lacanobia</i> (1), <i>Manduca</i> (2), <i>Plusia</i> (3), <i>Sesamia</i> (2), <i>Syllepte</i> (1), <i>Yponomeuta</i> (2).

El número en el paréntesis se refiere a la cantidad de especies.

Tabla 5.- Lepidópteros plaga para ser controlados con *B. thuringiensis* a nivel mundial, en orden de importancia.

Países	Lepidópteros plaga considerados importantes
11	<i>Plutella xylostella</i>*
7	<i>Pieris rapae</i>*
5	(<i>Heliothis armigera</i>)*
4	<i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Pieris brassicae</i>* (<i>Ostrinia nubilalis</i>)*, <i>Spodoptera litura</i> , <i>Crocidolomia binotalis</i>*
3	<i>Mamestra brassicae</i> , (<i>Phthorimaea operculella</i>), <i>Trichoplusia ni</i>*
2	(<i>Adoxophyes orana</i>), <i>Agrotis ipsilon</i> , <i>A. segetum</i> , <i>Chilo agamenon</i> , (<i>Heliothis assulta</i>), (<i>H. zea</i>), (<i>Hellula undulatis</i>)*, <i>Hyphantria</i> <i>cunnea</i>* , <i>Lacanobia oleracea</i>* , <i>Manduca</i> <i>quinquemaculatus</i>* , <i>Sesamia cretica</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>Syllepte derogata</i> *, <i>Yponomeuta malinellus</i>*

Las especies en letras negritas son fácilmente controladas por productos de *B. thuringiensis* que contienen la cepa HD-1. Las especies altamente susceptibles se marcan con un asterisco y el paréntesis indica aquellas que se controlan por canasteado antes que penetren a las plantas, las cuales se han tratado previamente con *B. thuringiensis*.

El gusano cogollero del maíz es una plaga de diferentes cultivos en América Latina.^{152,289} Su control a base de productos químicos y liberación de insectos parásitos de huevo no ha sido del todo efectivo.^{245,282} Se estima que con un 58 % de daño, este insecto reduce los rendimientos en 1,148 Kg en parcelas con una densidad de 45,000 plantas por hectárea.¹⁹ Así como *H. virescens*, también constituye una plaga importante en México²⁹⁰ y en otros países.⁸⁵

Actualmente se conoce que *H. virescens* ha desarrollado una mayor resistencia a los insecticidas químicos tradicionales.²⁵⁸ Por otra parte, no todas las especies de insectos blanco son igualmente sensibles a la δ -endotoxina, por ejemplo, el gusano soldado es menos susceptible que *T. ni*.

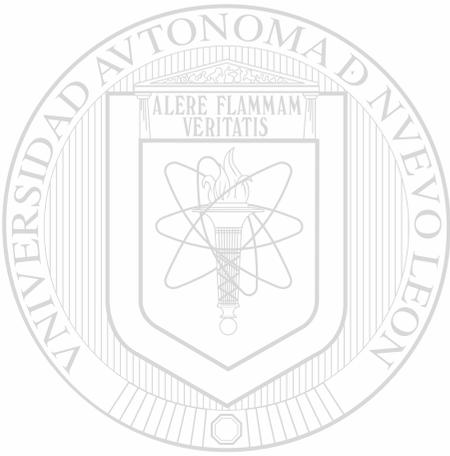
En la tabla 6 se muestran los diferentes tipos de cultivos afectados por *T. ni* y *H. virescens* susceptibles a ser controlados por *B. thuringiensis* en México.²⁷⁰ En la tabla 7 se muestran alrededor de 40 cultivos, en los cuales se ha autorizado utilizar productos plaguicidas de *B. thuringiensis* en México, así como la cantidad en gramos o su equivalente de ingrediente activo (I.A.) por Kg o litro. En los productos formulados, es importante señalar que el límite máximo residual (L.M.R.) es de exento y el intervalo de seguridad (días) es sin límite.⁷³

9.- Productos tradicionales y de nueva generación.

En la figura 1 se muestra el esquema de producción de un plaguicida de *B. thuringiensis*, los cuales se dividen en dos grandes grupos: 1) naturales o tradicionales, elaborados con cepas silvestres y 2) los de nueva generación; que se subdividen a su vez en dos clases: a) de primera generación, es decir, que se han obtenido de cepas que han sido modificadas por métodos naturales de movilización génica (conjugación y trasducción) y b) productos de segunda generación, o sea los productos de cepas que han sido construidas por métodos de ingeniería genética, por tecnología de ADN recombinante. Ejemplo de estos últimos es el bioinsecticida denominado MVP (marca comercial), el cual está basado en una bacteria modificada genéticamente (*Pseudomonas fluorescens*) que produce una δ -endotoxina derivada de *B. thuringiensis*. El primero de Marzo de 1990, MVP llega a ser el primer bioinsecticida desarrollado usando tecnología de ADN recombinante que recibe la aprobación

Tabla 6 .- Tipos de cultivos afectados por *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens* susceptibles de ser controlados por *B. thuringiensis*.

Insecto Lepidóptero Plaga	Nombre Común	Cultivo
<i>Trichoplusia ni</i>	Gusano falso medidor	Ajonjolí Algodón Brócoli Col Chicharo Chile Espinaca Fresa Melón Pepino Sandía Soya Jitomate Perejil Tabaco
<i>Heliothis virescens</i>	Gusano del fruto	Jitomate Garbanzo



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 7.- Cultivos en los cuales se a autorizado utilizar *B. thuringiensis* en México

Presentación	Equivalente en g. de I. A. / Kg. o litros	Uso autorizado
Aplicación al follage		
Granulado	3.20	Ajonjolí
Granulado polvo	53.00	Alfalfa
Humectable	16.06	Algodonero
Polvo humectable	16.08	Arboles forestales
Polvo humectable	32.00	Berenjena
Polvo humectable	93.60	Brócoli
Suspensión acuosa	8.40	Cacahuete
Suspensión acuosa	8.45	Calabaza
Suspensión acuosa	35.00	Cártamo
Suspensión acuosa	275.00	Caña de azúcar
		Chicharo
		Chile
		Cítricos
		Col de Bruselas
		Coliflor
		Espinaca
		Fresa
		Frijol
		Garbanzo
		Girasol
		Jitomate
		Lechuga
		Maíz
		Manzana
		Melón
		Nabo
		Naranja
		Ornamentales®
		Papa
		Pepino
		Perejil
		Piña
		Plátano
		Sandía
		Sorgo
		Soya
		Tabaco
		Tomate de cáscara
		Vid
Plantas formuladoras exclusivamente		
Polvo	1000.00	

Categoría toxicológica= IV , L. M. R. = Exento, Intervalo de seguridad(días)- sin límite

I.A.= Ingrediente activo, L. M. R.= Límite máximo de residuos(mg/g)

Datos tomados del Diario Oficial de la Federación, agosto de 1991.

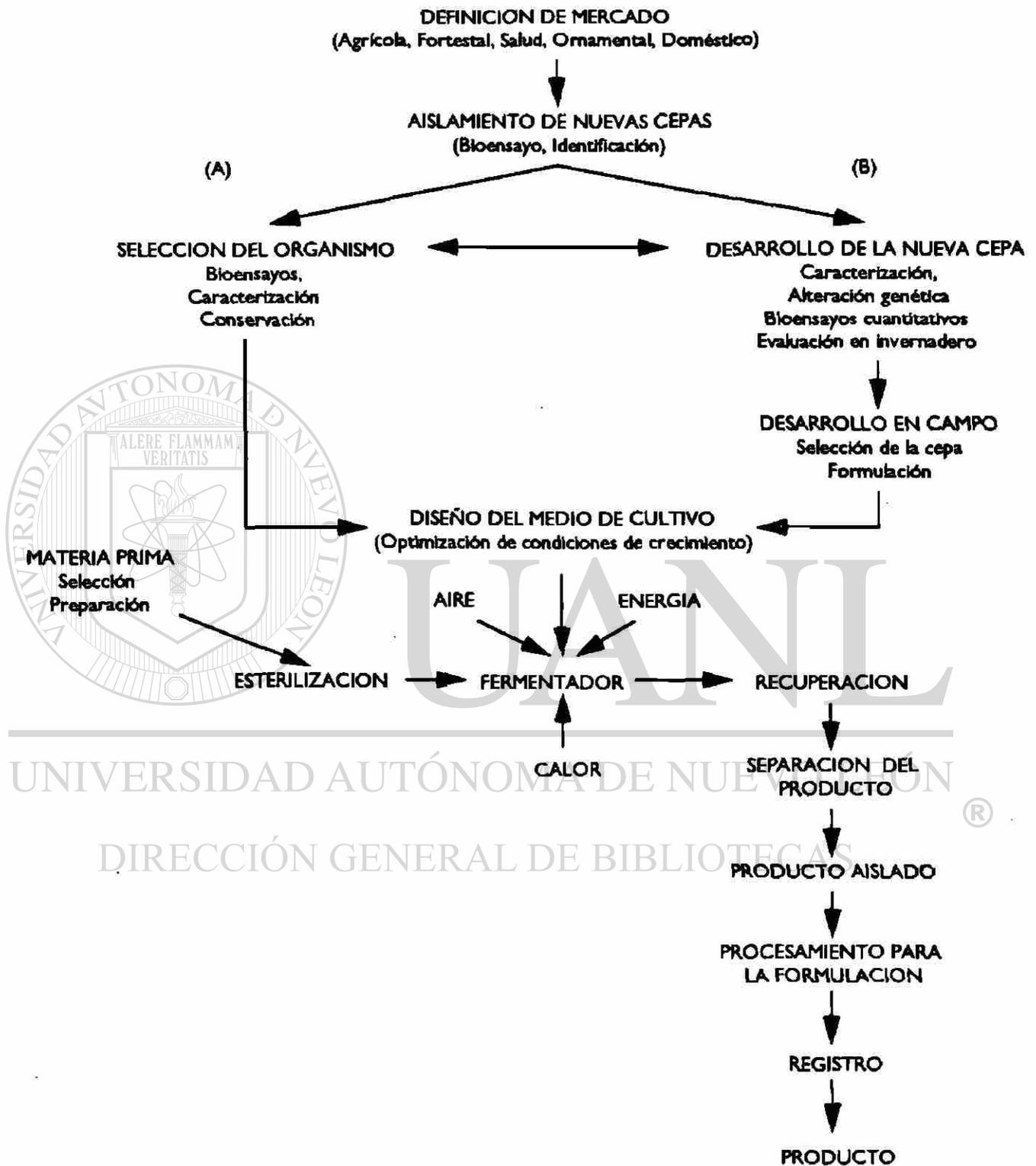


Figura 1.- Esquema de producción de un plaguicida natural o tradicional (A) y de nueva generación (B) de *B. thuringiensis*.

regulatoria para hacer pruebas de campo con agricultores. Sobresale por su actividad contra la palomilla dorso de diamante (*P. xylostella*). También mostró mejor actividad que los insecticidas químicos y biológicos probados contra *T. ni*, *Pieris rapae*, *Ostrinia nubilalis* y *Pseudoplusia includens*, y no causa efectos tóxicos en mamíferos, pájaros, peces e insectos benéficos.⁵¹

II.- MERCADO DE PRODUCTOS CON *B. thuringiensis*.

1.- Mercado mundial.

En 1980 los productos a base de *B. thuringiensis* alcanzaron una venta de 24 millones de dólares a nivel mundial.³⁵ Es un hecho que los agentes de control biológico (Bioinsecticidas) han alcanzado muy poca incursión dentro del mercado comercial de los plaguicidas. Tomando en cuenta el total de las ventas mundiales de plaguicidas, en las que la venta total de los agentes de control biológico se estimó en menos del 1 % y en donde *B. thuringiensis* alcanzó el 0.6 %.²⁶⁵ En la tabla 8 se muestra el mercado global en millones de dólares (Año 1990) de productos elaborados con *B. thuringiensis*, así como en la tabla 9 se muestra el crecimiento del mercado mundial para productos de *B. thuringiensis* hasta el año 2000.²⁶⁸

Tabla 8.- Mercado global en millones de dólares para productos de *B. thuringiensis*. (Año 1990).

Mercado	Millones de Dólares
América del Norte	57.2
Lejano Oriente	24.0
Medio Oriente/Africa	12.9
América del Sur y Centro	8.1
Australia	2.1
Europa Occidental	0.7
Total	105.0

Tabla 9.- Crecimiento del mercado para productos de *B. thuringiensis* en millones de dólares (Hasta el año 2,000).

Año	Valor	Año	Valor
1985	21.8	1993	154.2
1986	39.2	1994	171.0
1987	55.1	1995	189.3
1988	72.9	1996	204.8
1989	88.4	1997	220.0
1990	105.0	1998	238.2
1991	121.5	1999	255.1
1992	138.0	2000	271.9

Actualmente se producen 2,400 millones de toneladas de plaguicidas a nivel mundial,²⁵⁶ para los cuales, en 1988, el mercado mundial de productos fitosanitarios fue alrededor de 20,000 millones de dólares, de los cuales corresponde un 43.5 % para herbicidas, 30 % para insecticidas, 20.5 % para fungicidas y 6 % de productos diversos (hormonas reguladoras de crecimiento, etc.). Del total de ventas para este mercado se lograron vender 64 millones de dólares para los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis*.²⁶⁵ Es importante señalar que en 1989, se sembró en Estados Unidos un total de 28 millones de hectáreas de maíz (0.27 millones de Km²), para lo cual se utilizaron 9,090 toneladas de diversos productos químicos para el control de los insectos plagas en esta superficie,¹³⁵ razón que justifica más la búsqueda de nuevas cepas bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis*.¹³⁴

El algodón en las regiones sureñas y del oeste en E.U.A. fue cultivado en una superficie de 4,700 millones de hectáreas (0.045 millones de Km²), dejando en 1990 un valor estimado de 4,000 millones de dólares en ganancias. El daño por insectos causó pérdidas por 645 millones. Los lepidópteros son responsables de una pérdida

sustancial de esta última cantidad, principalmente por las especies de *Heliothis* (zea y *virescens*), a las cuales se les atribuyen pérdidas por 216 millones de dólares.²⁵¹ Otro es *Pectinophora gossypiella*, que causó un promedio de pérdidas menor de 71 millones de dólares. Para su control los agricultores utilizaron entre 5 y 8 tratamientos de insecticidas por sesión, lo cual nos brinda una oportunidad dentro de este mercado para nuevos productos de cepas de *B. thuringiensis* que contengan esta información genética.¹⁷⁷

Una alta prioridad para las compañías que trabajan en el desarrollo de nuevos productos es el preservar un medio ambiente sin contaminantes que ocasionen daños a los organismos que lo habitan, así como desarrollar sistemas nuevos de prácticas de manufacturas. Actualmente las compañías productoras de plaguicidas tratan de desarrollar concentrados activos, que sean más específicos para las plagas y no tóxicos al medio ambiente.²⁸⁷ En la tabla 10 se describe el total de las ventas de plaguicidas en E.U.A. y el tipo de éstos vendido en porciento, de un total de ventas de 7,300 millones de dólares.

Tabla 10.- Tipos de plaguicidas vendidos en E.U.A. (total:7,300 millones de dólares). Año 1990.

Tipo de plaguicida	Porciento (%)	(Miles de dólares)
Herbicidas	47	3,431
Insecticidas	16	1,168
Fungicida	6	438
Nematicida	2	146
Otros	29	2,117
Total.	100	7,300

Por otra parte, se ha calculado un mercado mundial de 200-300 millones de dólares para semillas de maíz modificadas genéticamente con *B. thuringiensis* que sean resistentes a los gusanos de raíz y, mucho más que esto, para semillas resistentes al gusano europeo barrenador del maíz, ya que los tipos de plaguicidas tradicionales no son efectivos para este insecto plaga. Se piensa que el maíz modificado genéticamente deberá ser consumido por ganado, más que por humanos.¹¹²

Las compañías de biotecnología agrícola en E.U.A. incrementaron sus gastos en investigación y desarrollo en un modesto 5 % del año fiscal 1990 - 1991 y acumularon 55,500 millones en investigación el año pasado, con un promedio de 5,600 millones de dólares gastados por cada una e invirtieron hasta 8 veces más en investigación que las grandes compañías de plaguicidas y semillas.^{298,299} Lo anterior nos indica un amplio futuro para el desarrollo de investigación y producción dentro del campo de los plaguicidas.

2.- Productos comerciales disponibles y compañías productoras.

En la tabla 11 se enumeran los principales productos comerciales basados en diferentes cepas de esta bacteria, los cuales se encuentran disponibles comercialmente a nivel mundial bajo diferentes nombres de productos y marcas comerciales. Asimismo, en la siguiente tabla 12 se muestran las diversas compañías que están actualmente desarrollando investigación y producción relacionada con *B. thuringiensis*.¹¹⁴

3.- Dosis de aplicación contra plagas agrícolas, forestales, mosquito y moscas negras.

Aplicaciones agrícolas: *B. thuringiensis* ha sido usado con éxito contra insectos que se alimentan de hojas. Las dosis recomendadas son de 0.28 a 2.2 Kg/ha (0.25 a 2 lbs x acre), en forma de polvos humectables.²⁷⁵

Aplicaciones forestales: Morris efectúa una extensa revisión en esta área y menciona que las preparaciones humectables de *B. thuringiensis* son efectivas contra los insectos plaga forestales, entre los cuales destaca la palomilla gitana,²²² así como otros de importancia forestal que fueron eficientemente controlados en Canadá.²³²

Aplicaciones en plantas ornamentales: *B. thuringiensis* también está registrado en los Estados Unidos contra 15 especies de lepidópteros y otras varias especies que dañan plantas ornamentales. En California, 124 formulaciones de *B. thuringiensis* son vendidas para uso agrícola y ornamental. Mucho de este material es usado para proteger los sistemas de jardines de las carreteras estatales (24 millones de dólares del presupuesto de 1976 a 1977 fueron usados para el control de plagas y otros mantenimientos) como parte de un programa de manejo integral de plagas.²⁷⁵

Aplicaciones contra mosquitos y mosca negra: *B. thuringiensis* var. *israelensis* ha mostrado ser altamente activo contra 72 especies de larvas de mosquitos y 22 especies de moscas negras. Los niveles de aplicación basados en polvos primarios y preparaciones de spora δ -endotoxina secas sin diluir, son utilizados en dosis de 1 Kg/ha para mosquitos y de 0.2 mg/l y para moscas negras.^{25,38,64,200}

Tabla 11.- Productos basados en *B. thuringiensis* disponibles comercialmente a nivel mundial

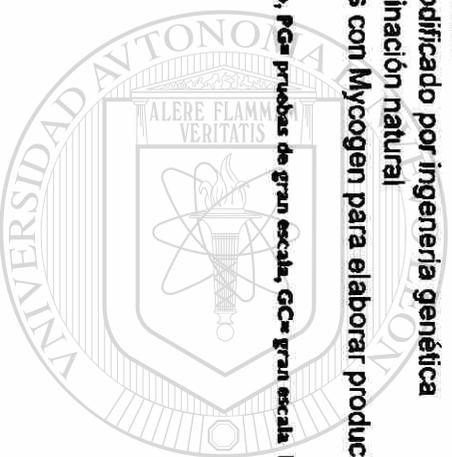
Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Huésped	Producto	Compañía Productora
<i>kurstaki</i>	Lepidóptero	Bactospeine Bactucide Beman <i>B. t.</i> Biobit Foray Dipel Delfin Javelin Thuricide Condor Cutlass Larvo <i>B. t.</i> Fermone <i>B. t.</i> MVP* Baturad Nubilacid	Duphar Compagnia di Ricerca Chim Bactec Novo Novo Abbott Sandoz Sandoz Sandoz Ecogen Ecogen Fermone Fermone Mycogen Radonja Radonja
<i>aizawai</i>	Lepidóptero	Certan	Sandoz
<i>israelensis</i>	Díptero	Bactimos Skeetal Teknar Vectobac Bactis Moskitocid	Duphar Novo Sandoz Abbott Compagnia di Ricerca Chim Radonja
<i>san diego</i>	Coleóptero	M-One M-One Plus*	Mycogen Mycogen
<i>tenebrionis</i>		Trident Novodor	Sandoz Novo
<i>conjugado</i>	Lepidóptero/ Coleóptero	Foil	Ecogen

* Modificado por ingeniería genética (células muertas) recombinantes encapsulados. Uso experimental permitido en 1990, con pendiente de registro.

Tabla 12.- Compañías involucradas con la investigación, desarrollo y producción de *B. thuringiensis* en E.U.A

COMPANÍA	ACTIVIDAD	ESTADO COMERCIAL DE <i>B. t.</i>	No. de PATENTES EN USA (desde el 1-1-88 al 31-12-91)
Abbott	<i>B. t.</i> no modificado	P	0
Agracetus/ W. R Grace	<i>B. t.</i> en plantas	L	0
Agricultural Genetics	<i>B. t.</i> no modificado	L	1
AgriGenetics	<i>B. t.</i> en plantas	PE-PC	0
Boehringer-Mannheim	Licenciador de tecnología de <i>B. t.</i>	P	4
Ciba-Geigy	<i>B. t.</i> no modificado, transconjugantes, <i>B. t.</i> en plantas	P	0
Crop Genetics Int'l	Organismos endofíticos que expresan la toxina de <i>B. t.</i>	PE-PC	0
Dupont	En convenio con Novo-Entotech	P	1
Ecogen	<i>B. t.</i> no modificado trasconjugante	P	2
ICI	<i>B. t.</i> no modificado	P	1
Kubota	Relacion con Mycogen en Asia	PE-PC	0
Mitsubishi/Plantech	<i>B. t.</i> en plantas	L	0
Monsanto	<i>B. t.</i> en plantas	E-PC	0
Mycogen	Celulas modificadas por ingeniería genética (muértaşas) "CellCap"	P	22
Novo-Entotech	<i>B. t.</i> no modificado., Mutagenesis clasica	GC-PC	1
Plant Genetic System	<i>B. t.</i> en plantas	PE-PC	0
Sandoz	<i>B. t.</i> no modificado por ingeniería genética y recombinación natural	PE-PC	1
Shell	Asociados con Mycogen para elaborar productos "CellCap"	PC-PC	0

Pm productores, L= laboratorio, P-C= pruebas de campo, P-Ga pruebas de gran escala, G-C= gran escala P-Er pequeña escala Tomado de Fekedon y col. (1992)



4.- Requisitos básicos para investigación y desarrollo de bioinsecticidas.

Por último, la selección de una cepa silvestre efectiva de un microorganismo entomopatógeno y la manipulación genética para mejorarla, junto con los requerimientos nutricionales de la misma, desempeñan un papel muy importante para el desarrollo de un insecticida microbiano. Entre los requerimientos básicos de investigación para el desarrollo de un insecticida microbiano, están los siguientes: a) insecto blanco (selección y producción masiva del insecto blanco), b) selección y mejoramiento de la cepa (selección efectiva del microorganismo y ensayos de efectividad del mismo, requerimientos nutricionales de la cepa y manipulación genética de la misma), c) efectividad (pruebas de laboratorio y campo del microorganismo), d) seguridad del microorganismo, e) efectos en el medio ambiente (del microorganismo contra insectos no blanco, ecología del microorganismo y checar la resistencia del microorganismo en insectos), f) producción masiva del microorganismo, g) formulación y control de calidad del insecticida microbiano formulado, o ensayo para medición de estabilidad de potencialidad) y h) tecnología de aplicación y racionalización de la aplicación contra medidas para cualquier problema causado por un insecticida microbiano.^{20,207}

III.- BIOTECNOLOGIA.

1.- Aplicación genética a *B. thuringiensis*.

La alta especificidad de la toxina producida por *B. thuringiensis* puede ser una desventaja cuando un cultivo es atacado por diferentes tipos de insectos. Esta limitante se puede contrarrestar de tres formas: a) mediante el aislamiento y la selección de cepas con amplio espectro de huéspedes, b) por la transferencia de genes entre diferentes cepas de *B. thuringiensis* para producir cepas con mayor espectro insecticida y c) transferencia de genes a otras especies.^{47,133}

La estabilidad de la δ -endotoxina en el medio ambiente es muy baja, ya que diversos factores ambientales, tales como la luz solar²⁰² y el contenido y tipos de taninos del follaje de los cultivos, actúan negativamente sobre ella.¹⁹⁸ Una de las posibles alternativas para incrementar la presencia de la toxina es la microencapsulación. Esto ha sido posible por la clonación del gen de esta proteína en *P. fluorescens* y la adición de un fijador químico al tanque de fermentación al final del proceso, que mata a la célula recombinante,³³¹ dándole a la toxina una cápsula biológica, y más recientemente, formulaciones de ingrediente activo encapsulado y microencapsulado sobre matrices de almidón de maíz.^{206,207,208}

Otro de los problemas que se pueden presentar para que la δ -endotoxina ejerza su actividad, es cuando ciertas plagas se encuentran inaccesibles a ésta. Por ejemplo, el caso del gusano europeo barrenador del maíz, el cual ataca el sistema vesicular de varios tipos de vegetales; o el caso de las plagas que destruyen los nódulos de las raíces de leguminosas.^{227,308} Estos problemas se han resuelto mediante la clonación del gen de la toxina en cepas de bacterias que colonizan y proliferan las raíces y la rizósfera de las leguminosas, tales como *Rhizobium* sp.²⁹¹ y *Pseudomonas* sp. En el caso del gusano barrenador, se han obtenido cepas transformadas de *Clavibacter xyli*, una bacteria natural del xilema del maíz. La larva del barrenador ingiere la cepa transformada y posteriormente muere.³¹⁵

Por lo que respecta al control de larvas de mosquitos de importancia médica, se ha demostrado que *B. thuringiensis* var. *israelensis* controla eficientemente a *Anopheles* sp. y *Culex* sp.¹²⁶ Sin embargo, las esporas-cristales se pierden del área de alimentación de la larva rápidamente por sedimentación. La clonación del gen de la δ -endotoxina de la variedad *israelensis* en Cianobacterias ha resultado ser una buena alternativa, ya que estos microorganismos crecen y proliferan en la superficie de hábitats acuáticos.^{225,308}

Otra opción para el control de insectos plaga ha sido la clonación del gen de la δ -endotoxina en virus pertenecientes a la familia *Baculoviridae*, los cuales infectan exclusivamente a artrópodos. Los virus transformados resultaron ser igualmente tóxicos que los cristales puros.²¹⁵

Una de las formas más ambiciosas para el control de los insectos plaga de importancia agrícola es, sin duda, la construcción de plantas transgénicas. La primera planta productora de PsCI (Tabaco) fue desarrollada por la Compañía Plant Genetic Systems de Bélgica.³²⁰ Actualmente otras plantas, tales como tabaco, algodón, tomate o papa, pueden ser protegidas contra insectos que causan grandes pérdidas económicas.^{50,141} Se espera que para mediados de los 90's se encuentren disponibles comercialmente las primeras plantas transgénicas.¹²⁵

Considerable investigación ha sido enfocada a 3 grandes áreas generales: la localización de los genes que codifica para la estructura de la proteína δ -endotoxina; la secuencia de bases de este gen y el mecanismo para controlar la expresión del gene de la proteína del cristal. Numerosos reportes han especificado que el gen estructural para el cristal en las variedades *thuringiensis*, *kurstaki* e *israelensis*, ha sido localizado

en un plásmido un simple reporte de localización del gen del cristal ubicado sobre cromosoma var. *kurstaki*,¹⁵⁰ sin embargo, estos autores también mencionan que genes idénticos o similares están asimismo presentes en un plásmido.

En la tabla 13 se muestran los tipos de genes de *B. thuringiensis* clasificados de acuerdo al tipo de proteína del cristal insecticida, su peso molecular y su rango de huésped.^{76,108,158}

2.- Medios de fermentación.

La producción de bioinsecticidas requiere del diseño de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento,¹⁴ esporulación y formación de la δ -endotoxina.^{111,214} A este respecto es importante conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo usado. La glucosa ha resultado ser la mejor fuente de carbono, sin embargo, también se han utilizado almidón, sacarosa y glicerol.²⁹²

Es esencial una fuente adecuada de nitrógeno para el crecimiento. La literatura reporta que el amonio es la fuente preferida de nitrógeno durante la fase exponencial de crecimiento, sin embargo, en la fase de esporulación el microorganismo muestra una preferencia por los aminoácidos.¹⁰⁰ En los medios comerciales usados se han empleado fuentes complejas de nitrógeno, tales como proteína de semilla de maíz, agua de cocimiento de maíz, harinas de pescado, semilla de algodón, etc. Los medios de fermentación son en ocasiones suplementados con extracto de levadura y/o peptona.⁹⁴ Dulmage, en 1981, reporta que la omisión de estos suplementos retarda la esporulación y reduce la producción de la δ -endotoxina. De la misma manera, Goldberg y col., (1980) observaron un marcado incremento en el crecimiento celular y en la producción de esporas, cuando adicionaron extracto de levadura a un medio de cultivo complejo.¹³³

Con respecto a los requerimientos de minerales, Nickerson y Bulla (1974), han enfatizado la importancia de Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} y Zn^{+2} , y en algunos casos Cu^{+2} y Fe^{+2} .²²⁹ Foda y col., (1985) encontraron que las cepas de *B. thuringiensis* var. *entomocidus* pueden sobrevivir y esporular con bajos niveles de aereación en presencia de altos niveles de glucosa, encontrando finalmente que su producción y toxicidad se ve afectada por la presencia de K_2HPO_4 .¹¹¹

Tabla 13.- Clasificación de las proteínas del cristal producido por *B. thuringiensis* de acuerdo a su organización protéica y rango de huésped *.

Tipo de Proteína	Peso Molecular (KDa)	Huésped
CryIA(a)	133.2	L
CryIA(b)	131.0	L
CryIA(c)	133.3	L
CryIB	138.0	L
CryIC	134.8	L
CryID	132.5	L
CryIF	133.2	L
CryIG	133.6	L
CryIIA	70.9	L
CryIIB	70.8	L-D
CryIIIA	73.1	C
CryIIIB	74.237	C
CryIIB2 ***	74.393	C
CryIIIC	129.4	C
CryIIID	73.3	C
CryIVA	134.4	D
CryIVB	127.8	D
CryIVC	77.8	D
CryIVD	72.4	D
CryV?	81.2	L-C
CryVA(a)**		N
CryVA(b)**		N
CryVIA**		N
CryVIB**		N
CytA	27.4	Citotóxica

* Adaptada de Hofte and Whiteley, 1989. El proceso molecular es dado a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica del primer gen reportado para cada una de las clases

L = Lepidópteros; C= Coleópteros; D= Dípteros; N= Nemátodos.

** El peso molecular no se ha reportado.

*** Donovan y col., 1992.

? Apareció después de Foltson y col., 1992.

En 1970, H.T. Dulmage menciona que para la producción del complejo espora- δ -endotoxina utilizó 12 variedades de *B. thuringiensis* propagadas en diversos medios de fermentación, obteniendo una gran variedad en la actividad tóxica medida por bioensayos de las preparaciones derivadas de los diferentes medios de cultivo. Señala también que la actividad de la δ -endotoxina no estaba de acuerdo con las cuentas de esporas o nivel del crecimiento. Concluye que la toxicidad de una preparación varía en función, tanto del medio de fermentación como de la cepa usada. En ese mismo año reportó el aislamiento de la cepa HD-1 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, la cual produce en fermentación altos niveles de δ -endotoxina en un medio que contiene (g/l): Dextrosa 5.0; extracto de levadura 2.0; K_2HPO_4 1.0; KH_2PO_4 1.0; y recomienda el uso de sustratos baratos como harina de semilla de algodón y harina de soya.^{82,83} Posteriormente, en 1971, recuperó complejos espora- δ -endotoxina de 16 aislados de *B. thuringiensis* var. *alesti* (serotipo 3a) y de 2 cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serotipo 3a 3b, cultivados en 3 diferentes medios de fermentación a base de sales minerales, utilizando distintas fuentes de carbono y nitrógeno, tales como triptona, proflo (harina de semilla de algodón), harina de soya, almidón de maíz, extracto de levadura y bactopectona. Demostró que la cantidad de δ -endotoxina producida por las diferentes cepas varía ampliamente en relación al serotipo y medio de cultivo.⁸⁰ Concluye que la actividad insecticida de la preparación final de *B. thuringiensis* no puede ser estimada por los serotipos usados, ya que algunas cepas del mismo serotipo produjeron distintas actividades insecticidas al cultivarse en diferentes medios.^{82,83,88,250}

Dulmage y De Barjac (1973), trabajaron con una cepa nueva de *B. thuringiensis* HD-187, identificada como serotipo H 5a5b, el cual produjo rendimientos altos de δ -endotoxina, muy superiores a los aislados anteriores, usando 3 diferentes medios de fermentación: B-4 que contiene harina de semilla de algodón al 1 %; B-4b al 2 % y B-8 al 2 % adicionado con líquido de remojo de maíz al 1 %. Todos ellos con peptona 0.2 %, glucosa 1.5 %, extracto de levadura 0.2 % y sales minerales, encontrando una actividad de $2,000 \times 10^8$ Unidades Internacionales (UI) y 2,000 mg/l de caldo cosechado. El producto presentó una potencia de alrededor de 200×10^3 UI/mg.⁸⁸

Scherrer y col., (1973) investigaron el efecto de la concentración de glucosa y la aereación en un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y sales, encontrando que la concentración de glucosa no afecta el tamaño de la espora ni el grado de toxicidad; sin embargo, sí afecta la longitud del cristal, el cual presentó una

longitud promedio de 0.2 a 0.5 m, cuando fue incrementada la glucosa de 0.1 a 0.6 %, ²⁸³

Goldberg y col., (1980) describieron un medio de fermentación para la producción de complejo espora δ -endotoxina de *B. thuringiensis* a escala piloto, con fermentadores de 500 l de capacidad y glucosa 30.0 g; peptona de soya 20.0 g; extracto de levadura 4.5 g; líquido de remojo de maíz 5.0 ml; KCl 3.0 g; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 3.0 g; H_2PO_4 7 ml; MgSO_4 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 36.0 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 13.5 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 7.5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 7.5 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 40.0 mg por cada 1,000 ml de agua destilada a 32 °C con aereación de 0.3 VVM, agitación de 120 a 160 r.p.m., pH 6.2 a 7.4 con una producción de 4×10^9 UFC/ml en 60 h de operación aproximadamente. ¹³⁹

Couch y Ross (1980), trabajaron con *B. thuringiensis* propagándola en diversos productos naturales como fuentes de nitrógeno, tales como harina de pescado, harina de semilla de algodón, líquido de remojo de maíz, harina de soya, levadura autolizada y caseína. Las fuentes de carbono incluyen productos de maíz hidrolizados, almidón y dextrosa, los cuales son adecuados para disminuir los costos de producción. ⁸⁵

Lüthy y Ebersold (1981), describieron un medio de cultivo más complejo basado en ingredientes baratos, con la siguiente composición: (g/l) harina de soya, 35.0; almidón de maíz, 12.0; extracto de malta, 2.0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.08; $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.08. El pH se ajustó a 7.2 y con menos de 48 h de incubación se obtuvo una total esporulación. ¹⁹⁶

Murga (1983), utilizó 14 diferentes medios de fermentación al propagar *B. thuringiensis* GM-1, variando la fuente de carbono en 8 medios con jugo de agave a 1°Brix (0.1 % y 0.2 %) y 6 medios con melaza de caña (2 %), variando la concentración de harina de soya, líquido de remojo de maíz, agua de cocimiento de levadura (ACL) CaCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. De los extractos finales de *B. thuringiensis* GM-1 se realizaron los bioensayos contra larvas neonatas de *T. ni* y *H. virescens*, encontrando que la formulación del medio de cultivo que contiene harina de soya, A.C.L. y sales, presentó la más alta actividad contra *T. ni* (32 %) y con el medio que contiene jugo de agave, harina de soya, A.C.L. y sales contra *H. virescens* un 28 % de mortalidad. ²²⁴

Salama y col., (1983) usaron diversos y variados subproductos industriales y agrícolas, tales como harina de semilla de algodón, harina de pescado, líquido de

remojo de maíz, levadura de forraje, sangre de res, subproductos secos de aves, suero de queso, líquido variable como un resultado de la centrifugación final del almidón de maíz, así como semillas de leguminosas: habas panosa, frijol de soya, garbanzo, habas, cacahuates y lentejas. Todo ello incorporado a un medio base de (g/l) glucosa 6.0 extracto de levadura 2.0; K_2HPO_4 , 4.3; $CaCO_3$, 2.0 y sales minerales, en una concentración del 2 %, para investigar su potencial en mantener la producción de los complejos espora δ -endotoxina en 2 subespecies de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *entomocidus*. La producción de esporas fue diferente de acuerdo a la variedad de *B. thuringiensis*. Mencionan que en las mezclas de estos productos con la levadura de forraje siempre resultan más altas las cuentas de esporas y productos finales para ambas variedades cuando se agrega sangre de res. Indican que estos subproductos también fueron eficientes en mantener la biosíntesis de δ -endotoxina con apreciable actividad insecticida contra *Heliophis armigera* y que las materias primas derivadas de leguminosas soportan altos rendimientos de espora. Finalmente describen que la subespecie *entomocidus* presentó una buena actividad contra *Spodoptera littoralis*.²⁷⁹

Dharmsthini y col., (1985) al procesar *B. thuringiensis*, diseñaron dos medios de cultivo con un subproducto hidrolizado a partir de una factoría de glutamato monosódico, para comparar la esporulación y toxicidad de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* en un fermentador de 3 l de capacidad, al ser probados contra larvas de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*, respectivamente. Los medios contienen un hidrolizado al 4 % y 7 % para *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*, respectivamente, suplementados con K_2HPO_4 , 0.05 %, obteniéndose una buena esporulación y toxicidad. El costo de estos medios de cultivo a partir de subproductos agroindustriales es bastante bajo, sugieren el uso de materiales baratos disponibles localmente para la producción de *B. thuringiensis*, entre los que podrían encontrarse extracto de malta, sangre seca de res, extracto de semillas de leguminosas, proteína animal, estiércol animal, agua de drenaje, subproductos agrícolas, etc. Se sugiere lo siguiente: 1) un medio de cultivo fácil de preparar, sin requerir pretratamiento de ninguno de sus constituyentes, 2) el medio de un buen crecimiento y toxicidad, y 3) que el costo del material para la fermentación sea bajo, al usar productos de la fermentación industrial.⁷²

Muchas subespecies de esta bacteria son capaces de usar las siguientes fuentes de carbono: glucosa, fructosa, almidón, maltosa, ribosa, glicerol, ácidos orgánicos, glutamato y aminoácidos. Sin embargo, se reporta que la ausencia de un carbohidrato metabolizable resulta con una esporulación generalmente no efectiva.¹²⁷

Poca información ha sido publicada en relación al efecto de la fuente de carbono sobre la velocidad de crecimiento o rendimiento. Arcas y col.¹³ trabajando con la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* reportaron un rendimiento de masa celular de 75 % para almidón o glicerol, comparada con glucosa, sacarosa o melaza de caña. Sin embargo, estos resultados no son específicos para otras producciones en medios de cultivo con *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* que usan melaza de caña o de remolacha,^{111,119,120} almidón,^{224,244} como fuente de carbono.

En 1988, Pearson y col. ensayaron diferentes medios de cultivo que inhiben la esporulación, mismos que fueron seleccionados para desarrollar sus inóculos, obteniendo una esporulación mayor del 98 % en 48 h de tiempo de fermentación para un proceso que involucra 2 pasos y un tiempo de producción de 48 h en un fermentador con 40 l. Produjeron 6.5×10^9 células viables/ml, 95 % de esporulación y encontraron buena correlación entre esporas y actividad bioinsecticida. Utilizaron matraces Erlenmeyer de 1 l conteniendo 100 y 200 ml de medio; de aquí pasaron a un fermentador New Brunswick de 14 l, con 10 l de medio de cultivo. La espuma fue controlada adicionando al inicio de la fermentación de 20-30 ml de una emulsión acuosa diluida en 1:10 de propilenglicol antes de esterilizar. El fermentador de 75 l contenía 40 l de medio de cultivo. La espuma fue controlada con Silicopse 5000 durante la fermentación. Para ambos fermentadores se usó temperatura de 30°C, agitación 400 r.p.m. y 1 VVM. Finalmente se determinaron células vegetativas, células esporuladas y esporas libres a través de muestras que se diluyeron 1:5 en una solución estéril, efectuándose 3 determinaciones con un microscopio de contraste de fases.²⁴³

En las especies de *Bacillus* sp. es necesario que los mecanismos de síntesis de proteasas se activen para lograr una buena esporulación,¹⁶ de lo anterior, resulta interesante mencionar que los medios de cultivos para las diferentes cepas de *B. thuringiensis* y sus variedades, presentan en común requerimientos nutricionales de cuando menos un ingrediente de composición química compleja,³²⁷ con la ventaja de un costo barato, así como la influencia de iones en los medios de cultivo para algunas cepas es determinante. La melaza de caña como fuente de carbono reúne los anteriores requisitos a excepción de que la cantidad de impurezas puede variar para cada lote.¹⁹⁴ Por otra parte, los requerimientos de oxígeno varían ampliamente para cada cepa en particular, así como la toxicidad reportada por cada lote fermentado. Lo anterior nos motiva más a implementar una mejor forma de optimización de las condiciones de producción (agitación-aereación) primordialmente en base a la

toxicidad generada en los extractos de fermentación producidos para las cepas seleccionadas para un medio de cultivo en particular.

3.- Parámetros de fermentación y condiciones de crecimiento.

B. thuringiensis es una bacteria quimioheterotrófica, oxidante aeróbicamente de carbohidratos a ácidos orgánicos, los cuales son finalmente oxidados a dióxido de carbono. Esta bacteria posee un metabolismo complejo, de inicialmente emplea la Vía Emden Meyerhoff-Parnas (EMP), convergiendo en un ciclo del ácido tricarbóxico modificado (TCA) cuando comienza la esporulación constituida por las fases siguientes.^{113,197}

a) Fase de crecimiento exponencial.

El catabolismo de azúcares simples ocurre de un 93 al 100 % por la vía EMP y del 0 al 0.7 % por la Vía de Pentosa Fosfatos.¹⁹⁷ Como metabolitos primarios intermediarios se forma piruvato, acetato y poli-β-hidroxibutirato (PHB), principalmente los 2 últimos. Niveles bajos de amilasa son formados durante la fase media logarítmica de crecimiento. La cantidad formada depende marcadamente de la variedad de la bacteria, sin embargo, es independiente de la concentración de glucosa y almidón para la cepa HD-1 var. *kurstaki*. La enzima tiene un pH óptimo de 6 y requiere calcio y manganeso. Ambos iones son necesarios para una máxima actividad.³¹¹ El nitrógeno es asimilado como amonio o aminoácido, los cuales son transaminados o desaminados para producir aminoácidos requeridos por la célula. Durante la fase de crecimiento exponencial, la formación de exoproteasas es normalmente reprimida por la presencia de ión amonio;¹⁰⁰ si está presente en muy bajas concentraciones, la producción de exoproteasas es estimulada por glutamato, aspartato, etc., y reprimida por valina, leucina, etc.. Una mezcla de aminoácidos suprime la formación de exoproteasas.¹⁰⁰ El efecto del oxígeno⁹⁹ y el gramicidin D²⁸¹ sobre la actividad exoproteasa ha sido reportada.

Existen pocos reportes en la literatura relacionados con la velocidad de crecimiento específico y los parámetros de rendimiento,^{157,277} y en particular, para *B. thuringiensis* en medios de cultivo complejos. Holmberg y col.¹⁵⁷ encontraron los siguientes parámetros para *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*: velocidad de crecimiento específica de 1.3 a 1.4 Hr⁻¹. Por otra parte, Sakharova y col. reportan una secuencia poliaúxica de sustrato utilizado para *B. thuringiensis* var. *galleriae* en un medio

complejo, medio limitado de glucosa.²⁷⁷ Estos resultados muestran una alta velocidad de crecimiento inicial ($\mu = 1.4 \text{ Hr}^{-1}$) a expensas de extracto de levadura, seguido por un crecimiento lento marcado sobre glucosa.

b) Fase de transición.

A mitad de la fase logarítmica cuando los azúcares simples del medio de cultivo son consumidos en un 50 %, las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico son formadas para facilitar la represión del catabolismo.¹¹³

B. thuringiensis var. *thuringiensis* no posee el ciclo completo del ácido tricarboxílico, siendo que está desprovista de la deshidrogenasa de α -ceto-glutarato. Aronson y col.¹⁷ demostraron que este organismo usa la vía del ácido γ -aminobutírico (GAB). De acuerdo a esto el γ -aminobutírico y succinato deberán ser acumulados.¹⁹⁷

Durante la fase de transición, el acetato, piruvato y PHB son catabolizados vía el ciclo modificado del ácido tricarboxílico (TCA). Así cuando decrece lentamente la actividad de la vía EMP, la velocidad de catabolismo de estos ácidos orgánicos es marcadamente baja, sin embargo, existen cantidades significativas de aminoácidos presentes en el medio de cultivo,¹⁰⁰ aminoácidos, tales como glutamato, aspartato y alanina, estos son catabolizados actuando como fuentes de carbono y nitrógeno. Por otra parte, se sabe que la velocidad de producción de γ -aminobutírico a glutamato se incrementa marcadamente durante la fase temprana de esporulación.¹⁷ Finalmente, después de que los ácidos orgánicos han sido utilizados, empieza una fuerte producción de exoproteasas.²⁷⁴

c) Fase de esporulación.

Cerca de 3 h después de haber empezado la fase estacionaria (entre los estadios segundo y tercero de la esporulación), empieza la formación de cristales paraesporales.⁹ Casi al mismo tiempo, las membranas de la forespora son completadas y la producción de exoproteasas decrece marcadamente. La completa síntesis de la endotoxina precede a la maduración de la espora por cerca de 2 h.^{173,174,175,191}

Durante la formación del cristal y la espora, el metabolismo está basado primeramente en el uso de aminoácidos derivados del rompimiento de las proteínas

del medio de cultivo y la célula.³³⁷ Estos son usados para la síntesis de proteínas o como fuentes de energía y carbono.²²³ Datos hoy conocidos tienden a implicar que las proteínas de la espora se derivan de la hidrólisis de proteína de la célula vegetativa, mientras que las proteínas del cristal se deben a la incorporación de aminoácidos tomados del medio de cultivo. Una vez alcanzada la madurez, la masa de la espora es de al menos el 15 % de la masa celular vegetativa previamente formada y el cristal es de cerca del 12.5 al 17 % de la misma masa de célula vegetativa.²²³ Una buena producción es de 5 a 10 x 10⁹ esporas/ml.¹⁹⁷

d) Condiciones de crecimiento, esporulación y formación de cristal.

Los rangos de temperatura de crecimiento para *B. thuringiensis* están entre 20 a 42 °C; sin embargo, el crecimiento en este último rango de temperatura generalmente resulta de la pérdida de la δ -endotoxina.¹⁶⁰ La producción óptima de la δ -endotoxina ocurre a 28 y 32 °C, con un crecimiento lento a 28 °C. La temperatura normal de fermentación es de 30 °C. El crecimiento ocurre en un nivel de pH entre 5.6 a 8.5, el pH inicial usual es de 6.8 a 7.2 y el típico descenso a 5.8 se debe a la expulsión de acetato y a la elevación de pH a 7.5 es cuando éste es consumido.⁹⁴

Para el crecimiento se requiere el oxígeno.¹⁶⁴ Asimismo el nitrato es capaz de actuar también como un aceptor de electrones durante la fase de crecimiento vegetativa. El rendimiento celular basado en oxígeno, es de 5.6 x 10⁵ células/g de oxígeno.¹¹⁵ Un requerimiento de oxígeno de cerca del 30 % es usado en la fase logarítmica que fue observada durante la transición y esporulación. Lo anterior entra en contradicción con lo aseverado por Lüthy y col.¹⁹⁷ Esta activación del ciclo del ácido tricarbóxico con lento crecimiento vegetativo va acompañado de un incremento en el consumo de oxígeno. Holmberg y col. reportaron ausencia de algún efecto sobre la velocidad de crecimiento y Yx/s para las velocidades de aereación de 0.1 a 1 VVM en escala de 8 l; sin embargo, a una escala de 1,000 l la velocidad de crecimiento específica fue reducida de 1.4 Hr⁻¹ a 0.95 Hr⁻¹, mientras que el Yx/s se incrementó lentamente, indicando limitaciones de oxígeno en el crecimiento.¹⁵⁷ Finalmente, el oxígeno es requerido para el crecimiento. Algunos autores han mencionado que altas velocidades de aereación son esenciales para la formación de espora y toxina.^{94,197,339}

En los procesos de oxidación incompleta, uno de los aspectos más críticos es la transferencia de oxígeno al caldo de fermentación, debido principalmente a la baja solubilidad de oxígeno en agua (aproximadamente 7 ppm a 1 atm). Por ejemplo, se

requieren 192 g de O_2 para la oxidación completa de 180 g de glucosa, sin embargo, el oxígeno es aproximadamente 6000 veces menos soluble en agua que la glucosa.³⁰²

La demanda de oxígeno de un proceso de fermentación se satisface normalmente mediante aereación y agitación del caldo de fermentación.^{171,192} Sin embargo, la productividad de la mayoría de las fermentaciones está limitada por la disponibilidad de oxígeno. A la fecha, muy poco ha sido publicado en la literatura con respecto a los rendimientos, parámetros cinéticos y factores operacionales de los procesos de fermentación de *B. thuringiensis*.^{83,86,211,213,270}

e) Agitación y aereación.

En un cultivo aereado, la velocidad de transferencia de oxígeno al caldo de fermentación debe ser al menos igual a la demanda de oxígeno del microorganismo. Por lo tanto, un caldo de fermentación es considerado adecuadamente aereado solo si el suministro de oxígeno es mayor que la demanda.^{37,171}

En un fermentador agitado convencional, la agitación tiene las siguientes funciones básicas:^{36,230} a) asegurar homogeneidad del cultivo a través de macromezclado, b) promover transferencia de masa interfacial por medio de micromezclado, c) proveer un área superficial grande para la transferencia de masa, d) promover la transferencia de calor. Estas funciones requieren de gasto de energía mecánica, la cual es suministrada por el movimiento de uno o varios impulsores. Esta energía eventualmente es disipada como calor. El impulsor más usado en procesos de fermentación y operaciones de contacto gas-líquido es la turbina "Rushton",^{217,329} ya que produce los valores de K_L más altos y simultáneamente proporciona altas velocidades de corte o turbulencia.³²⁸

4.- Escalamiento de un proceso de fermentación para *B. thuringiensis*.

Al escalamiento se le define como el conjunto de técnicas y métodos empleados para transferir a una escala mayor o menor a un proceso de fermentación, con el objetivo de tratar de determinar la factibilidad económica de un proceso industrial a través de un conjunto de valores técnicos y de operación que se obtienen durante el mismo. El escalamiento a una escala mayor se conoce como ascendente y a una menor escala como descendente. El escalamiento es un trabajo interdisciplinario que

requiere el uso combinado e integrado de métodos y principios de ingeniería química, bioquímica, microbiología y genética.^{31,110,182,165,263}

El problema del paso de una escala a otra (escalamiento) es uno de los de mayor importancia no solo en fermentación, sino en la industria en general. A continuación se describen los diferentes criterios de escalamiento en tanques geoméricamente similares, con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > a 10^4$ NP = constante).²⁶⁴

- a).- Potencia por unidad de volumen constante.
- b).- Flujo proveniente del impulsor por unidad de volumen constante.
- c).- Velocidad tangencial constante.
- d).- N_{Re} similar.
- e).- Tiempos de mezclados iguales.
- f).- K_L constante.
- g).- K_{La} constante.

En la práctica es difícil mantener la geometría similar para realizar un escalamiento basado en métodos de análisis dimensional. Oldshue,²³⁸ ha demostrado la ventaja de escalar sin obedecer a la similitud geométrica, aunque la dificultad reside en la carencia de información sobre dicho cambio.

Aiba y col. sostienen que se puede utilizar como criterio K_L constante, sin embargo, al parecer no es una buena elección, por lo menos para el valor de $\alpha = 0.6$. Lo mismo se puede decir de Q/V , puesto que, al cambiar de escala, el valor de P/V aumenta en vez de disminuir.¹

Los mejores criterios para pasar de una escala a otra son, al parecer P/V constante o K_{La} constante.^{264,332} Conviene señalar que si se mantiene la similitud geométrica, es imposible escalar siguiendo más de un criterio.²⁶⁴

Quintero, 1990, muestra diferentes ejemplos de escalamiento utilizando como criterio la velocidad volumétrica de referencia (constante) para tanques con y sin similitud geométrica. Cuando es necesario o deseable mantener iguales volumen de aire por volumen de líquido por minuto, ocurre que la velocidad lineal del aire a través del tanque aumenta en proporción directa al diámetro. Sin embargo, si el porcentaje

del oxígeno absorbido es pequeño en la escala pequeña, es posible disminuir el volumen de aire/volumen de líquido/minuto (VVM), aumentando la eficiencia de absorción. Lo anterior se logra aumentando el valor de K_{La} .²⁶⁴

5.- Recuperación del bioinsecticida.

Un método clásico para obtener concentraciones estables y secas del complejo espora-cristal en el laboratorio fue la liofilización, pero frecuentemente se tenían pérdidas significativas de esporas y cristales, así como su considerable aglomeramiento del complejo. Un método satisfactorio para obtener materiales liofilizados involucra la utilización de suspensiones de lactosa con el complejo. Sin embargo, la liofilización no fue ampliamente aceptada debido al gran volumen del líquido involucrado, que hizo al proceso más costoso.^{29,327} Entre otros objetivos importantes está el de preservar el producto durante un almacenamiento prolongado. El proceso de deshidratación cumple bien este objetivo, reduciendo el total de humedad del producto a niveles adecuados, suficientes para limitar el crecimiento de otros organismos, así como evitar otras reacciones. Otro objetivo de la deshidratación es la significativa reducción del volumen del producto, el cual aumenta la eficiencia en el transporte y prolonga el almacenamiento del mismo.²⁰

Un solvente bueno es la acetona como agente precipitante de proteínas, la cual fue utilizada para producir células vegetativas y esporas de concentrados acuosos, resultando un sustituto; no obstante, el producto fue después apelmazado y difícil de resuspender. Por lo tanto, se intentó modificar el proceso de precipitación de acetona para hacerlo más adecuado a la recuperación del complejo espora-cristal de *B. thuringiensis*, utilizándose lactosa. El apelmazamiento fue reducido suspendiendo el complejo concentrado en soluciones de lactosa y precipitando la lactosa conjunto con el complejo espora-cristal. El precipitado fue recuperado fácilmente como una preparación seca y estable y sin presentar dificultad para resuspenderlo finalmente en agua.^{80,81} Este proceso de precipitación lactosa-acetona es utilizado en recuperación a niveles grandes (piloto o industrial), por el costo del gran volumen de acetona. Una solución a este problema se da mediante la utilización de un método que consiste en dos etapas: una por medio de una separación mecánica, como centrifugación y la segunda mediante un proceso térmico a temperaturas altas, como es el secado por aspersion. Este secado fue adaptado a fluidos con una más alta cantidad de humedad y sensibles al calor. Dentro de las ventajas que ofrece el secado por aspersion están su rápido ciclo de secado, el corto tiempo de retención del producto dentro de la

cámara de secado y el hecho de que el producto final es fácil de envasar. El tiempo de retención es bajo alrededor de 3-10 segundos y la partícula del producto nunca puede alcanzar una temperatura más alta que la temperatura del bulbo húmedo del aire usado para secar. La anterior situación permite el uso de altas temperaturas sin causar daño al producto.^{122,211,321,327}

6.- Bioensayos y estandarización.

Estudios relacionados a la búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* que ofrezcan un rango más amplio de aplicación se realizan en diversas partes del mundo. Con el objetivo de incrementar la toxicidad de cepas nuevas y las ya existentes, es importante reconsiderar el estado actual de la estandarización de los productos, así como de los diferentes métodos que se utilizan en la evaluación. Los estudios sobre estandarización de productos elaborados a base de *B. thuringiensis* surgieron como una necesidad industrial y fueron desarrollados antes de que los estudios sobre las toxinas de *B. thuringiensis* estuvieran completos.

Los primeros trabajos para medir la toxicidad de formulados a base de *B. thuringiensis* se basaban en el conteo de esporas, suponiendo erróneamente que la cantidad de la δ -endotoxina era directamente proporcional al número de esporas, por lo que las potencias de las formulaciones eran medidas por conteo en placa. En 1958, Bonnefoi y Burgerjon propusieron que las potencias de las formulaciones de *B. thuringiensis* debían ser estandarizadas por medio de bioensayos y expresadas en "unidades biológicas" en comparación con un estándar. Su concepto era válido, sin embargo, no existía ningún material disponible que estuviera universalmente aceptado como un "estándar", ni tampoco un método definido para comparar las actividades determinadas en diferentes laboratorios.^{79,87,98,99}

En la División de Investigación de Entomología del Departamento de Agricultura de los E.U.A., los bioensayos se habían estado realizando de una forma rutinaria y siguiendo una metodología propia. En 1971, representantes de cuatro laboratorios independientes, que incluían a tres compañías productoras de bioinsecticidas (International Minerals and Chemical Corporation, Nutrilite Products, Inc., Agricultural and Veterinary Products Division, Abbot Laboratories), así como ese laboratorio del Departamento de Agricultura de E.U.A., acordaron establecer la metodología utilizada por H.T. Dulmage como método oficial para evaluar formulaciones.^{81,84} Sin embargo, esta propuesta no omite el uso de otros procedimientos o insectos en otros

laboratorios, pero ofrece una base común para la estandarización de materiales comerciales y experimentales, así como para la investigación de otros métodos a ensayar. H.T. Dulmage aisló en 1970 la cepa HD-1 perteneciente a *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, el cual demostró tener una alta actividad insecticida y, al compararla con el estándar internacional propuesto hasta entonces (E-61) y con otras 2 preparaciones comerciales, resultó considerablemente más tóxica.⁷⁹

En Mayo de 1972 se llevó a cabo otra reunión en Brownsville, Texas, E.U.A para discutir la adopción de un estándar primario de referencia y utilizarlo en la estandarización de formulaciones con *B. thuringiensis*. Estuvieron presentes representantes de las diferentes compañías y del Departamento de Agricultura y la División de Regulación de Plaguicidas de la EPA (Agencia de Protección Ambiental). En esta reunión se estableció HD-1-S-1971 como estándar primario de referencia, con una potencia de 18,000 UI/mg en base al estándar internacional E-61.⁸⁷ Ambos, el estándar HD-1-S-1971 y el método de bioensayo propuesto en 1970, fueron aceptados oficialmente por la Agencia de Protección Ambiental para medir la potencia de todas las formulaciones comerciales.

Casi 10 años después de que el estándar HD-1-S-1971 fue adoptado y utilizado para evaluar productos a base de *B. thuringiensis* en E.U.A., el abastecimiento de éste había caído a un nivel tal que era necesario el desarrollo de un nuevo estándar, además de que se consideraba que el estándar HD-1-S-1971 no era homólogo con la cepa normal HD-1 en cuanto a su actividad hacia *H. virescens*. Fue entonces que al igual que para el primer estándar, se realizaron bioensayos en cinco laboratorios diferentes, adoptándose un nuevo estándar denominado HD-1-S-1980, con 16,000 UI.^{27,82} A partir de 1980 se han realizado infructuosos esfuerzos por encontrar cepas con mayor potencial que las ya existentes,¹²² utilizando los bioensayos como método de determinación de toxicidad. Es importante reconocer que en la práctica actual, en un programa de búsqueda de cepas es necesario examinar el rango o espectro de actividad de tantos aislados de *B. thuringiensis* como sea posible, antes de decidir cuál aislado deberá ser mantenido para estudios más intensos.⁹⁶

Trabajos recientes analizan la toxicidad de la cepa HD-1 y otra cepa de la misma variedad *kurstaki* NRD-12, así como el estándar HD-1-S-1980 contra lepidópteros defoliadores. Estos estudios sugieren que la disminución en toxicidad del estándar puede deberse en parte a la poca solubilidad de las proteínas del cristal en sistemas alcalinos.³²⁴

Los principales países productores de *B. thuringiensis* utilizan bioensayos para asegurar la calidad constante de sus productos. De una forma u otra ellos usan un análisis de regresión lineal "Probit" para determinar la DL_{50} de la muestra hacia un insecto prueba y del estándar de referencia usado en cada ensayo.

Las dificultades en cuanto a la escala internacional se despertaron debido a que se considera que las "Unidades Internacionales" francesas y americanas no son comparables, puesto que los dos estándares no son serotípicamente homogéneos y muestran diferente espectro de actividad.⁴³ En Estados Unidos se decidió que el estándar nacional debería ser preparado con la cepa HD-1, la cual debería proceder del mismo cultivo de *B. thuringiensis* usado en fermentaciones industriales.

IV.- BIOSEGURIDAD Y ECOLOGIA DE *B. thuringiensis*.

1.- Normas establecidas en México.

En la tabla 14 se muestra la clasificación en México, de los plaguicidas según su peligrosidad, datos que fueron tomados del Diario Oficial de la Federación de México, publicado en Agosto de 1991,⁷³ en donde se señala que los productos de *B. thuringiensis* son clasificados como de tipo IV.

2.- Distribución y frecuencia de *B. thuringiensis*.

Esta bacteria es de una amplia distribución y alta frecuencia de recuperación, la cual ha sido aislada a partir de muestras de suelo,^{70,236,253,313} granos almacenados,^{120,210} insectos,^{95,260} así como sitios de alimentación de insectos.^{20,200}

En 1989, Martin y col. encuentran que *B. thuringiensis* es un microorganismo ubicado en suelo, usando muestras de suelo,²⁰² las cuales fueron seleccionadas por el método con acetato, aislaron *B. thuringiensis* en 785 muestras, de un total de 115 analizadas. Estas muestras fueron obtenidas tanto en Estados Unidos como en otros 29 países. Un total de 48 % de los aislados de *B. thuringiensis* (8,916 aislados) fueron colocados por pruebas bioquímicas para variedades conocidas, mientras que el 52 % fueron para tipos de *B. thuringiensis* descritos. Cerca del 60 % (1052 aislados) de los aislados fueron probados en su toxicidad contra insectos de las órdenes lepidópteros y dípteros. Las muestras de suelo fueron colectadas de varios hábitats, incluyendo aquellos con diferentes números de insectos. La presencia de insectos no predice la

Tabla 4.- Clasificación de los plaguicidas según su peligrosidad en México. **

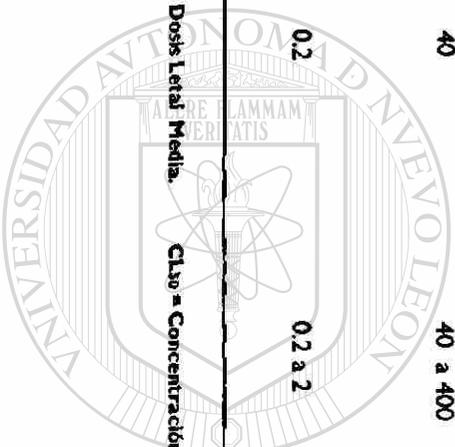
Categorías	I Extremadamente Tóxico		II Altamente Tóxico		III Moderadamente Tóxico		IV Ligeramente Tóxico	
	DL50 mg / masa corporal	Clasificación	DL50	Clasificación	DL50	Clasificación	DL50	Clasificación
AGUADA	5	ESTADO	5 a 50	ESTADO	50 a 500	ESTADO	500	
ORAL	20	ESTADO	200	ESTADO	200 a 2,000	ESTADO	2,000	
AGUADA	10	ESTADO	10 a 100	ESTADO	100 a 1,000	ESTADO	1,000	
ORAL	40	ESTADO	40 a 400	ESTADO	400 a 4,000	ESTADO	4,000	
Clasificación por Inhalación mg/l Exposición : 1 h	0.2	ESTADO	0.2 a 2	ESTADO	2 a 20	ESTADO	20	

* Máxima sustancia de hasta (m.s).

DL50 = Dosis Letal Media.

CL50 = Concentración Letal Media.

** De acuerdo al Diario Oficial de la Federación. 1991.



UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

presencia de *B. thuringiensis* en una muestra de suelo particular. *B. thuringiensis* fue más abundante en muestras de Asia. Las pruebas bioquímicas utilizadas para los biotipos de *B. thuringiensis* fueron: utilización de escualina, producción de ácido de salicina y sacarosa y producción de lecitinasa, de acuerdo al método descrito por Martin y col., 1985.²⁰¹

En 1990, Ohba y col. estudiaron la distribución geográfica de *B. thuringiensis* en el suelo de Japón. Ellos obtuvieron 20 aislados que demuestran actividad tóxica específica contra mosquitos.^{236,237} De estos aislados, 7 fueron serotificados como subsp. *kyushuensis* serotipo flagelar H 11a: 11c, y los otros permanecieron sin tipificación. Las muestras de las bacterias usadas en su estudio fueron 13, obtenidas de 2 muestras de suelo con suspensiones de cultivos esporulados (10^8 esporas/ml).²³⁴ En contraste con las subespecies del serotipo 3, que son tóxicas para lepidópteros, estos aislados mostraron toxicidad específica contra mosquitos, lo que reveló la ocurrencia de patotipos diferentes en este serotipo. Sin embargo, la subespecie 11a: 11c mostraron que son de 10 a 100 veces menos tóxicas que las otras cepas reportadas para mosquitos.²³⁴

3.- Control de calidad y registro.

Entre los datos mas importantes que hay que conocer para efectuar un registro de una cepa ante la Agencia de Protección Ambiental (EPA), Diciembre de 1988,¹³¹ están los siguientes:

- a).- Datos morfológicos y bioquímicos.
- b).- Análisis del serotipo en base a antígenos flagelares.
- c).- Historia de la cepa.
- d).- Patrones resistencia antibióticos.
- e).- Descripción de las toxinas insecticidas producidas.
- f).- Perfiles plásmidos.
- g).- Descripción morfológica del cristal-proteínico.
- h).- Bioensayos para un nivel de insectos.
- i).- Prueba en ratones de toxicidad intraperitoneal para β -exotoxina.

4.- Bioseguridad y ecología.

Han pasado poco más de tres décadas desde que se empezaron a utilizar las primeras preparaciones comerciales de *B. thuringiensis*,¹⁰⁴ y a la fecha, la bioseguridad

es una de las ventajas principales que estos insecticidas microbianos ofrecen en relación a los insecticidas químicos. Diversas razones, entre las que destacan especificidad, virulencia y potencia contra insectos blanco, han convertido a esta bacteria en uno de los candidatos mas atractivos para el desarrollo comercial.²⁹⁸

Por muchos años los requerimientos regulatorios para uso de plaguicidas microbianos estuvieron basados en antecedentes y estándares de plaguicidas sintetizados químicamente. Sin embargo, hoy en día en Norteamérica, los requerimientos para registro de productos, incluyen características distintivas de los microorganismos. Desde una perspectiva de bioseguridad para el ambiente y organismos no-blanco, los plaguicidas de elección son los microbianos, pero el éxito comercial de estos productos no ha manifestado su extenso potencial debido en parte al reducido espectro de actividad, corto período de vida en el campo, además de una lenta actividad contra los insectos blanco. Las estrategias actualmente utilizadas para alcanzar el mayor potencial de estos productos involucran el desarrollo de formulaciones ambientalmente mas estables, aislamiento de cepas mas potentes, así como el uso de técnicas clásicas y modernas de manipulación genética para obtener productos comercialmente más competitivos.³⁰

El registro de un plaguicida biológico implica la posibilidad de un amplio uso comercial y, por tanto, su distribución masiva en el ambiente. Por lo anterior, para las autoridades regulatorias como la (EPA), a través de (FIFRA) Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas en Estados Unidos, es prioridad el considerar los posibles impactos del plaguicida sobre la salud pública y el ambiente. En el caso de organismos no blanco, estos coexisten de forma natural con los entomopatógenos. Sin embargo, las aplicaciones a gran escala de los organismos desarrollados industrialmente pueden cambiar el balance natural, debido a la generación de diferentes relaciones numéricas tanto espaciales como temporales entre los agentes de control biológico y los organismos no blanco. Los requerimientos normativos para su registro y uso experimental como plaguicidas microbianos naturalmente encontrados, incluyen información de 5 grandes áreas: análisis del producto, análisis de residuos, toxicología, efectos ecológicos y destino ambiental.³⁰

Por otra parte, entre los costos sociales enlistados por Pimentel y col. se incluyen costos de salud, de hospitalización y por consiguiente, pérdida de trabajos de los pacientes y daños al medio ambiente, reducción de la cosecha debido a la pérdida de abejas polinizadoras; muerte de ganado, peces, pájaros y mamíferos; pérdida de

predadores naturales de plagas; efectos adversos sobre la fisiología de la planta de cosecha y desarrollo de resistencia de plaguicidas en las poblaciones de plagas. Datos presentados por estos autores indican que el costo social del uso de plaguicidas en Estados Unidos asciende a 2,000 millones de dólares anuales. Esta cantidad es más o menos lo que se gasta en plaguicidas agrícolas (2,200 millones de dólares) y alcanza el 25 % de los beneficios netos privados de 8,700 millones de dólares que resultan del uso de plaguicidas. Así mismo ellos calculan en 200 las muertes humanas por año, causadas por plaguicidas.^{255,256}

Hadley y col. iniciaron un estudio de infectividad/toxicidad oral durante 5 meses con *B. thuringiensis* en borregos.¹⁴² Este estudio fue iniciado debido a que Mordan y Herein (resultados no publicados) reportan que insecticidas elaborados con *B. thuringiensis* introducidos en la alimentación de borregos producían neumonía, miocarditis y lesiones hepáticas. Sin embargo, Hadley y col. no encuentran efectos ni infectividad de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* para borregos. Otros estudios fueron iniciados sobre la habilidad posible de que *Bacillus anthracis* (Bacteria que causa anthrax en el hombre y animales) pueda mutar a *B. thuringiensis* en el tracto gastrointestinal,²⁹⁶ para lo cual aislan un fago de un cultivo de *B. thuringiensis* que es capaz de infectar cultivos de *B. anthracis* buscando esta posible mutación y proliferación en mamíferos, para lo anterior dirigieron esta investigación involucrando dos técnicas de exposición separadas: 1) ratones tratados con antibióticos fueron alimentados con *B. thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* y 2) se cortaron intestinos de ratón, los cuales fueron ligados e inyectados con los cultivos bacterianos. En ninguno de los dos casos hubo indicación de mutación. Después de 24 h, la población de *B. thuringiensis* fue insignificante, mientras que *P. aeruginosa* fue reducida drásticamente.²⁹⁶

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dentro de la literatura han sido reportados raros casos de patogenicidad en mamíferos por *B. thuringiensis*. Una salpicadura accidental de Dipel[®] (una formulación de los Laboratorios Abbot) en el ojo de un agricultor, dió como resultado una úlcera en la córnea, de donde se obtuvo un cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.^{280,281} Así mismo, existe un reporte de una mastitis bovina fatal causada por *B. thuringiensis*.¹³⁸ Otros autores han reportado bacteremias no infecciosas, con la presencia de esta bacteria en tejidos de vertebrados después de haber sido inoculados con dosis altas de *B. thuringiensis*.¹⁵⁹

En 1960, aparecieron varios reportes mencionando que ciertas cepas de *B. thuringiensis* producen una exotoxina estable al calor.^{32,106,148,235} Posteriormente se han descubierto 4 unidades tóxicas en cultivos de bacterias cristalíferas, entre los que se encuentran: α -exotoxina,^{145,148,187,312} β -exotoxina,^{41,147,149} δ -endotoxina y γ -exotoxina.^{147,148} Estudios posteriores indican que un espectro muy amplio de insectos fue afectado por las variedades de exotoxinas producidas, mientras que las que producían endotoxina fueron específicas para los organismos blanco respectivos.

Por lo anterior, los aspectos de seguridad al utilizar esta bacteria como agente de control biológico durante los últimos 30 años, indican que los riesgos para organismos no blanco son bajos.

δ -endotoxina: Pruebas de seguridad han sido efectuadas para las cepas productoras de δ -endotoxina, en particular *B. thuringiensis* var. *israelensis*.⁶ Estas pruebas han demostrado ser seguras para el hombre y vertebrados.²⁶⁹ Estudios posteriores con este organismo fueron usados como un modelo en el desarrollo de pruebas de desafío máximo, para probar la seguridad en mamíferos.¹¹ En estas pruebas se incluyeron inyecciones en dosis altas al organismo, intracraneal e intraocularmente. Así mismo, fueron usadas rutas convencionales de exposición, tales como la oral, parenteral, respiratoria y dérmica. Otras pruebas para alergia, usando animales inmunosuprimidos y ensayos de mutagénesis, mostraron no evidencias de que *B. thuringiensis* posea cualquier amenaza para mamíferos.²⁶⁹ Estudios posteriores incluyeron ratones, ratas, cobayos y conejos, confirmando que los mamíferos son altamente tolerantes para esta bacteria, concluyendo que existe una rápida eliminación, por carecer de multiplicación dentro de los anteriores organismos.^{252,269} Otros grupos indicaron la seguridad de esta bacteria para anfibios.^{203,218}

β -exotoxina: Estudios de seguridad para pruebas de β -exotoxina producen la muerte en ratas después de inyección intraperitoneal.^{32,106,285} Ninguna lesión histopatológica fue detectada en estos estudios en cerebro, hígado, sistema linfático e intestino. Sin embargo, otras investigaciones,¹⁰⁶ revelaron necrosis hepáticas y lesiones en los riñones y pulmón. Dosis subletales muestran que no ocurren efectos acumulativos.³² Otros estudios de toxicidad revelan diferencias de mortalidad relacionadas con el sexo en ratas inyectadas con la exotoxina. En pruebas usando 60 ratas de cada sexo encuentran que la DL_{50} y la DL_{90} para los machos de 184.8 y 290.6 g/g de peso corporal, respectivamente. Para las hembras estos valores fueron de 135.6 y 226.9 g/g de peso corporal, respectivamente.^{33,144} Estudios más recientes han

revelado lesiones después de la administración oral de la β -exotoxina para pollos,^{21,106} entre las que se incluyen erosión de la molleja, enteritis, proventriculitis, anemia y regresión de los ovarios. En resumen, Galichet¹²³ observa anorexia y pérdida de peso en cobayos tratados y Ode y Mathys se muestran en sus investigaciones que los alimentos que contienen β -exotoxina son rechazados por las vacas.²³³

Así mismo, Siegel y col. montaron unas pruebas de seguridad para mamíferos con *B. thuringiensis*, donde se demuestra seguridad de esta bacteria para los mamíferos utilizados. En contraste a estos estudios, efectos de daños han sido elucidados directamente administrando la endotoxina disuelta en soluciones amortiguadoras con este organismo, en donde se ha demostrado que puede ser citotóxica para 5 líneas de células de cultivos de mamíferos, causando hemólisis de eritrocitos de mamíferos.^{15,61,308} Igualmente se ha demostrado la habilidad de solubilización de la δ -endotoxina para lisar glóbulos rojos del sistema sanguíneo y, en resumen, se muestra que ésta puede ser letal para ratones cuando son inyectados intraperitonealmente. Otros estudios muestran, a través de inyecciones intraperitoneales en ratas, efectos de una toxina neuromuscular.⁶¹ Este mismo grupo encuentra que la inyección de la toxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* disuelta en medios alcalinos sobre ratas no produce síntomas neuromusculares. Kalmakoff y Pillai aislaron dos proteínas (A y B) de los cristales de *B. thuringiensis*, encontrando que la proteína A es hemolítica para eritrocitos de humanos y conejos; así mismo demostraron actividad neurotóxica usando el sexto ganglio abdominal de la cucaracha americana,^{63,309} condujeron estudios para demostrar las diferencias de los efectos en mamíferos que fueron administrados con el cristal δ -endotoxina nativo y la δ -endotoxina solubilizada de *B. thuringiensis*. Ellos demostraron no actividad detectable de toxicidad de la δ -endotoxina nativa cuando fue dada *per os*, subcutáneamente o intravenosa a ratas BALB/c. En contraste, la δ -endotoxina solubilizada causa rápidos cambios citolíticos y citopáticos en fibroblastos de ratones, linfocitos primarios de cerdos y en 3 tipos de células de carcinoma epitelial en ratones. En resumen, hay hemólisis de las células de los glóbulos rojos de ratas, ratones, borregos, caballos y humanos, y cuando se administra intravenosamente a ratas BALB/c causa una rápida parálisis y muerte. Administración de cristales solubilizados de la δ -endotoxina no fueron tóxicos cuando fueron dados *per os*. Pruebas con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en forma de cristal nativo, no es tóxico a ratas y no citopático *in vitro*; sin embargo, la ingestión para insectos blanco susceptibles causa rápidamente la muerte.³⁰⁹

Para guardar posibles contaminaciones con productos elaborados de *B. thuringiensis*, se pide la siguiente regulación de seguridad en Estados Unidos.

- 1.- El organismo usado deberá ser una cepa auténtica de *B. thuringiensis*.
- 2.- Métodos de cultivo puro deberán ser usados con control adecuado para evitar cualquier cambio en las características de la cepa original o contaminación con otros organismos.
- 3.- Antes de cualquier otra adición, cada lote deberá ser probado a través del uso de inyecciones subcutáneas de por lo menos un millón de esporas, en 5 ratones que tengan pesos de entre 17 a 23 g, no deberá producir evidencias de infección o daños después de 7 días.¹⁰¹

Pruebas de seguridad y uso de este organismo datan de antes de los años 50's, con el desarrollo de Thuricide.^{109,149} Los estudios iniciales incluyeron pruebas con voluntarios humanos expuestos a inhalación y oralmente, e inoculación de ratones con algunas variedades de éstas con el objeto de identificar aquellas cepas que fueran patogénicas para ratones.^{109,147,149,304} Estudios posteriores incluyeron varios pasos a través de ratones, observaciones de su presencia en la sangre en ratones y sobre cobayos; también se efectuaron toxicidad inhalatoria para ratones, pruebas alérgicas para cobayos y toxicidad oral para ratas.¹⁵⁶ No fue demostrada toxicidad o patogenicidad para esta bacteria en cualquiera de las anteriores pruebas. Otras pruebas de seguridad también fueron efectuadas sobre otros organismos, si mostrar alguno efecto de enfermedad sobre pollos, gallinas ponedoras, cerdos jóvenes y maduros, peces, faisán silvestre y perdiz.^{45,159,318}

Finalmente todo indica que *B. thuringiensis* y sus toxinas son productos altamente seguros para usarse en el medio ambiente sin causar daños sobre organismos no blanco.

MATERIAL Y METODOS

I.- AISLAMIENTO, REGISTRO, CONSERVACION E IDENTIFICACION DE CEPAS DE *B. thuringiensis*.

Se efectuaron los aislamientos de las cepas nativas de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo, insectos y granos almacenados^{117,118,273} y reaislamientos de las cepas HD de los extractos de fermentación almacenados de nuestra colección.²⁷³ En la figura 2 se muestra el esquema de los métodos utilizados para el aislamiento, identificación, registro y conservación de cepas de *B. thuringiensis* recuperadas a partir de las anteriores muestras y también se señalan los pasos que se siguieron dentro del mismo para: a) aislamiento,^{48,77} b) identificación por pruebas bioquímicas de una subespecie de *B. thuringiensis* (ver tabla 15) y serológicas,^{69,122,180,273} c) registro^{226,273} y d) conservación de las cepas recuperadas.^{48,59,228} Para los reaislamientos se procedió a activar las cepa en placas de agar nutritivo y se utilizó el método de conservación de resiembras periódicas de las cepas depositadas en nuestra colección.²⁷³ Así como de los extractos de fermentación almacenados.

II.- ESTRATEGIAS DE SELECCION DE CEPAS HD DE LOS DATOS DE ARCHIVO Y DE EXTRACTOS DE FERMENTACION, ASI COMO DE LAS CEPAS NATIVAS RECUPERADAS EN MEXICO.

Con el objeto de seleccionar las más potentes cepas de *B. thuringiensis* para el control biológico de *T. ni* y *H. virescens*, al inicio del desarrollo de esta investigación fueron primeramente analizados más de 1000 resultados de datos de archivo de fermentación efectuados por H.T. Dulmage durante los últimos 15 años que están actualmente depositados en nuestra Facultad de Ciencias Biológicas en la U.A.N.L.; con los puntos relacionados de rendimiento (g/l), potencia (toxicidad) de la cepa HD utilizada (UI/mg), composición del medio de cultivo utilizado, condiciones de la fermentación, así como el serotipo y serovariedad a las cuales pertenece la cepa que fue fermentada. Fueron seleccionadas aquellas cepas que presentaron los datos más altos en los dos primeros criterios (rendimiento y potencia). Los datos de la composición de los medios de cultivo y las condiciones de fermentación nos sirvan para los estudios de optimización de condiciones y escalamiento del proceso para la cepas seleccionadas.

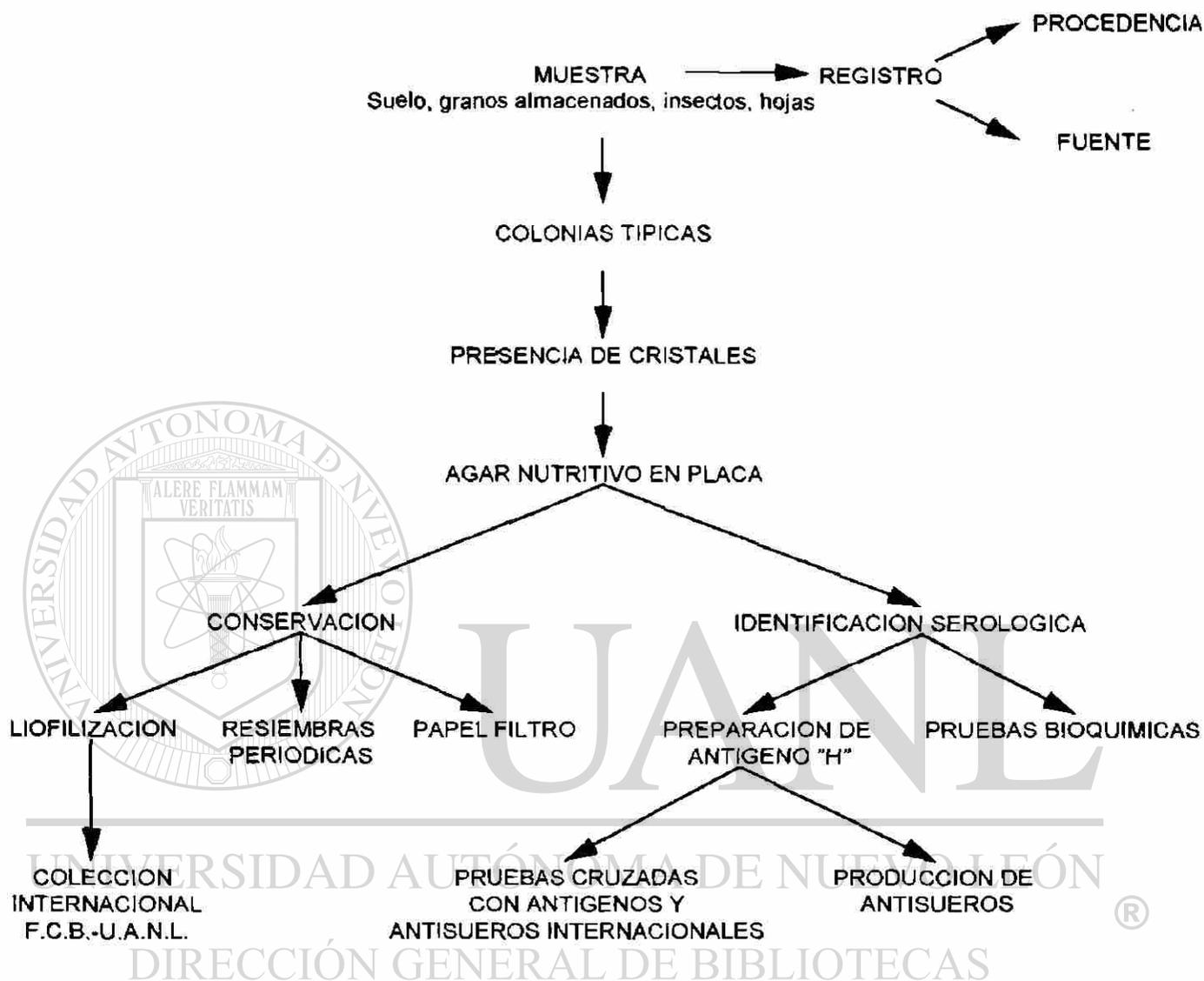


Figura 2.- Esquema utilizado para: aislamiento, identificación, registro y conservación de cepas de *B. thuringiensis*.

Tabla 15.- Pruebas bioquímicas para la identificación de una subespecie de *B. thuringiensis*.

A.M.C. (Voges-Proskauer)		Hidrólisis de almidón
Lecitinasa		Utilización de citrato
Hidrólisis de urea		Prueba de la coagulasa
A.D.H. (Arginina Deshidrogenasa)		Prueba de la oxidasa
Formación de película		Tween-esterasa
Celobiosa		β -galactosidasa
Manosa	Producción	Producción de pigmento
Salicina	de ácido	DNAsa

Por otra parte, fueron seleccionados al azar 42 muestras de extractos de fermentación almacenadas por diferentes períodos de tiempo, de un total de más de 4,000 diferentes muestras que se encuentran actualmente depositados en nuestra colección de extractos de fermentación, las cuales pertenecen a diferentes serotipos y que fueron nuevamente evaluadas a través de bioensayos contra *T. ni* y *H. virescens*, con el objeto de seleccionar aquellas muestras que presentaran los resultados más altos en porcentaje de mortalidad contra los anteriores insectos blanco. De aquellas muestras que presenten los mejores resultados fue reaislada de nuevo la cepa que contiene, y se efectuó un estudio comparativo con la cepa recientemente fermentada y recuperado de nuevo su extracto de fermentación.

Finalmente de nuestra colección de cepas nativas aisladas de México y depositadas en nuestra colección, fueron seleccionadas al azar 34 cepas de más de 100 cepas, las cuales fueron recuperadas de diferentes muestras y que pertenecen a diferentes serotipos; se seleccionaron aquellas cepas que al ser propagadas y recuperado su extracto de fermentación, presenten los porcentos de mortalidad más altos a través de bioensayos de laboratorio contra *T. ni* y *H. virescens*. También se efectuó un estudio comparativo seleccionado al azar de varias cepas nativas, a la cuales se investigó el efecto de utilizar el cultivo total y/o extracto de fermentación en los bioensayos. Lo anterior con el propósito de determinar si existe diferencia en incremento del porcentaje de mortalidad con los anteriores insectos blanco a nivel de laboratorio.

III.- EXPERIMENTOS A NIVEL DE MATRAZ Y FERMENTADORES CON LAS CEPAS NATIVAS CLAVES GM.

1.- Experimentos a nivel de matraz.

a) Inóculo.

De las 106 cepas nativas clave GM, fueron utilizadas 34 cepas de *B. thuringiensis*, las cuales se activaron en agar nutritivo pH = 7.0 a 30 °C por 24 h de incubación, respectivamente. Después fueron tomadas varias asadas y se inocularon en matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de Caldo Triptosa Fosfato (Difco) pH = 7.0, manteniéndose a 200 r.p.m. durante 10-14 h a 30 °C. Posteriormente se usó un 0.5 % (V/V) como inóculo para sembrar en medios de fermentación diseñado para la producción y obtención del complejo espora-cristal.^{119,295}

b) Medios de fermentación.

Se utilizó un medio de cultivo denominado A-1 a base de: melaza 20 g/l, harina de soya 20 g/l y L.R.M. (Líquido de Remojo de Maíz) en una cantidad de 10 g/l, este último marca comercial Solufern (Productos de Maíz de Guadalajara, México). En los medios de los fermentadores se utilizó además un antiespumante de tipo silicón Dow Corning, diluido en un 20 % en agua destilada.^{80,133,302}

c) Condiciones de fermentación.

Los experimentos para las anteriores cepas fueron efectuados por duplicado en matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo, manteniéndose en agitación giratoria a 200 r.p.m. y temperatura de 30 °C en el medio de fermentación, en base a melaza de caña como fuente de carbono. A nivel de fermentadores marca New Brunswick Scientific Co. Inc. modelo MF-114, de 14 l de capacidad total. Se diseñaron experimentos por triplicado con diversas condiciones en cuanto a agitación y aereación, respectivamente.^{8,54,316} Volumen de fermentación 7 l y una temperatura constante de 30 °C.³²⁷

d) Recuperación del complejo espora-cristal.

Se realizó al final de la fermentación. En la figura 3 se muestra el procedimiento para la recuperación del complejo espora-cristal. Se utilizó el método de Dulmage (1970), el cual consistió en: El medio de fermentación fue ajustado a un pH 7 y centrifugado a 10,000 r.p.m durante 30 min., se decantó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en un volumen 1/10 de lactosa al 5 % y se agitó por 30 min. Luego se agregó un volumen 1/20 de acetona y se volvió a agitar otros 30 min. Se dejó reposar la mezcla por 10 min. y fue filtrado al vacío, utilizando un papel filtro Whatman No. 1. Se dejó secar el filtrado toda la noche y se raspó para recuperarlo y posteriormente pulverizarlo con un mortero y fue pesado para determinar la productividad obtenida. En g de extracto fermentación por LMC. Al extracto le fue determinado. El número de esporas viables, porcentaje de mortalidad y potencia a través de bioensayos.⁸¹

e) Conteo de esporas.

Del extracto recuperado de fermentación, se utilizó 0.1 g y se diluyó con 9.9 ml de solución salina 0.85 % estéril pH de 7, contenidos en un tubo de ensaye, este fue pasteurizado a 80 °C por 10 minutos, posteriormente se efectuaron una serie de diluciones de 10^{-3} a 10^{-9} , sembrándose posteriormente por difusión 1 ml de las tres últimas diluciones en placas con agar nutritivo estéril, pH 7, incubándose a 30 °C por 24-48 h.⁸² Finalmente se efectuó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en las tres últimas diluciones y se reportó en (UFC/g).

f) Bioensayo de extractos obtenidos a nivel de matraz y de fermentadores.

En la figura 4 se muestra el protocolo del bioensayo que fue usado para probar la toxicidad del extracto de fermentación recuperado a nivel de laboratorio de las cepas evaluadas a nivel de matraz y fermentadores, contra larvas neonatas de primer estadio de *T. ni* y *H. virescens*, para determinar el porcentaje de mortalidad. Las larvas fueron alimentadas con una dieta nutritiva de Shorei modificada,^{81,82} aplicando dos dosis únicas de 500 y de 50 g del complejo espora-cristal por ml de dieta de cada extracto. Se utilizaron 20 larvas distribuidas en 20 recipientes individuales, dejándose 20 larvas como control. El total de recipientes se incubó a 25 °C y a una humedad relativa de 55 %, determinándose después de 7 días el porcentaje de mortalidad.^{87,92,221} Posteriormente fue comparada su actividad con un estándar internacional

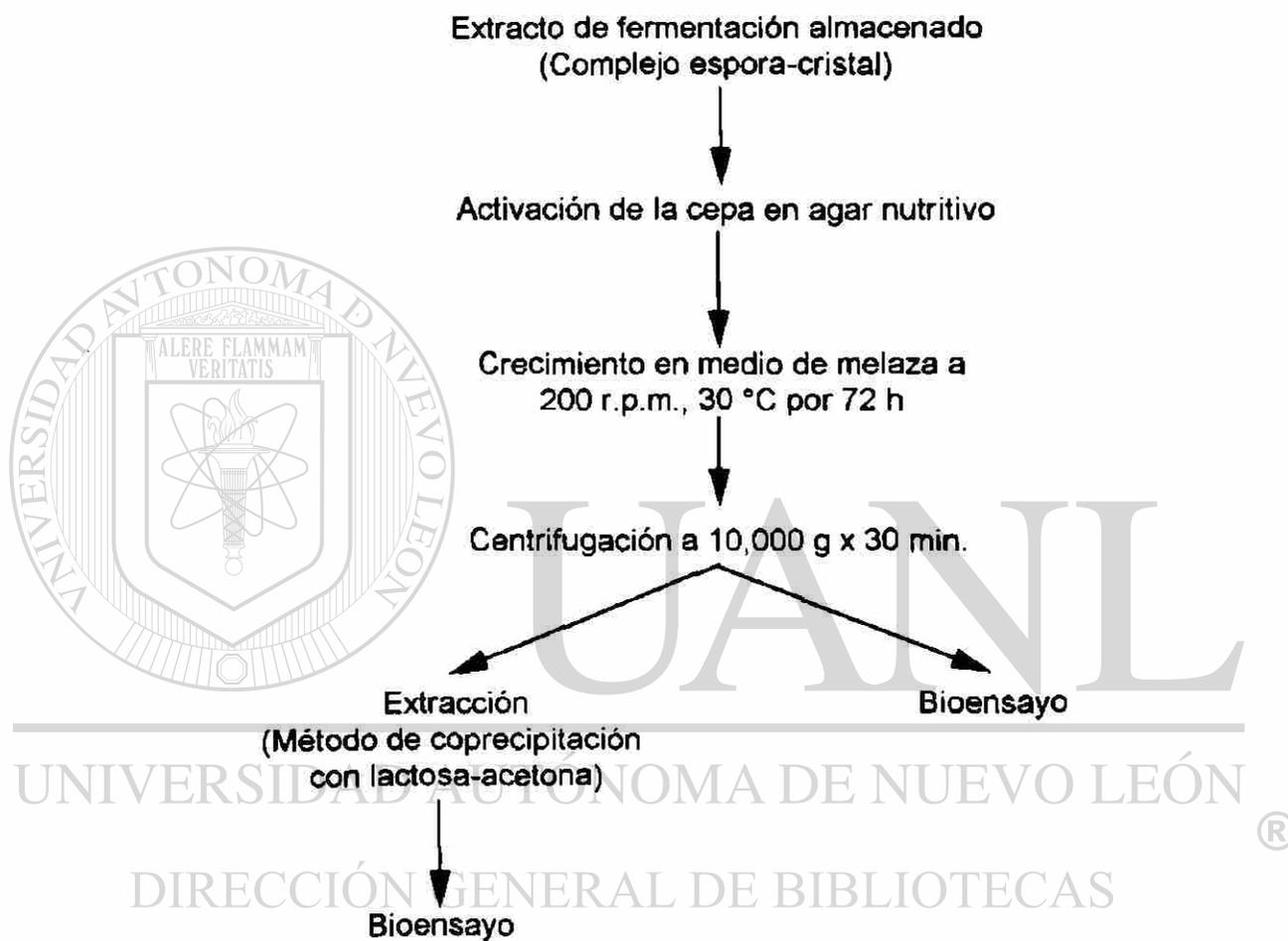


Figura 3.- Esquema de obtención del complejo espora-cristal.

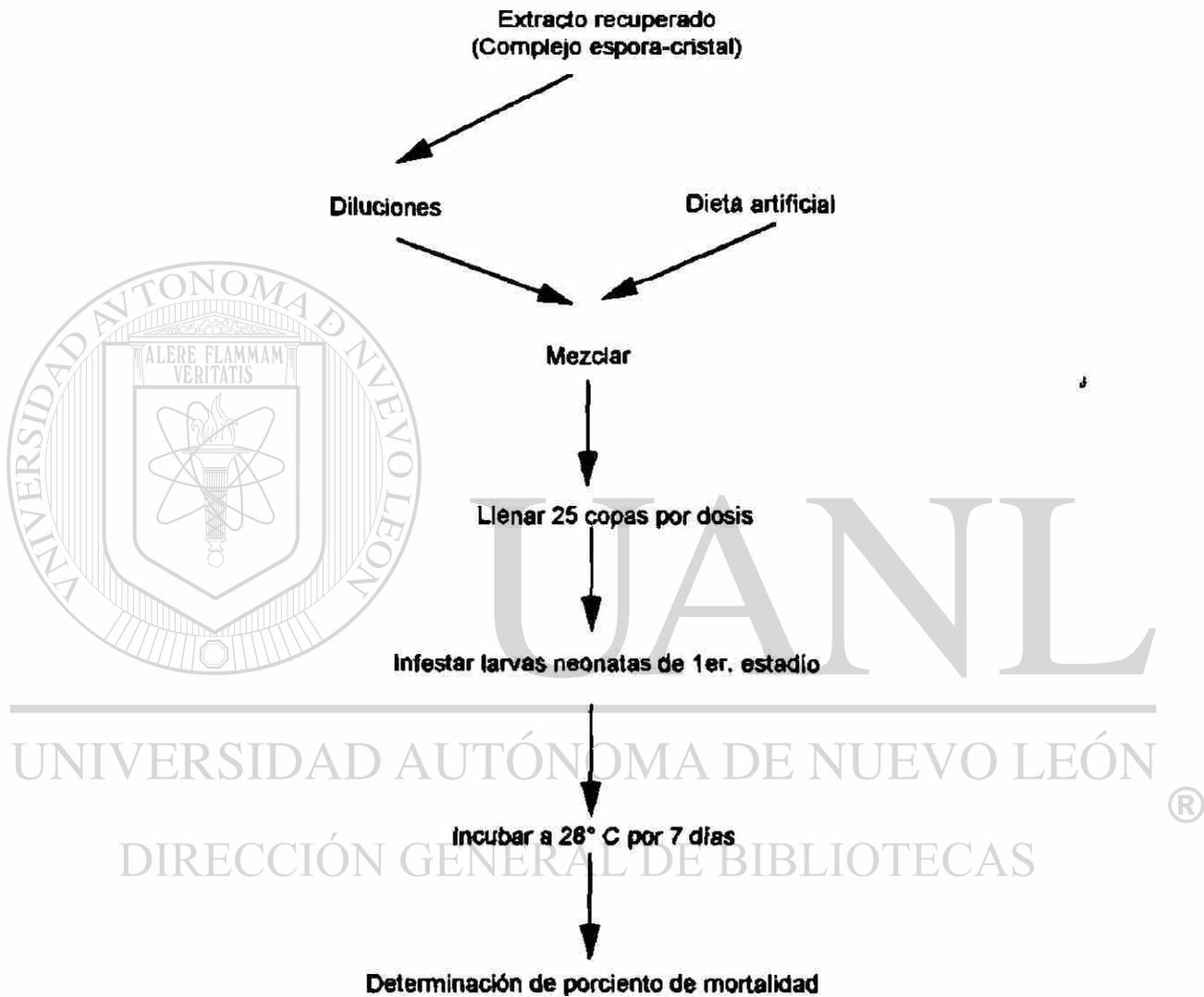


Figura 4- Esquema de bioensayo.

(HD-1-S-1980) y un producto comercial de la compañía Sandoz denominado JAVELIN[®],¹¹⁴ el cual está elaborado con una cepa de *B. thuringiensis* serotipo H-3a3b. Con los datos obtenidos, fue determinada la DL₅₀ a través de un análisis Probit.^{43,87,91}

La potencia del extracto en Unidades Internacionales (UI/mg) se determinó con la fórmula siguiente.⁹¹

$$\text{UI/mg} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ del estándar}}{\text{DL}_{50} \text{ de la muestra}} \times \text{UI del estándar}$$

UI/mg = Unidades Internacionales de Potencia x mg de muestra.

DL₅₀ = Dosis letal media (g/ml).

UI = Unidades Internacionales de Potencia. Al estándar HD-1-1980 se le asignó una potencia de 16,000 UI/mg.

Finalmente las cepas nativas que presentaron sus extractos de fermentación recuperado a nivel de matraz, los mejores resultados en los bioensayos fueron las seleccionadas para los estudios de optimización de condiciones y escalamiento del proceso.

2.- Experimentos a nivel de fermentadores.

a) Preparación de inóculo y condiciones para optimización de proceso.

i) Activación de la cepa. Se tomó una asada de la cepa de nuestra colección y se inculó a un tubo de agar nutritivo estéril inclinado, mismo que se incubó a 30 °C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se transfirió dos asadas del tubo de agar nutritivo a un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de caldo triptosa fosfato (CTP), incubándose a 30 °C de 7 a 8 h en un agitador rotatorio a 250 r.p.m.³²⁷

ii) Inóculo. Se usó como semilla de inóculo el Caldo Triptosa Fosfato, bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas: se transfirió un mililitro a cada uno de los tres matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad total con 100 ml del medio de fermentación (medio A-1) estéril pH 7, manteniéndose en agitación a 200 r.p.m. por 20

h a 30 °C, inoculándose el 1 % (v/v) y posteriormente al fermentador,⁸³ el cual contiene un volumen de operación de 7 l del mismo medio de cultivo. Todos los experimentos se efectuaron por triplicado para cada condición, agitación y aereación que se usó.^{211,212}

iii) Optimización de condiciones de fermentación. Buscando encontrar la máxima producción y porcentaje de mortalidad de los extractos de fermentación bajo las condiciones variables de agitación y aereación para las cepas seleccionadas, para cuyo proceso de optimización se utilizó un método estadístico de matriz plan Puebla Turrent, 1970, de 2 factores, con 4 y 8 tratamientos por triplicado,^{54,316} los datos se sometieron a una interpolación, obteniéndose datos de puntos no procesados, mismos que fueron validados estadísticamente por el método de Kriging.^{53,54} Ellos se sometieron a un graficado bidimensional, en el cual el eje de abscisas es el valor ordenado de 0 a 1 del factor agitación siendo 0 = 100 r.p.m. y 1 = 700 r.p.m. La temperatura que se mantuvo durante el proceso de fermentación fue de 30 °C y pH inicial de 7.0., ajustándose con HCl 1N ó NaOH 1N. Para el control de la espuma se usó un antiespumante tipo "A" de siliconas Dow Corning, agregándose al inicio de la fermentación un total del uno por ciento.²⁹⁵ A los datos obtenidos de producción y número de esporas les fue determinado su promedio de las tres repeticiones (X) y la desviación estándar (DS), para cada tratamiento efectuado por triplicado.³⁰³

b) Determinación de la demanda biológica de oxígeno (Na).

Fue encontrada en una etapa anticipada a la fase estacionaria con el fin de lograr una máxima cantidad de células. Esta demanda se encontró de acuerdo al equipo disponible usando el método Humphrey y col. (1967), que consiste en eliminar en dicha etapa la aereación y prácticamente también la agitación. En este momento la concentración de oxígeno disuelto se detectó en función de la concentración de células de *B. thuringiensis* presente, el valor de la pendiente al graficar la disminución del porcentaje de oxígeno disuelto contra tiempo en segundos, representa el requerimiento de oxígeno específico expresado como Na en $gO_2/L.M.C. \times hora$ (gO_2 = gramos de oxígeno, L.M.C. = Litro de Medio de Cultivo).^{213,332}

Esta determinación se realizó utilizando un electrodo para oxígeno tipo Johnson-Borkowsky a base de plomo y plata, el cual, independientemente de medir la actividad de oxígeno, nos permite conocer el porcentaje de saturación del gas en el medio de cultivo dentro del fermentador.¹⁸⁸

La información del Na resulta importante para conocer la capacidad del fermentador de cumplir esta demanda biológica de oxígeno, a través de su sistema de agitación y aereación.^{56,71}

c) Cuantificación de la fuente de carbono.

Las muestras recuperadas durante el transcurso de la fermentación se almacenaron a temperatura de congelación y posteriormente se descongelaron, y se centrifugaron a 3,000 r.p.m. por 15 minutos; del sobrenadante se determinaron los azúcares reductores por el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico.³⁰⁷

d) Determinación del coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato (Yx/s).

Los coeficientes de rendimiento celular en base a sustrato para cada fermentación fueron determinados a través de la cuantificación de la biomasa celular²¹¹ y del consumo de azúcares reductores.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Y_{x/s} = Coeficiente de rendimiento en base a sustrato (g células secas/g de sustrato).

X = Concentración final de biomasa celular (g/l).

X₀ = Concentración inicial de biomasa celular (g/l).

S₀ = Concentración inicial de azúcares reductores (g/l).

S = Concentración final de azúcares reductores (g/l).

Para calcular la biomasa celular (g/l) se empleó el peso de una célula del género *Bacillus* sp. que es de 3.77×10^{-12} g y el número de esporas presentes en el extracto de fermentación recuperado (UFC/g), para finalmente determinar los gramos de células secas (rendimiento) obtenidos.²¹³

e) Recuperación del complejo espora-cristal.

De cada lote de fermentación que se propagó por triplicado para cada condición programada, se recuperaron solamente 300 ml de medio de cultivo, los cuales se

usaron para obtener el complejo espora-cristal. Al finalizar la fermentación se ajustó el pH de estos 300 ml del medio de cultivo a 7.0 con HCl 1N; luego se centrifugaron a 10,000 r.p.m. por 30 min para coprecipitar finalmente, el complejo espora-cristal con lactosa y acetona.⁸¹

f) Velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2).

Para *B. thuringiensis* el (QO_2) es un parámetro importante de la fermentación, el cual representa la velocidad específica de consumo de oxígeno expresada como $g O_2/g$ de células secas por horas ($g O_2 =$ gramos de oxígeno). El QO_2 se determinó a través de dividir la demanda de oxígeno (N_a) entre los gramos de células secas existente en cada litro de medio de fermentación.^{71,212}

g) Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}).

Es importante señalar que el N_a y el QO_2 son dos parámetros específicos o afines a la bacteria, sin embargo, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) es un parámetro que nosotros utilizamos para el escalamiento de nuestro proceso. Este representa las características de un fermentador, y aunque se cuantifique durante el proceso de fermentación, no deja de ser una representación de las características físico-mecánicas del fermentador.³³⁶ La medición de este parámetro se realizó utilizando el método dinámico de Humprey (1967), la cual se basa en que la variación de la concentración de oxígeno disuelto con respecto al medio es igual a cero. Sin embargo, al realizarlo en un cultivo intermitente es de suponer que esta situación no es así.³³² Para establecer una metodología sencilla de medición de este parámetro, se dividió el valor del N_a determinado anteriormente, entre el gradiente de concentración de oxígeno ($C_L - C^*$), que prevaleció durante la medición con la presencia de células, obteniéndose finalmente el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno expresado como $K_{La} = Hr^{-1}$.^{56,220}

Para los fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total se determinó por otro método, de acuerdo al equipo disponible. Para las mejores condiciones donde se encontró la mejor toxicidad en los extractos de fermentación recuperados de los fermentadores de 14 l de capacidad total. Este parámetro fue determinado sin células para los fermentadores de 500 y 130 l de capacidad total, cortando el aire cuando éste señalaba un 100 % de oxígeno disuelto y utilizó una corriente de nitrógeno y midiendo el valor de la pendiente relacionada con la caída del % de oxígeno disuelto y

posteriormente haciendo pasar una corriente de aire con las características de presión, VVM y las otras anteriormente señaladas en la tabla 16, y determinándose el incremento de % de oxígeno disuelto contra tiempo (segundos); en esta última etapa el valor de la pendiente representó el valor del K_{La} .^{220,264}

IV.- ESCALAMIENTO DEL PROCESO EN FERMENTADORES DE 130 Y 500 L DE CAPACIDAD TOTAL.

Las fermentaciones se efectuaron por duplicado en el Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, para las cepas seleccionadas clave *B. thuringiensis* GM-7 y GM-10, en las que fue utilizado el K_{La} como factor de escalamiento.^{264,295,314,332}

Durante el desarrollo del escalamiento a nivel de planta piloto fue necesario conocer el diseño del medio de cultivo para la cepa seleccionada. Así como las condiciones óptimas (agitación y aereación) en donde se encontró la máxima producción y toxicidad de las muestras fermentadas, para las cepas seleccionadas en fermentadores de 14 l para posteriormente efectuar el paso a fermentadores de 130 y 500 l de capacidad, para lo anterior fue necesario tomar un criterio de mantenimiento del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) cuando se pasó de una escala a otra.^{56,264} En la tabla 16 se muestran las características y condiciones que fueron utilizadas durante el escalamiento a nivel de planta piloto, para las cepas GM-7 y GM-10 en los fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.

a) Recuperación del complejo espora-cristal.

Se realizó a las 30 h de fermentación, usando el procedimiento descrito por H.T. Dulmage para la recuperación del complejo espora-cristal, que consistió en una coprecipitación con lactosa-acetona.⁸¹ Otras muestras se recuperaron mediante secado por aspersión.³²⁷

b) Bioensayo de extractos recuperados a nivel fermentadores de 130 y 500 l de capacidad contra larvas neonatas de *T. ni* y *H. virescens*.

Se determinó por los métodos anteriormente descritos.

Tabla 16.- Características y condiciones de los fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total utilizados durante el escalamiento para la producción de *B. thuringiensis* cepas GM-7 Y GM-10.

	Fermentador de 130 l	Fermentador de 500 l
1 K_L (Hr^{-1})	145	145
2 Motor de agitación (HP *)	1.0	5.0
3 Volumen (l)	100	350
4 Medio de cultivo ***	20:20:10	20:20:10
5 VVM (pie^3/min)	0.85	3.5
6 Presión de entrada al reactor (lbs/pg^2)	3.01	3.0
7 Presión de la línea de aire (kg/cm^2)	2.0	2.0
8 Presión del fermentador (lbs/pg^2)	1.5	1.5
9 Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	30
10 Flujo de aire (pie^3/min)	1.0	3.75
11 pH inicial y final	7.0-7.0	7.0-7.0
12 Tiempo de fermentación (h)	30	30
13 Porcentaje de inóculo	1.0	1.0
14 Agitación (r.p.m.**)	260	167

Para ambos fermentadores se usó corriente de 220 volts.

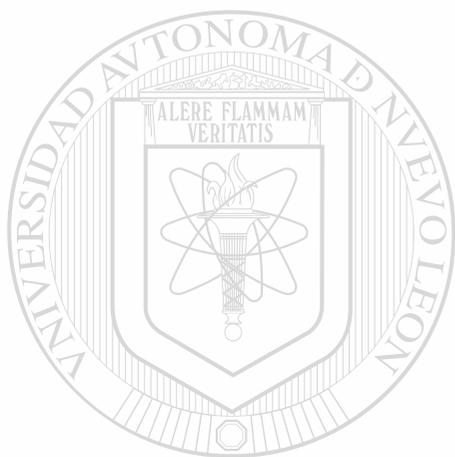
* HP es igual a caballos de fuerza.

** r.p.m. es igual a revoluciones por minuto.

*** Melaza, Harina de Soya (desgrasada) y Soluform (agua de cocimiento de maíz), en cantidades de 20, 20, 10, g/l de medio de cultivo respectivamente.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Finalmente, el escalamiento nos servirá para conocer los factores más importantes de factibilidad económica para el proceso, así como para saber los parámetros; de tiempo de duración, costo de la materia prima para su producción, tipos de equipos que se requieren para operar el proceso, recuperación y purificación del producto, costo de energía durante el mismo y tipo y diseño del fermentador más adecuado, así como la mano de obra para operarlos y la toxicidad del producto recuperado,^{170,264} para posteriormente formularlo.³²⁷



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

I.- CEPAS Y SEROTIPOS DE *B. thuringiensis* EVALUADOS Y SELECCIONADOS.

1.- De los datos de archivo de resultados de fermentación analizados.

En la tabla 17 se muestran los resultados de los serotipos a los cuales pertenecen las 19 cepas HD analizadas y encontrados en los datos de archivo para su selección y evaluación de más de 1000 resultados realizados por H.T. Dulmage, a nivel de fermentadores de 14 l de capacidad total. Así como, fue determinando que las cepas HD de *B. thuringiensis* analizadas en los datos de archivo para su selección y evaluación, corresponden a 5 diferentes serotipos: H-1 var. *thuringiensis*, H-3a3b var. *kurstaki*, H-5a5b var. *galleriae*, H-6 var. *entomocidus*, y H-9 var. *tolworthi*. El serotipo utilizado en más del 50 % de todos los experimentos fue el H-3a3b var. *kurstaki*. Por otra parte, las cepas HD-193, HD-241, HD-244, HD-263 y HD-635 fueron las únicas que se usaron en los experimentos en fermentadores de 250 l de capacidad total, las cuales correspondieron a 3 diferentes serotipos: H-3a3b var. *kurstaki* cepas HD-241, HD-244 y HD-263; al serotipo H-5a5b var. *galleriae* cepa HD-193 y la cepa HD-635 al serotipo H-6 var. *entomocidus*.

Tabla 17.- Cepas de *B. thuringiensis* HD y sus serotipos de datos analizados en los datos de archivo para su selección y evaluación.

Clave	Serotipo
14	1
15	1
49	ni*
59	3a3b
73	3a3b
187	3a3b
193	3a3b
196	5a5b
241	3a3b
243	3a3b
244	3a3b
245	3a3b
246	3a3b
263	3a3b
301	9
306	3a3b
310	3a3b
635	6
922	3a3b

* ni = No identificado

2.- Serovariedades de las cepas HD evaluadas contra *T. ni* y *H. virescens* para su selección de los extractos de fermentación almacenados por diferentes períodos de tiempo.

En la tabla 18 se muestran las serovariedades a los cuales pertenecen las 42 cepas HD de *B. thuringiensis* evaluadas de los extractos de fermentación almacenados por diferentes períodos de tiempo, de nuestra colección de extractos de fermentación. Se observa que estos pertenecen a 5 diferentes serotipos: 3a3b, 5a5b, 8a8b, 8a8c y 8a8d, así como a las serovariedades *kurstaki*, *galleriae*, *morrisoni*, *ostrinae* y *nigeriensis*, respectivamente.

3.- Cepas nativas recuperadas en México de *B. thuringiensis*.

En la tabla 19 se muestran las cepas y los serotipos que fueron previamente reportados por nosotros de las 32 cepas nativas de *B. thuringiensis* clave GM recuperadas de México y posteriormente ensayadas. Se observa que éstas pertenecen a 6 diferentes serotipos: 7, 8a8b, 8a8c, y 8b8d, 9, 17, así como a las serovariedades *aizawai*, *morrisoni*, *ostrinae*, *nigeriensis*, *tolworthi* y *tohokuensis*, respectivamente. Dentro de los aislados recuperados el que predominó fue el serotipo 7 var. *aizawai* y posteriormente el serotipo H-8.

II.- BIOENSAYOS DE LAS CEPAS DE *B. thuringiensis*.

1.- De los datos de archivo analizados.

a) Cepas producidas a nivel de fermentadores de 14 l.

Se encontró una mayor toxicidad para la cepa HD-263 de 113,000 UI contra *H. virescens* y de 54,600 UI para *T. ni*, así como una mayor producción (38 g/l) para la cepa HD-187 en el medio de cultivo denominado D-9. Ambas cepas pertenecen al serotipo H-3a3b var. *kurstaki* y fueron propagadas bajo las siguientes condiciones de fermentación: aereación, 1 VVM; temperatura, 30 °C; agitación, 700 r.p.m., y pH inicial de 7. El volumen de medio de cultivo en el fermentador fue de 7 y 10 l.

Tabla 18.- Serovariedad y resultado de bioensayo de las 42 cepas HD evaluadas de los extractos de fermentación almacenados por diferentes periodos de tiempo.

Año	Cepa	Serovar.	Clave	<i>T. ni</i>		<i>H. virescens</i>	
				500*	50*	500	50
1971	HD-193	<i>galleriae</i>	93	96	12	4	4
1977	HD-193	<i>galleriae</i>	331	20	0	40	4
1975	HD-196	<i>galleriae</i>	914	88	16	8	0
1977	HD-193	<i>galleriae</i>	2024	100	32	84	28
1977	HD-193	<i>galleriae</i>	2251	8	0	0	0
1977	HD-193	<i>galleriae</i>	2255	4	0	0	0
1974	HD-244	<i>kurstaki</i>	331	20	0	40	4
1977	HD-241	<i>kurstaki</i>	2201	16	16	36	8
1978	HD-244	<i>kurstaki</i>	2475	88	4	4	16
1978	HD-244	<i>kurstaki</i>	2664	37	0	0	8
1980	HD-263	<i>kurstaki</i>	3265	100	88	100	0
1980	HD-263	<i>kurstaki</i>	3264	100	76	100	58
1980	HD-263	<i>kurstaki</i>	3269	26	8	56	0
1981	HD-263	<i>kurstaki</i>	3600	100	0	68	0
1981	HD-263	<i>kurstaki</i>	3770	100	68	0	0
1981	HD-263	<i>kurstaki</i>	2775	0	4	0	0
1981	HD-263	<i>kurstaki</i>	2768	0	4	0	0
1981	HD-263	<i>kurstaki</i>	2798	8	13	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2321	12	12	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2324	8	0	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2414	0	0	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2340	4	0	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2328	8	8	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2334	20	4	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2329	8	4	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2333	12	20	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2325	16	4	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2345	8	4	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2400	0	0	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2316	8	0	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2396	4	0	0	0
1974	HD-187	<i>kurstaki</i>	2397	12	0	0	0
1974	HD-116	<i>morrisoni</i>	582	100	18	20	0
1980	HD-530	<i>morrisoni</i>	3053	100	58	24	0
1980	HD-531	<i>morrisoni</i>	3607	8	12	4	4
1980	HD-559	<i>morrisoni</i>	3625	8	10	12	4
1980	HD-615	<i>morrisoni</i>	3628	14	12	0	8
1980	HD-652	<i>morrisoni</i>	3559	16	4	12	8
1980	HD-501	<i>ostrinae</i>	3512	0	0	0	0
1980	HD-536	<i>ostrinae</i>	3513	0	0	0	0
1980	HD-577	<i>ostrinae</i>	3514	0	0	0	0
1980	HD-974	<i>nigeriae</i>	3516	0	0	0	0

* = Dosis en µg/ml

Tabla 19.- Cepas y serotipos a las cuales pertenecen las cepas clave GM nativas de *B. thuringiensis* evaluadas.

Cepa	Serotipo	Subespecie
GM-1	7	<i>aizawai</i>
GM-2	8a 8b	<i>morrisoni</i>
GM-5	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-6	7	<i>aizawai</i>
GM-7	7	<i>aizawai</i>
GM-8	7	<i>ostrinae</i>
GM-9	7	<i>aizawai</i>
GM-10	7	<i>aizawai</i>
GM-11	7	<i>aizawai</i>
GM-12	9	<i>tolworthi</i>
GM-13	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-14	7	<i>aizawai</i>
GM-20	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-23	7	<i>aizawai</i>
GM-24	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-25	7	<i>aizawai</i>
GM-26	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-27	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-29	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-39	nuevo serotipo	
GM-51	8a 8d	<i>nigeriensis</i>
GM-52	8a 8c	<i>ostrinae</i>
GM-55	8a 8d	<i>nigeriensis</i>
GM-58	7	<i>aizawai</i>
GM-61	9	<i>tolworthi</i>
GM-62	17	<i>tohokuensis</i>
GM-63	9	<i>tolworthi</i>
GM-64	9	<i>tolworthi</i>
GM-66	17	<i>tohokuensis</i>
GM-78	17	<i>tohokuensis</i>
GM-88	7	<i>aizawai</i>
GM-89	9	<i>tolworthi</i>

* Depositadas en la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos: Catálogo de *B. thuringiensis* aislados y extractos. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, N.L., México (312).

b) Cepas producidas a nivel de fermentadores de 250 l.

Por otra parte, para la cepa HD-241, serotipo H-3a3b a nivel de fermentadores de 250 l de capacidad total con 150 l de medio de cultivo, se encontró una producción de 33 g/l y una toxicidad de 38,400 UI para *T. ni* y 18,900 UI para *H. virescens*, a las 39 h de fermentación en un medio de cultivo B-8a, bajo las siguientes condiciones: aereación 1VVM, temperatura 30 °C, agitación 400 r.p.m., y pH inicial 7.

Se encontró en los datos de archivo para la cepa HD-263 una toxicidad de 35,900 UI para *T. ni* y 222,000 UI para *H. virescens*, en fermentadores de 250 l de capacidad total, así como una producción de 18.33 g/l en el medio de cultivo B-12, el cual contiene (g/l): dextrosa (30.0), harina de soya (40.0) y líquido de lemojo de maíz (10.0), CaCO₃ (1.0).

Finalmente, la más baja toxicidad que se encontró en los datos fue para la cepa HD-635, serotipo H-6, de un 50 % de mortalidad para *T. ni* y un 38 % para *H. virescens*, en dosis de 500 µg/ml de dieta.

2.- De los extractos de fermentación almacenados de las cepas HD que presentan las mejores toxicidades.

En la tabla 18 también se muestran los resultados de los bioensayos de los extractos de fermentación almacenados por diferentes períodos de tiempo, en donde se observa que los extractos de *B. thuringiensis* de la cepa HD-263 perteneciente al serotipo H-3a3b var. *kurstaki*, año 1980, claves (3264) y (3265). Para el primero, se presenta un 66 % de mortalidad para *T. ni* y un 58 % para *H. virescens*; y para el segundo una mejor actividad de 88 % de mortalidad con dosis de 50 µg/ml de dieta para *H. virescens*, del total de 42 extractos que fueron ensayados. La segunda serovariedad con mejor actividad fue la cepa HD-530 var. *morrisoni*, año 1980, clave (3053), encontrándose para *T. ni* un 58 % de mortalidad en dosis de 50 µg/ml de dieta.

En la tabla 20 se muestran únicamente los resultados de la toxicidad de los extractos para las cepas HD-263 pertenecientes a la serovariedad *kurstaki* almacenadas en diferentes períodos de tiempo, las cuales fueron evaluadas contra *T. ni* y *H. virescens*. Al comparar la DL₅₀ y la dosis del por ciento de mortalidad, se observó que el producto comercial JAVELIN[®] de la compañía Sandoz fue el mejor, ya que presentó una DL₅₀ más baja, encontrándose para *H. virescens* de 1.68 µg/ml y de 8.47

$\mu\text{g/ml}$ para *T. ni*, seguida del extracto de fermentación almacenado clave 3265, el cual contiene una cepa de HD-263 perteneciente a la variedad *kurstaki*. Para *T. ni* se encontró una DL_{50} de 12.23 $\mu\text{g/ml}$ y de 5.39 $\mu\text{g/ml}$ para *H. virescens*.

Tabla 20.-Resultados de bioensayos del extracto de fermentación almacenado (HD-263) y comparación de su Dosis Letal Media (DL_{50}) y porcentaje de mortalidad con el estándar internacional y JAVELIN.

Extracto	DL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		Porcentaje de Mortalidad ($\mu\text{g/ml}$)			
			<i>H. vi</i>		<i>T. ni</i>	
	<i>H. vi</i>	<i>T. ni</i>	100	50	100	50
STD	68.80	23.42	500	50	60	20
JAVELIN	1.68	8.47	50	1	25	10
E-3265	5.39	12.23	100	5	50	10
E-3600	-	114.87	-	-	400	50
E-3770	11.68	17.79	500	15	100	15
E-3264	20.52	20.45	500	15	50	15
E-3269	136.41	-	500	100	-	-

(-) = No determinado.

STD = Estándar internacional de 1980, el cual contiene la cepa HD-1.

E = Extracto almacenado de fermentación, los cuales contienen cepas HD pertenecientes a la variedad *kurstaki*.

JAVELIN = Producto comercial de la compañía Sandoz, el cual contiene una cepa de *B. t.* var. *kurstaki*, denominada SA-11.

DL_{50} = Dosis Letal Media.

3.- Toxicidad de las mejores cepas nativas GM.

En la tabla 21 se muestran los resultados de los bioensayos efectuados para las 32 cepas nativas GM de *B. thuringiensis* propagadas a nivel de matraz y evaluadas contra *T. ni* y *H. virescens*, en donde se observa que las mejores en cuanto a toxicidad del extracto recuperado y ensayado a nivel de laboratorio fueron GM-1, GM-7, GM-9, GM-10 y GM-58, todas las anteriores pertenecientes a la serovariedad *aizawai*. Por otra parte, fueron analizados los resultados de los datos existentes de otras 54 cepas nativas anteriormente ensayadas. Dentro de las anteriores 32 cepas sobresalen GM-7 y GM-10, al utilizar dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta la primera presentó 100 % y 64 %; la segunda 92 % y 4 % de mortalidad contra los anteriores insectos, las dos resultaron

ser las más potentes cepas nativas para *T. ni* y *H. virescens*. Por lo anterior, estas dos últimas cepas fueron las seleccionadas en base a su toxicidad para efectuar los estudios de optimización de condiciones a nivel de fermentadores de 14 l de capacidad y escalamiento del proceso a nivel de planta piloto.

4.- Comparación de la actividad tóxica de l extracto almacenado clave 3053 (año 1980) y producido recientemente.

En la tabla 22 se muestran los resultados de la toxicidad del extracto almacenado de la cepa HD-530 , la cual fue producida recientemente y ensayado contra *T. ni*, en donde se observa que el extracto almacenado al ser preparado nuevamente no incrementa su actividad tóxica, así mismo se observa que la actividad tóxica del estándar (potencia) fue de 2.5 veces superior, al del extracto almacenado del año 1980 (cepa HD-530) la cual pertenece a la var. *morrisoni*.

5.- Comparación de la actividad tóxica del cultivo total y del extracto de fermentación.

En la tabla 23 se muestra la actividad tóxica comparativa del cultivo total para las cepas de *B. thuringiensis* clave GM (sobrenadante del cultivo) y del extracto de fermentación obtenido por el método de coprecipitación con lactosa-acetona, contra *T. ni* y *H. virescens*, en donde se observa un incremento de la toxicidad al utilizar el extracto de fermentación en lugar del cultivo total de hasta un 64 % de la mortalidad con dosis de 50 µg/ml de dieta, para la cepa GM-58.

III.- PRODUCCION DE *B. thuringiensis* EN FERMENTADORES DE 14 L DE CAPACIDAD TOTAL.

1.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

En la tabla 24 se muestra la composición de los diferentes medios de cultivo y condiciones de fermentación, en donde se puede comparar con el denominado A-1 que nosotros utilizamos, los anteriores medios los encontramos descritos en los datos de resultados de los archivos analizados de las fermentaciones efectuadas a nivel de 14 l, en donde se observa que la fuente de carbono (dextrosa) en los medios de fermentación fue alta comparativamente, a excepción del medio B-4c a la utilizada por nosotros (melaza) para las cepas de *B. thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10.

Tabla 21.- Resultados de bioensayos efectuados para cepas nativas GM de *B. thuringiensis* contra *T. ni.* y *H. virescens.*

Cepa	Dosis (µg/ml)	Toxicidad (% de Mortalidad)	
		<i>Trichoplusia ni</i>	<i>H. virescens</i>
GM-1	500 50	100 92	100 80
GM-2	500	4	12
GM-5	500	16	0
GM-6	500	96	44
	50	32	4
GM-7	500	100	88
	50	100	64
GM-8	500	4	0
	50	0	0
GM-9	500	100	100
	50	96	32
GM-10	500	100	100
	50	92	4
GM-11	500	100	24
	50	32	8
GM-12	500	100	48
	50	24	4
GM-13	500	10	24
	50	0	12
GM-14	500	100	36
	50	88	8
GM-20	500	32	16
	50	12	8
GM-23	500	96	12
	50	8	12
GM-24	500	20	40
	50	16	4
GM-25	500	88	24
	50	8	8
GM-26	500	36	0
	50	24	0
GM-27	500	16	4
	50	20	12
GM-29	500	92	8
	50	8	0
GM-39	500	12	4
	50	4	12
GM-51	500	16	12
	50	4	8
GM-52	500	36	8
	50	8	8
GM-55	500	48	8
	50	12	8
GM-58	500	100	76
	50	80	8
GM-61	500	60	.
	50	32	.
GM-62	500	32	16
	50	20	8
GM-63	500	40	24
	50	20	16
GM-64	500	8	4
	50	20	4
GM-66	500	20	8
	50	16	8
GM-78	500	88	28
	50	32	24
GM-88	500	92	20
	50	12	0
GM-89	500	76	36
	50	40	0

Tabla 22.- Actividad tóxica del extracto almacenado clave 3053 (HD-530) del año 1980 y producido recientemente contra *T. ni*.

Cepas	DL ₅₀ (µg/ml)	Potencia (UI/mg)
HD-1-STD	10.39	16,000
HD-530A	25.71	6,465
HD-530R	64.75	2,566

UI = Unidades Internacionales por mg.
 A = Extracto almacenado clave 3053.
 R = Extracto producido recientemente.
 DL₅₀ = Dosis Letal Media.
 STD = Estándar Internacional.

Tabla 23.- Efecto del uso de cultivo total y extracto en la toxicidad de cepas nativas de *B. thuringiensis* clave GM contra larvas de *H. virescens* y *T. ni*

Cepas	Dosis (µg/ml)	<i>H. virescens</i>			<i>T. ni</i>		
		C.T.	E.	I.	C.T.	E.	I.
GM-58	500	16	76	60	100	100	0
	50	0	16	16	24	80	64
GM-62	500	4	16	12	8	40	32
	50	4	28	24	0	20	20
GM-63	500	0	24	24	8	40	32
	50	12	16	4	0	20	20
GM-64	500	4	8	4	4	8	4
	50	4	4	0	0	20	20
GM-78	500	0	28	28	0	68	68
	50	0	24	24	12	32	20
GM-88	500	8	92	84	20	92	72
	50	0	20	20	0	12	12
GM-89	500	4	36	32	20	76	56
	50	0	0	0	0	40	40

Los valores se expresan en porcentaje de mortalidad.
 Dosis = en µg/ml.
 C.T. = Cultivo total.
 E. = Extracto.
 I. = Porcentaje de Incremento

Tabla 24.- Composición de los medios de cultivo y condiciones de fermentación encontrados en los datos de archivo, para las cepas de *B. thuringiensis* clave HD y los utilizados para las cepas GM-7 y GM-10.

Medio de cultivo	Cepa	Composición (g/l)	Condiciones de fermentación
B-4c	HD-263	Dextrosa (15) Peptona (2) H.S.A. (10) Ext. Lev. (2)	P = 14.3 g/l T = 72 h VF = 9 l
D-9	HD-187	Dextrosa (40) LRM (60)	T = 59 h VF = 9 l
B-8a	HD-241	Dextrosa (40)	VF = 150 l
B-12	HD-263	Harina de Soya ¹ (30) LRM (10)	A = 200 r.p.m. AE = 1.5 VVM
		Dextrosa (30) H. de soya ² (40) LRM (10) CaCO ₃ (1)	VF = 150 l A = 300 r.p.m. AE = 1 VVM T = 45 h
B-13*	HD-635	Dextrosa (30) LRM (20) H. de soya (40)	VF = 125 l A = 400 r.p.m. AE = 1 VVM T = 40 h
A-1**	GM-7	Melaza de caña (20) Harina de soya (20) LRM ³ (10) CaCO ₃ (1)	VF = 7 l T = 30 h

- * = El pH no se controló durante la fermentación, A = Agitación en r.p.m., VF = Volumen de fermentación en el reactor.
 T = Tiempo final de la fermentación, AE = Aereación en VVM, LRM = Líquido de Remojo de Maíz.
¹ = Harina de soya de la marca comercial Proflo.
² = " " " " " " comercial Nutrisoy.
³ = Líquido de remojo de la marca comercial Soluform.
 ** = Este mismo medio de cultivo se usó para GM-10.
 H.S.A. = Harina de semilla de algodón.

2.- Azúcares reductores iniciales y finales del proceso.

En la tabla 25 se muestran los resultados del porcentaje de azúcares reductores consumidos por las cepas de *B. thuringiensis* GM-7 propagadas en fermentadores de 14 l de capacidad total bajo diferentes condiciones variables de agitación (r.p.m.) y de aereación (VVM), de acuerdo a los tratamientos efectuados, en donde se observa un mayor porcentaje de consumo de azúcares (89 %) para las condiciones de 500 r.p.m. y 1 VVM. Por otra parte, el menor porcentaje encontrado de azúcares consumidos fue de un 66 % en las condiciones de 300 r.p.m. y 0.5 VVM. En la siguiente tabla 26 se muestran los resultados de los azúcares iniciales y consumidos para las cepas de *B. thuringiensis* cepa GM-10 bajo diferentes condiciones de agitación y aereación. En los cuatro tratamientos utilizados con 3 repeticiones en donde se observa que la cantidad de azúcares iniciales (g/l) al inicio del proceso de fermentación varió en los diferentes lotes de fermentación.

Tabla 25 .- Resultados de porcentaje de azúcares reductores consumidos por la cepa GM-7, propagada en fermentadores de 14 l de capacidad total.

Condiciones de Ferm.	Azúcares iniciales (g/l)	Azúcares finales (g/l)	Consumo (g/l)
	X ± DS	X ± DS	X ± DS
100-0.75	11.23 ± 1.07	3.93 ± 1.00	7.30 ± 2.00
300-0.5	5.80 ± 1.94	1.73 ± 0.30	4.06 ± 1.97
300-0.75	7.00 ± 0.26	1.86 ± 0.98	5.13 ± 0.72
300-1.0	6.86 ± 0.90	1.50 ± 0.10	5.36 ± 0.80
500-0.75	12.36 ± 1.90	1.73 ± 0.35	10.63 ± 1.76
500-1.0	12.10 ± 2.26	2.50 ± 1.25	9.60 ± 2.60
500-1.25	13.83 ± 0.76	2.46 ± 0.90	11.36 ± 0.72
700-1.0	12.00 ± 0.00	4.56 ± 0.51	7.43 ± 0.51

X = Promedio de tres repeticiones.

DS = Desviación Estándar

Tabla 26 .- Resultados de la cantidad de azúcares iniciales y finales y porcentaje de consumo de azúcares reductores por *B. thuringiensis* GM-10 en fermentadores de 14 l de capacidad total.

Agitación/ Aereación	Azúcares		% de Consumo
	iniciales	finales	
	X ± DS	X ± DS	
500-0.75	13.50 ± 0.96	4.67 ± 1.36	65.4
500-1.0	10.87 ± 1.50	2.70 ± 1.31	75.2
500-1.25	12.67 ± 0.57	3.60 ± 0.60	71.6
700-1.0	13.93 ± 0.70	4.06 ± 0.32	71.0

Producción = g de extracto/l.

X = Al valor promedio de tres repeticiones individuales

DS = Valor de la Desviación Estándar de cada tratamiento.

3.- Resultados de la toxicidad, producción, UFC de esporas en los extractos y coeficiente de rendimiento.

En la tabla 27 se muestran los resultados de la toxicidad para *B. thuringiensis* cepa GM-7 y en la tabla 28 los resultados de la fermentación de GM-7. En la tabla 29 se muestran los resultados de toxicidad para *B. thuringiensis* GM-10 bajo diferentes condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l de capacidad total. En dichos resultados se observa que el mayor rendimiento de esporas fue obtenido bajo las condiciones de 500 r.p.m. y 1 VVM. En la tabla 30 se muestran los resultados de los datos de la fermentación (producción, coeficiente de rendimiento y cuentas de esporas viables) de *B. thuringiensis* GM-10 propagadas en diferentes condiciones de agitación y aereación.

Tabla 27.- Toxicidad de los extractos de *B. thuringiensis* GM-7 producidos en fermentadores de 14 l bajo diferentes condiciones de agitación y aereación.

Ag-Ae	Dosis	% de Mortalidad \pm DS	
		<i>T. ni</i>	<i>H. vi</i>
		X \pm DS	X \pm DS
100 - 0.75	500	100.00 \pm 0.00	80.68 \pm 11.52
	50	8.00 \pm 8.71	18.00 \pm 9.03
300 - 0.50	500	99.49 \pm 1.51	66.37 \pm 35.24
	50	65.15 \pm 33.33	41.55 \pm 21.75
300 - 0.75	500	86.45 \pm 12.49	49.03 \pm 28.66
	50	16.77 \pm 12.66	40.00 \pm 33.39
300 - 1.00	500	74.97 \pm 41.45	23.57 \pm 16.80
	50	51.14 \pm 29.61	12.38 \pm 7.1
500 - 0.75	500	99.53 \pm 1.40	92.43 \pm 8.74
	50	91.11 \pm 11.62	48.34 \pm 14.14
500 - 1.00	500	100.00 \pm 0.00	42.53 \pm 21.84
	50	91.11 \pm 11.62	48.34 \pm 14.14
500 - 1.25	500	99.55 \pm 1.33	87.63 \pm 13.31
	50	93.57 \pm 8.73	48.77 \pm 30.30
700 - 1.00	500	98.61 \pm 2.40	32.78 \pm 17.92
	50	2.50 \pm 1.00	17.34 \pm 3.76

DS = Desviación estándar.

X = Promedio de tres repeticiones.

Tabla 28.- Resultados de los datos de la fermentación de *B. thuringiensis* GM-7 propagada en diversas condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l de capacidad total.

Ferm	Condiciones Agit.	Aer.	Na	Rend.	QO ₂	K _L	% AR Consumidos
1	100	0.75	0.051 ²	0.038	1.34	70	57.0
2	300	0.50	ND	1.780	ND	ND	66.0
3	300	0.75	0.129 ³	1.015	0.12	67	79.4
4	300	1	ND	3.219	ND	ND	80.8
5	500	0.75	0.146 ¹	4.750	0.03	73	83.2
6	500	1	0.203 ²	6.632	0.03	80	89.0
7	500	1.25	0.170 ¹	0.890	0.19	113	83.8
8	700	1	0.047 ¹	2.290	0.02	134	66.6

Agit. = Agitación en r.p.m.; Aer. = Aereación en VVM; Na = g O₂/l x h (Determinado con la presencia de células durante la fermentación); K_L = Hr⁻¹; % AR = Porcentaje de azúcares reductores consumidos; QO₂ = g O₂/gBM x h; Rend. = Rendimiento (g de células secas x litro de medio de cultivo). ND = No determinado.

1 = Valor determinado a las 8 h.

2 = " " " " 10 h.

3 = " " " " 20 h.

Tabla 29.- Toxicidad de los extractos de *B. thuringiensis* cepa GM-10 recuperados a nivel de fermentadores de 14 l de capacidad total y producidos bajo diferentes condiciones de agitación y aereación

Fermentacion (Agit-Aere)	Dosis (µg/ml)	Toxicidad (% Mortalidad)	
		<i>T.ni</i> X ± DS	<i>H.virescens</i> X ± DS
(500-0.75)	500	99.00 ± 1.73	63.33 ± 13.05
	50	62.00 ± 3.60	9.66 ± 2.88
(500-1.00)	500	100.00 ± 0.00	69.00 ± 16.00
	50	96.00 ± 5.77	29.00 ± 6.24
(500-1.25)	500	100.00 ± 0.00	69.66 ± 16.77
	50	88.00 ± 17.00	28.66 ± 8.32
(700-1.00)	500	100.00 ± 0.00	83.00 ± 5.29
	50	90.66 ± 1.52	16.66 ± 8.73

Agit = Agitación en r.p.m. Aer = Aereación en VVM X = Al promedio de tres repeticiones
DS = Desviación estándar

Tabla 30.- Resultados de los datos de la fermentación de *B. thuringiensis* GM-10 propagada bajo diversas condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l de capacidad total.

Condición (r.p.m. - VVM)	Producción ¹	K_{La} ²	N_a ²	UFC/g ¹	$Y_{x/s}$ ¹	Rend. QO_2	
	(g/l)	(Hr ⁻¹)	(g de O_2 /l x h)	(x 10 ⁹)	(g de cél./g s)		
	X ± DS				X ± DS		
500 -0.75	15.26±1.10	44.6	0.1124	22.30	0.149±0.020	1.34	0.084
500 -1.0	13.80±0.72	38.4 *	0.0724*	37.17	0.235±0.055	1.93	0.038
500 -1.25	15.66±1.90	94.0	0.2368	42.77	0.290±0.056	2.52	0.094
700 -1.0	17.80±1.20	133.0	0.3350	57.10	0.387±0.060	3.83	0.087

¹ Los valores de la producción y las UFC/g son el promedio de tres repeticiones.

² El K_{La} y el N_a se determinaron solamente en una repetición.

$Y_{x/s}$ = g de células secas/l.

Producción = g de extracto/l.

X = Promedio. DS = Desviación Estándar.

* Estos valores fueron calculados a las 20 h.

Rend. = Rendimiento (g de células secas/l de medio de cultivo).

QO_2 = Velocidad específica de consumo de oxígeno (g O_2 /g BM x h).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En la tabla 31 se muestran los resultados de cuentas de esporas (UFC) y bioensayos (porcentaje de mortalidad) de las muestras recuperadas por coprecipitación de lactosa-acetona para las cepas de *B. thuringiensis* GM-7 y GM-10 propagadas en fermentadores de 500 y 130 l de capacidad total, respectivamente. Finalmente fue determinado para *B. thuringiensis* GM-7 una DL_{50} a través del análisis Probit de 34.89 μ g/ml para *H. virescens* y de 152.67 μ g/ml para *T. ni*, así como para *B. thuringiensis* GM-10 una DL_{50} de 47.96 μ g/ml para el anterior insecto.

Tabla 31.- Resultados de cuentas de esporas (UFC) y bioensayos de las muestras recuperadas por coprecipitación de lactosa-acetona para las cepas de *B. thuringiensis*. GM-7 y GM-10 propagadas en fermentadores de 500 y 130 l de capacidad total respectivamente.

Cepa	UFC (x g)	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de mortalidad	
			<i>T. ni</i>	<i>H. virescens</i>
GM-10 (1)	7×10^9	500	100.00	84.00
		50	91.60	56.00
GM-7 (2)	115×10^9	500	100.00	92.00
		50	100.00	37.50
GM-7 (4)	95×10^9	500	100.00	87.50
		50	100.00	45.83
GM-7 (5)	33×10^9	500	100.00	95.83
		50	100.00	68.00

(1) Extracto de la cepa recuperado a las 30 h de fermentación.

(2) " " " " " " 30 h " "

(4) " " " " " " 28 h " "

(5) " " " " " " 32 h " "

UFC = Unidades Formadoras de Colonia x g de extracto de fermentación

GM-10 Fue propagada en fermentadores de 130 l de capacidad con 100 l de medio de cultivo.

GM-7 Fue propagada en fermentadores de 500 l de capacidad con 350 l de medio de cultivo.

4.- Cinética del consumo de oxígeno disuelto.

En la figura 5 se muestra la cinética de consumo de oxígeno de *B. thuringiensis* cepa GM-7 bajo diferentes condiciones de agitación y aereación. Ahí se observa que esta cepa bajo condiciones de 100 r.p.m. y 0.5 VVM agotó el porcentaje de oxígeno del fermentador hasta un cero porcentaje en las primeras 4 h de fermentación y así permanece durante el transcurso de la misma hasta el final del proceso. Por otra parte, la cepa GM-7 bajo condiciones de 300 r.p.m. y 1 VVM presentó un cero porcentaje de oxígeno disuelto a las 12 h de fermentación y se mantuvo con un 5 % de oxígeno disuelto dentro del fermentador, hasta el final del proceso de fermentación. Esta misma cepa, bajo condiciones de 300 r.p.m. y 0.5 VVM presentó a las 12 h un 8 % de oxígeno disuelto y así lo mantuvo hasta el final del proceso de fermentación. También se

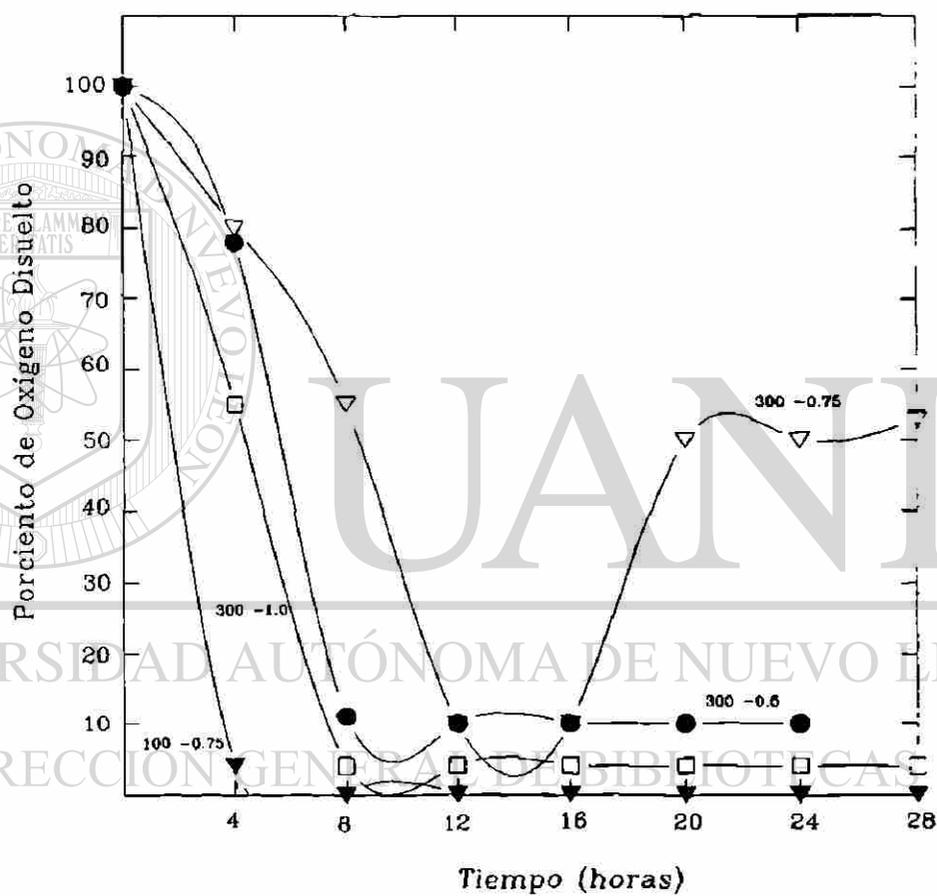


Fig.5.- Consumo de Oxígeno por *B. thuringiensis* cepa GM-7 bajo diferentes condiciones de VVM y r.p.m.

observa un cambio significativo bajo las condiciones de 300 r.p.m. y 0.75 VVM por espacio de 4 h se mantuvo bajo el porcentaje de oxígeno disuelto y a las 24 h de fermentación fue incrementado hasta un 50 % de oxígeno disuelto. Por otra parte, resultó que el más bajo porcentaje de oxígeno disuelto fue a las 8 h de fermentación bajo las condiciones de 500 r.p.m. y 0.75 VVM (28 % de oxígeno disuelto). Contrario a lo anterior fue lo que resultó bajo las condiciones de 500 r.p.m. y 1 VVM, se observa que mantiene un 68 % de oxígeno disuelto a las 8 h de fermentación. Así mismo, bajo las condiciones de 500 r.p.m. y 1.25 VVM, esta cepa mantuvo un 52 % de oxígeno disuelto dentro del fermentador a las 8 h.

En la figura 6 se observa el consumo de oxígeno disuelto para *B. thuringiensis* cepa GM-10 bajo diferentes condiciones de agitación y aereación. Podemos ver que esta bacteria se comporta de una manera muy similar en los 4 tratamientos, como se muestra en la gráfica y que el porcentaje de oxígeno más bajo fue alcanzado a las 12 h de fermentación para las condiciones de 500 r.p.m. y 0.75 VVM y 700 r.p.m. y 1 VVM; sin embargo, en este último tratamiento el porcentaje de oxígeno tiende a incrementarse más rápidamente y después de las 16 h de fermentación se mantuvo arriba de un 90 porcentaje de oxígeno disuelto dentro del fermentador. El porcentaje de oxígeno disuelto fue más bajo para los 2 tratamientos restantes, presentándose a las 16 h. Es importante señalar que la duración del tiempo en el que más bajo permaneció el porcentaje de oxígeno disuelto fue de alrededor de 4 h.

5.- Efecto de la aereación y agitación sobre la producción de *B. thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10.

En la figura 7 se muestran los datos obtenidos relacionados con los efectos de los tratamientos de aereación y agitación a partir de ensayos hechos con el diseño de tratamientos de matriz experimental Plan Puebla I, se sometieron a un graficado bidimensional en el cual el eje de abscisas es el valor ordenado de 0 a 1 del factor agitación siendo 0 = 100 r.p.m. y 1 = 700 r.p.m., respectivamente. Aquí podemos observar que estadísticamente a un nivel de $P > 0.01$, la producción de masa celular es superior en las coordenadas de 0.50,1.00, correspondiendo a valores mayores de 18.0 g de extracto de fermentación seco/l. Estos mismos datos se graficaron tridimensional, observándose la misma tendencia hacia las mismas coordenadas. Por otra parte, los datos se sometieron a un análisis de regresión de los factores aereación, agitación y producción. Los resultados muestran que el de mayor aportación a la suma de los cuadrados del error es el factor agitación, seguido del de

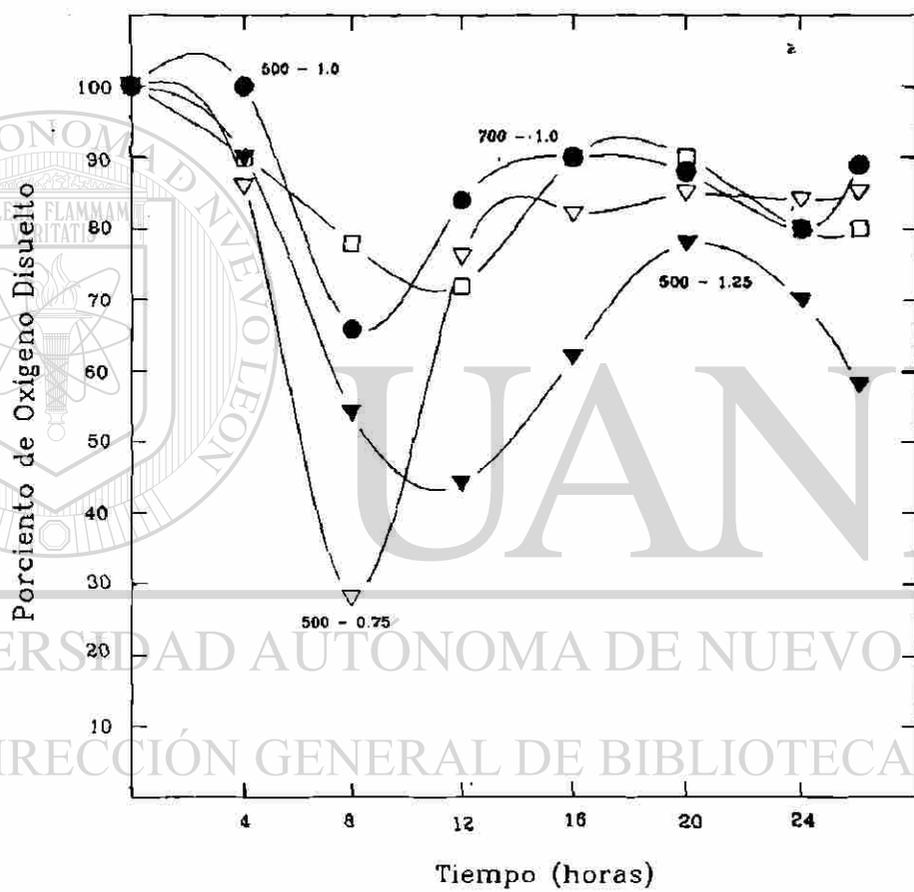


Fig. 6.- Consumo de Oxígeno por *B. thuringiensis* cepa GM-10 en diferentes condiciones de VVM y r.p.m.

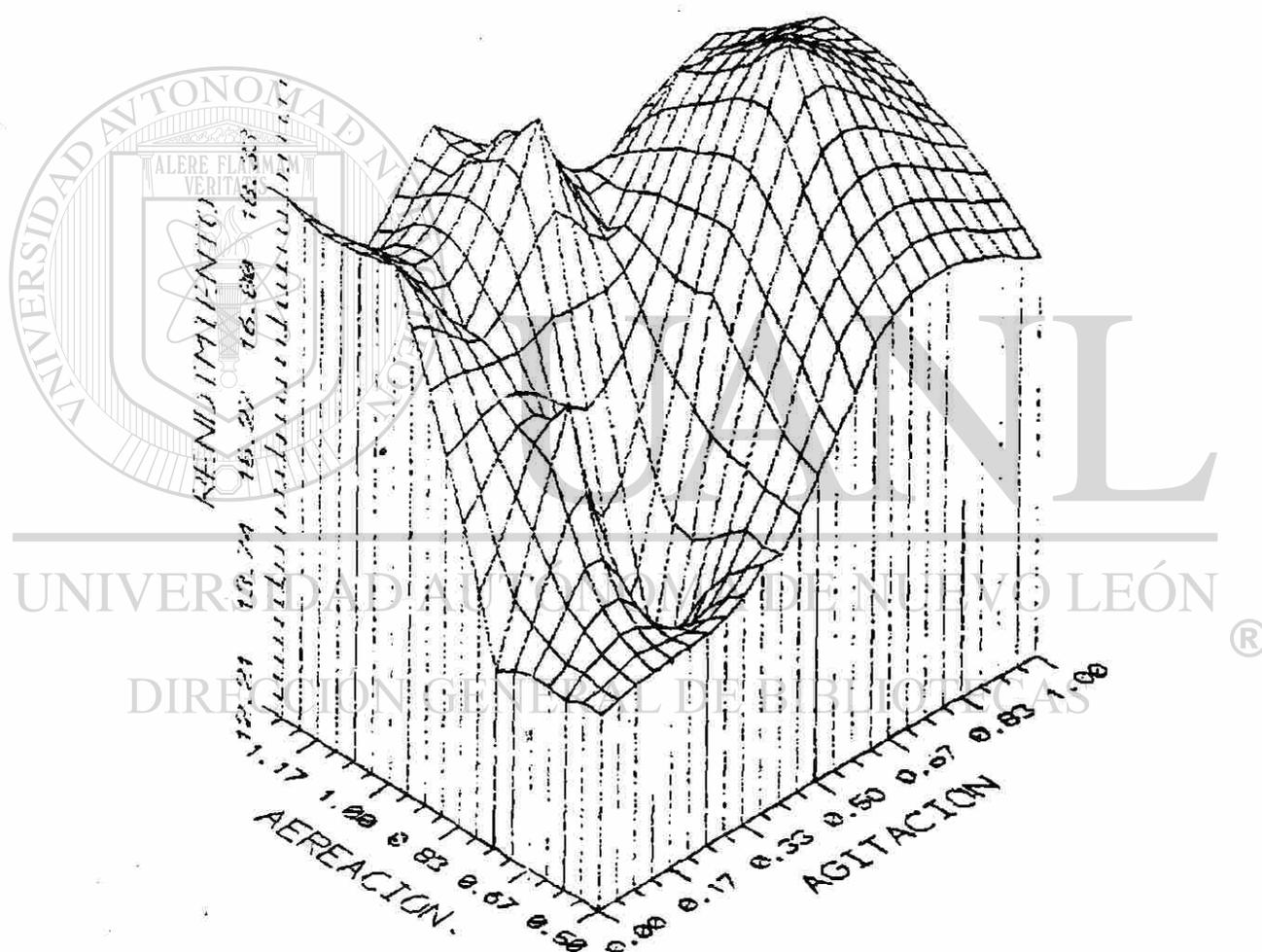


Fig. 7.- Efectos de los diferentes tratamientos (agitación y aereación) sobre la producción de B. thuringiensis cepa GM-7.

aereación, lo cual muestra que la tendencia de la producción es una función cuadrática previamente obtenida por regresión polinomial con el mejor tratamiento estadístico con las coordenadas 0.50, 1. La transformación se efectuó por el método de estandarización de rango que se muestra a continuación:

$$Y = \frac{Y_{obs} - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}}$$

El valor observado del punto óptimo de la función se puede obtener despejando el valor de Y_{obs} de la ecuación, para cuyo caso se tiene un valor de 400 r.p.m. en el factor agitación.

En la figura 8 se muestran los resultados para *B. thuringiensis* cepa GM-10, de acuerdo a los datos encontrados bajo diferentes condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l. Se hizo el mismo procedimiento que en la cepa GM-7, solo que el mejor tratamiento estadístico correspondió a 0.50 de agitación por 1.17 VVM con una producción de 16.6 g de extracto de fermentación seco/l.

IV.- ESCALAMIENTO A NIVEL DE FERMENTADORES DE 130 Y 500 L DE CAPACIDAD TOTAL.

1.- Característica de los fermentadores y condiciones de crecimiento.

En nuestro caso, las cepas nativas de *B. thuringiensis* GM-7 y GM-10 fueron seleccionadas por su mejor actividad contra lepidópteros plagas, específicamente contra *H. virescens* y *T. ni*. El medio de cultivo A-1 donde se obtuvo la mayor toxicidad y rendimiento, fue diseñado a base de melaza, harina de soya y LRM (20:20:10 g/l). Este se usó a nivel de planta piloto en fermentadores de 14, 130 y 500 l de capacidad total, bajo las mejores condiciones de producción y toxicidad, que resultó ser de 500 r.p.m. y 1 VVM en fermentadores de 14 l de capacidad total. En la tabla 16 también se muestran las características de los fermentadores y condiciones que programamos durante el escalamiento del proceso.

Para ambas cepas se utilizó un total de 18 h para la elaboración de pre-inóculos. Se pasaron varias asadas de un tubo de ensayo con agar nutritivo de un

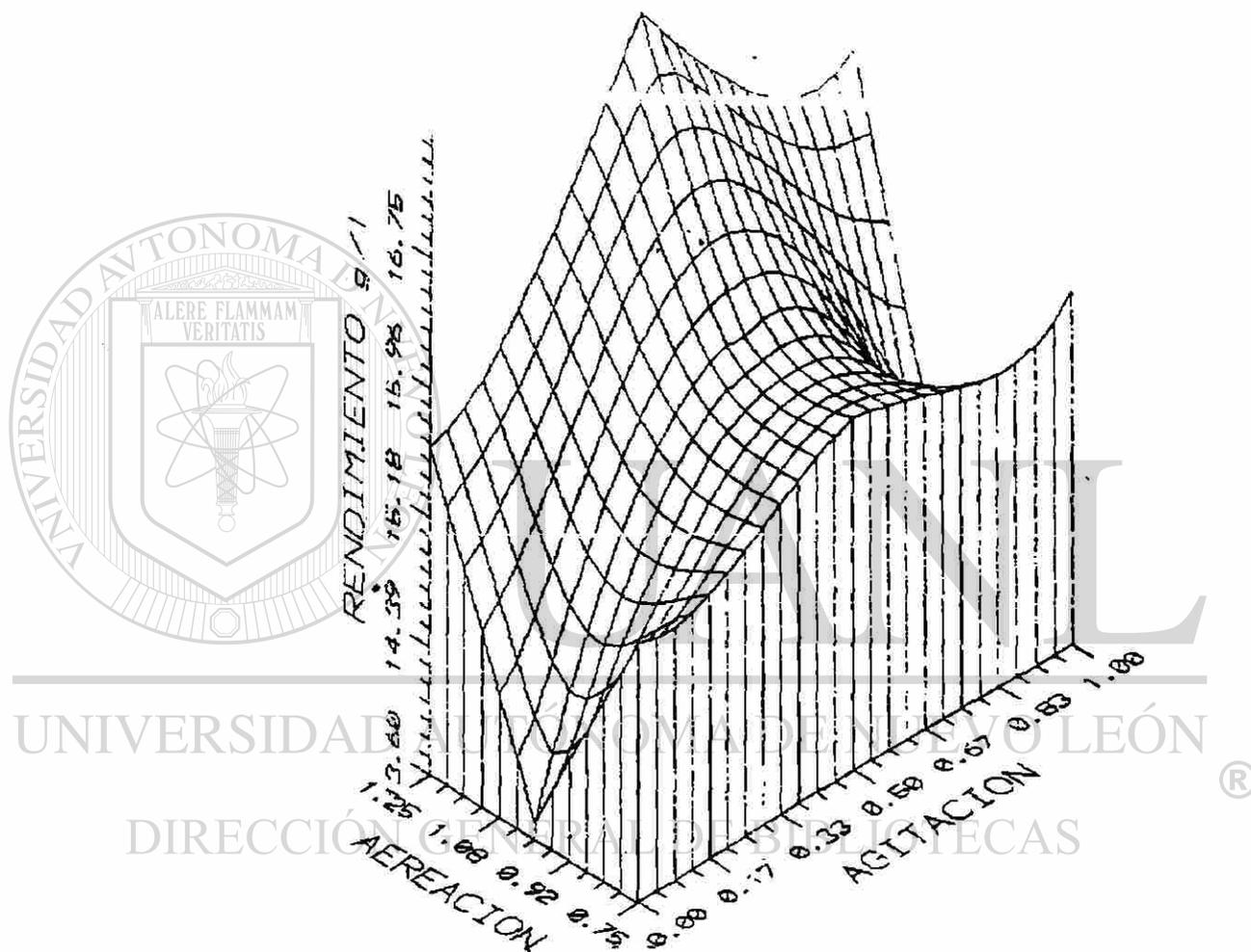


Fig. 8.- Efectos de los diferentes tratamientos (agitación y aereación) sobre la producción de B. thuringiensis cepa GM-10.

cultivo de *B. thuringiensis* de 24 h de edad de las cepas GM-7 Y GM-10, respectivamente, a matraces de 500 ml de capacidad total con 100 ml de medio de cultivo de CTP. Este inóculo se transfirió a fermentadores de 14 l de capacidad total.

Se utilizó un total de 8 h para preparar los inóculos en fermentadores de 14 l, de los cuales se usó un litro para inocular *B. thuringiensis* cepa GM-10 al fermentador de 130 l de capacidad que contenía 100 l de medio de cultivo A-1 (total 1 % v/v de inóculo).

Para *B. thuringiensis* cepa GM-7 el volumen de inóculo que se utilizó fue 3.5 l (1 % v/v de inóculo). Para el fermentador de 500 l que contenía 350 l y para el de 130 l de medio de cultivo se usó una pre-esterilización del agua de cocimiento de maíz (Solufarm), a 121 °C/15 min. Posteriormente se agregaron los demás ingredientes y se volvieron a esterilizar a 121 °C/30 min., como una medida de seguridad para evitar contaminantes, entre los que se encuentran microorganismos que acarrean las materias primas.

2.- Resultados más importantes que se obtuvieron durante el escalamiento para *B. thuringiensis* cepa GM-7 en fermentadores de 500 l y GM-10 en fermentadores de 130 l de capacidad total.

Los azúcares reductores fueron agotados hasta un 20 y un 30 % de azúcares finales en los fermentadores, iniciándose con una concentración de alrededor de 10 g/l. de la melaza utilizada como fuente de carbono.

Se encontró que el porcentaje de oxígeno disuelto con las anteriores condiciones programadas se mantiene continuamente después de las 6 h entre un 5 % y un 10 % hasta el final de la fermentación para la cepa *B. thuringiensis* GM-10; en cambio, para la cepa *B. thuringiensis* GM-7 se mantiene únicamente entre un 5 y 10 % durante 2 h, y posteriormente se incrementa entre un 50 y 55 %. Al final del proceso, a las 23 h de fermentación disminuye de nuevo hasta un 20 %.

En el transcurso del proceso de fermentación se presenta al final una mayor demanda de base que de ácido, utilizándose alrededor de 15 l de ácido clorhídrico diluido al 20 % para controlar el pH a 7 para GM-7 y 5 l para GM-10.

El control de espuma resultó efectivo con el antiespumante de Dow-Corning para ambos experimentos, recomendándose agregar al inicio un ml del concentrado del antiespumante por cada 7 l del medio del cultivo, así como continuamente regular la espuma cuando se requiera, utilizando antiespumante diluido al 20 %.

EL tiempo final de fermentación se completó a las 30 h. Se utilizó para obtener el extracto húmedo de fermentación de GM-7, un tiempo de una hora a 10,000 r.p.m. en una centrífuga Sharples para separar el anterior extracto de 80 l de medio de cultivo de los fermentadores..

3.- Producción y toxicidad.

La producción que se obtuvo finalmente del producto fue de 16.2 g de extracto de fermentación seco/l para la cepa GM-7 y 12.0 g de extracto de fermentación seco/l para GM-10.

En la tabla 31 también se muestran los resultados de los bioensayos que fueron encontrados en los extractos recuperados de *B. thuringiensis* GM-7 y GM-10, que fueron recuperados a diferentes tiempos de fermentación por el método de coprecipitación de lactosa-acetona y secado por aspersion, para las cepas que se propagaron en fermentadores de 500 y 130 l de capacidad total, respectivamente. La toxicidad que fue determinada para los extractos de fermentación secos, de las anteriores muestras de GM-7 y GM-10, se obtuvo para la primera cepa un 100 y 68 % y para la segunda fue un 96 y 56 % de mortalidad, para *T. ni* y *H. virescens*, respectivamente. Las demás muestras recuperadas presentaron igual porcentaje de mortalidad al variar los diferentes tiempos (h) de fermentación, de las muestras de extractos obtenidos durante el proceso.

Finalmente fué determinado un K_{μ} de 145 Hr⁻¹ como el punto clave para las cepas GM-7 y GM-10 para obtener resultados con una buena producción y toxicidad en los extractos recuperados de ingrediente activo al final del proceso de fermentación.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Actualmente, *T. ni* y *H. virescens* son dos insectos lepidópteros plaga de importancia a nivel nacional^{270,282} y mundial.^{46,85,188,216} Es importante mencionar que los plaguicidas biológicos a base de *B. thuringiensis*, por su manejo y experiencia adquirida como producto comercial en las últimas tres décadas a nivel mundial son considerados en nuestro país y a nivel mundial como de menor riesgo en relación a su toxicidad,⁷³ así como por sus características ideales para utilizarse dentro del manejo integral de insectos plaga (Tabla 1).²⁰ También se ha investigado que el desarrollo de resistencia es casi nulo para los insectos blanco¹³⁶ Sin embargo, recientemente se ha demostrado, para *H. virescens*, la presencia de resistencia a *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio.²⁰⁵ Lo anterior nos motivó a la selección de cepas nativas de *B. thuringiensis* para el control biológico de *T. ni* y *H. virescens* a partir de nuestra colección internacional y de extractos de fermentación almacenados de *B. thuringiensis*, para su posterior optimización y condiciones de operación y producción en fermentadores de 14 l de capacidad total, así como su escalamiento del proceso en fermentadores de 130 y 500 l para las cepas seleccionadas

Muy pocos trabajos de investigación se han realizado en relación a la persistencia de la toxicidad de extractos de fermentación almacenados por prolongados períodos de tiempo (10-15 años). El único reporte con que contamos es el del trabajo realizado con extractos de *B. thuringiensis* var *israelensis*, los cuales mantuvieron su potencia después de 8 años de almacenamiento.³²⁷ Sin embargo después de una exhaustiva búsqueda en los bancos de información, no encontramos ningún reporte similar de investigaciones efectuadas con cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros.

En relación a los datos de fermentaciones acumulados por más de 15 años de investigación en fermentadores de 14 y 250 l de capacidad total, se puede concluir que las cepas más potentes encontradas contra *T. ni* y *H. virescens* pertenecen a la var *kurstaki* H-3a3b. Lo anterior concuerda con lo reportado por otros investigadores.^{98,114,285,291}

De acuerdo a nuestros resultados de evaluación de la actividad tóxica de los extractos de fermentación almacenados (42 en total) para la mayoría de las cepas investigadas, la actividad se pierde por el prolongado tiempo de almacenamiento. Las únicas excepciones encontradas fueron para la cepa HD-263 var. *kurstaki*, serotipo

H-3a3b, clave del extracto 3264, producida en 1980, así como las encontradas para los extractos claves 3600, 3770 y 3265 que también pertenecen al anterior serotipo, seguidas de la var. *morrisoni*. Esto podría deberse a que las otras cepas presentan una proteína tóxica del cristal, que se inactiva debido a la actividad de un tipo especial de proteasas.¹⁸ Por lo anterior, resultaría interesante conocer en un futuro los tipos de plásmidos que presentan estas cepas y, en particular, el producto de expresión proteínico (peso molecular) y secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de sus fracciones tóxicas.²¹⁹

En 1970-71, H.T. Dulmage sugirió usar la relación de toxicidad *H. virescens* / *T. ni*, la cual debía ser igual o mayor a uno, como un criterio de selección de cepas de *B. thuringiensis* contra *H. virescens* y *T. ni*.^{83,88,93,96} Resultados de archivo muestran que la actividad tóxica de la cepa HD-263 fue igual a 2.06, mientras que para la cepa HD-241 fue de 0.49. Esto nos indica una mejor efectividad de la cepa HD-263 para los anteriores insectos.

Después de 22 años de almacenamiento, la cepa HD-193 (1971) var *galleriae* clave del extracto 93, al ser ensayada presentó un 96 y 12 % de mortalidad contra *T. ni*, utilizando dosis de 500 y 50 µg/ml de dieta, respectivamente. Otro extracto almacenado de esta misma cepa (clave 2024), después de 14 años, presentó un 32 % de toxicidad para *T. ni* y 28 % para *H. virescens*, con dosis de 50 µg/ml (*H. virescens*/*T. ni* = 0.875). Dentro de la var. *galleriae*, la cepa HD-193 de 1971 presentó la mayor actividad tóxica. Resultados opuestos se obtuvieron con la cepa HD-530 (extracto de 1980), al ser fermentada nuevamente no incrementó su actividad tóxica. Esto podría deberse a la pérdida de solubilidad de la fracción tóxica,²¹⁹ al cambio en la composición del medio de cultivo y/o a la presencia de determinados iones en el medio de cultivo durante su producción.^{83,243,275,278,327,336}

En las cepas tóxicas contra lepidópteros se encontró que después de diez años, algunos extractos poseen 88 % de actividad. Todavía más críticos fueron los resultados encontrados para *H. virescens*, ya que solamente dos muestras presentaron una regular actividad tóxica, encontrándose que un 95 % de las muestras de extractos fermentados y almacenados pierden su actividad tóxica. Esto quizás podría deberse a que la fracción tóxica para *H. virescens* es más sensible al ataque de proteasas y/o menos soluble. Estos resultados concuerdan con lo reportado para la especificidad de las toxinas CryIA(a) y CryIA(c) contra *H. virescens*.¹⁸⁶

Este es el primer reporte donde se demuestra que la actividad tóxica de los extractos de algunas cepas de *B. thuringiensis*, puede conservarse después de más de 10 años de almacenamiento. Este conocimiento nos llevó a proponer un criterio nuevo de selección de cepas de *B. thuringiensis*, el cual involucra su alta persistencia y potencia activa después de ser almacenada. Lo anterior nos daría la ventaja de poder predecir que la cepa seleccionada podría durar más tiempo en condiciones del medio ambiente y/o anaquel. Se puede señalar que esta nueva estrategia para seleccionar cepas de *B. thuringiensis*, agregada a las ya mencionadas,^{3,16} podría ser muy útil como fuente de cepas a partir de las colecciones internacionales (públicas y/o privadas) de extractos de fermentación almacenados, además de las tradicionales, tales como suelo,^{5,70,85,117,313} insectos,^{7,58,60,68,108,178} filoplano,²⁹³ granos almacenados,^{5,210} sitios de alimentación y criaderos de mosquitos.^{8,317,319}

Los resultados de la actividad tóxica de las cepas nativas de nuestra colección (clave GM), muestran la posibilidad de poder seleccionar de entre más de 100 cepas, una o dos cepas con las que se pudiera iniciar la implementación de un proceso a nivel industrial. De las cepas nativas evaluadas contra *T. ni* y *H. virescens*, las mejores en cuanto a toxicidad del extracto recuperado y ensayado fueron las cepas GM-1, GM-7, GM-9, GM-10 y GM-58, todas pertenecientes a la var. *aizawai*. Dentro de estas cepas sobresalen GM-7 y GM-10, al utilizar dosis de 50 µg/ml de dieta. La primera presentó 100 % y 64 %; la segunda 92 % y 4 % de mortalidad contra los anteriores insectos.

A partir de estos resultados (datos de archivo, extractos de fermentación almacenados y de las cepas nativas) se decidió seleccionar las cepas GM-7 y GM-10, las cuales resultaron ser las más tóxicas contra *T. ni* y *H. virescens*. Otra de las razones por la que se seleccionaron estas cepas, fue el hecho de contar con la caracterización del tipo de las toxinas que conforman sus cristales, donde se lograron identificar 4 tipos diferentes de toxinas: CryIA(b), CryIB, CryIC y CryID. Por antecedentes se conoce que CryIC y CryID desarrollan alta actividad tóxica contra insectos del género *Spodoptera*, particularmente contra *S. exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*.⁴⁷ Por lo anterior podemos concluir que la alta toxicidad de las cepas GM-7 y GM-10 contra *T. ni* y *H. virescens*, se podría deber a la presencia de al menos 4 diferentes tipos de toxinas.^{121,247,248,249}

Por lo que respecta a los parámetros de fermentación, así como a la composición de los medios de cultivo, existen muy pocos reportes relacionados con la

toxicidad y los parámetros de producción en fermentadores de 14 l, en particular para *B. thuringiensis* var. *aizawai* en medios de cultivo con melaza como fuente de carbono.^{157,277} Finalmente, los requerimientos de oxígeno para las cepas de *B. thuringiensis* podrían ser la clave para obtener un mayor rendimiento (g de células secas/g sustrato).

Se concluye que dentro del conjunto de conocimientos mínimos para lograr el escalamiento del proceso, es importante determinar las condiciones de agitación y aereación en fermentadores de 14 l de capacidad con los cuales se obtenga la máxima toxicidad y, posteriormente, efectuar la determinación del K_L para ser utilizado como factor de escalamiento en fermentadores de 130 y 500 l, tal como se indica en la Tabla 32. Estos resultados muestran que al cambiar la escala de operación del proceso, de 14 a 130 y 500 l, la toxicidad y la producción se mantienen constantes.

Tabla 32. - Efecto de la escala del fermentador sobre la producción y toxicidad de las cepas GM-7 y GM-10.

Cepa	Escala (l)	K_L	Producción (g/l)	Toxicidad (%)	
				T.ni	H.vi
GM-7	14	145	18.0	91	48
	500	145	16.2	100	68
GM-10	14	145	19.0	90	20
	130	145	12.0	96	56

Escala = Volumen de capacidad total en litros.

K_L = Hr⁻¹.

Producción = Gramos de extracto seco por litro de medio de cultivo.

Toxicidad = % de mortalidad con dosis de 50 µg/ml de dieta.

De los estudios comparativos realizados por Dulmage en fermentadores de 14 l, donde utilizó dextrosa en lugar de melaza en los medios de cultivo B-4ac, D-9, B-8a, B-12 y B-13,³²⁷ lo cual significó un incremento en la producción (g/l); sin embargo, el tiempo de fermentación fue más largo, y se vió una disminución de azúcares reductores en los medios de fermentación al final del proceso. En nuestros experimentos, el remanente de azúcares reductores nos obliga a pensar en reducir la concentración de melaza al inicio del proceso, o bien utilizar dextrosa.^{240,327} Por otra parte, el aumentar los tiempos de fermentación podría significar mayores riesgos con los problemas de contaminación en los medios de cultivo durante la fermentación.

Datos obtenidos de nuestros experimentos apoyan la posibilidad de encontrar, dentro de una misma variedad de cepas, diferentes niveles de toxicidad hacia diferentes insectos. Esto puede deberse a la susceptibilidad de los insectos como un factor intrínscico de éstos hacia las diferentes cepas de *B. thuringiensis*, independientemente de la capacidad tóxica de la cepa probada. Así encontramos que *T. ni* es un insecto muy susceptible a la mayoría de las variedades de *B. thuringiensis*,⁴⁶ a diferencia de *S. frugiperda*, cuya respuesta es de mayor resistencia¹⁵² Una problemática que actualmente enfrentamos en nuestros experimentos, es la baja actividad tóxica del estándar HD-1-S-1980, aún al probarse contra *T. ni*. Por comunicación personal con otros laboratorios, sabemos que éstos tienen el mismo problema.

Por otra parte, se pueden considerar dos puntos de vista cuando se discute acerca de la estandarización de *B. thuringiensis*, lo cual podría ser la causa de la baja toxicidad encontrada en el estándar: el primero es la estandarización industrial, la cual se refiere estrictamente a la necesidad de producir una formulación dada para mantener una calidad constante dentro del producto; el segundo es la estandarización internacional, que se relaciona con la habilidad de comparar productos hechos en diferentes países por diferentes procesos y, frecuentemente, con diferentes variantes o aislados de *B. thuringiensis*.

Como hemos visto, la estandarización internacional ha sido examinada en diferentes foros internacionales, pero siempre con el error en el punto de vista de que la comparación contra un solo estándar podría dar origen a una "estandarización internacional" de las preparaciones. En realidad, si la estandarización de formulaciones de *B. thuringiensis* se llevara a cabo en esta forma, sería necesario el uso del mismo serotipo y de los mismos métodos de producción, etc.

De nuestros resultados experimentales del diseño de medios de cultivo y escalamiento a planta piloto podríamos señalar lo siguiente:

- a).- Mantener un K_{La} de 145 Hr^{-1} resultó adecuado para las cepas de GM-7 y GM-10 durante las pruebas piloto en fermentadores de 500 y 130 l de capacidad.
- b).- La producción para GM-7 fue de 16.2 g/l y para GM-10 de 12.0 g/l de extracto de fermentación seco.
- c).- La potencia para GM-7 fue de 100 % y 68% y para GM-10 de 96 % y 56 % de toxicidad, contra *T. ni* y *H. virescens* respectivamente, al utilizar dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta.
- d).- Es posible investigar la reducción de la concentración de la fuente de carbono (melaza), así como otros agentes para controlar el pH.

Ambas cepas tienen el mismo comportamiento en la producción, de acuerdo con los factores de tiempo de fermentación, aereación y agitación y requerimientos nutricionales, no encontrándose diferencias significativas en la toxicidad de los extractos recuperados.

Los resultados que obtuvimos nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- Conocer y recuperar, como una nueva y valiosa fuente de aislamiento y selección de cepas de *B. thuringiensis*, aquellas depositadas en la colección internacional de extractos de fermentación almacenados de nuestra Facultad, para usarse en control biológico de *T. ni* y *H. virescens*, así como para otros lepidópteros de importancia económica.
- Se demostró que la cepa HD-263 var. *kurstaki* conserva buena actividad tóxica después de más de 12 años.
- De las cepas nativas depositadas en nuestra colección, las cepas GM-7 y GM-10 resultaron ser altamente tóxicas contra *T. ni* y *H. virescens*.

- Es necesario descartar el uso del cultivo total para bioensayos preliminares de selección, puesto que el extracto de fermentación a base de lactosa-acetona asegura una mejor forma de representar al extracto, ya que en la mayoría de los casos aumentó la mortalidad de un 20 hasta un 72 %.

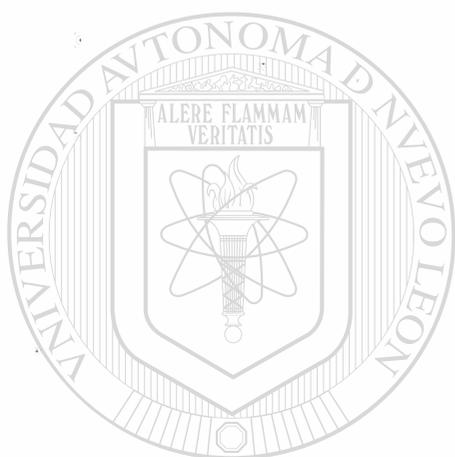
Consideramos que algunos de los logros más importantes de este trabajo son los siguientes:

- Proponemos un nuevo enfoque para la recuperación de cepas de *B. thuringiensis* activas contra lepidópteros plaga de importancia agrícola.
- Encontramos que de nuestras mejores cepas nativas de *B. thuringiensis*, las pertenecientes a la var. *aizawai* son muy atractivas para ser producidas a nivel industrial.
- La aplicación de un modelo estadístico experimental de 2 factores y 8 tratamientos (cada tratamiento por triplicado) en fermentadores de 14 l de capacidad total, para la optimización de condiciones de operación para *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

- Encontramos que un K_L de 145 Hr⁻¹ es un factor de escalamiento confiable en fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total, manteniéndose la actividad tóxica y la producción de las cepas GM-7 y GM-10.

Los resultados muestran que tanto el escalamiento como las condiciones de operación determinadas, funcionan de manera adecuada en ambos niveles de capacidades totales. De la misma manera, la producción de extracto de fermentación (g/l) y toxicidad (% de mortalidad) son similares para ambas cepas de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, y la actividad biológica (% de mortalidad) es superior al estándar y cercana al producto comercial JAVELIN[®]. Por otra parte, la temperatura óptima de fermentación para la producción del complejo espora δ -endotoxina fue de 30 °C y el pH de 7.0. Estos resultados concuerdan con lo reportado para otras cepas de *B. thuringiensis*.^{172,245}

Finalmente, la hipótesis inicial se cumplió por el hecho de haber seleccionado cepas nativas de *B. thuringiensis* y de extractos de fermentación, identificándose dentro de éstas a las cepas nativas más potentes denominadas GM-7 y GM-10, y por el hecho de haber optimizado un proceso para su producción en fermentadores de 14 litros, tomando como criterios principales su potencia (g/l) y su toxicidad, así como por haber logrado su escalamiento en fermentadores de 130 y 500 litros de capacidad total para esas mismas cepas seleccionadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

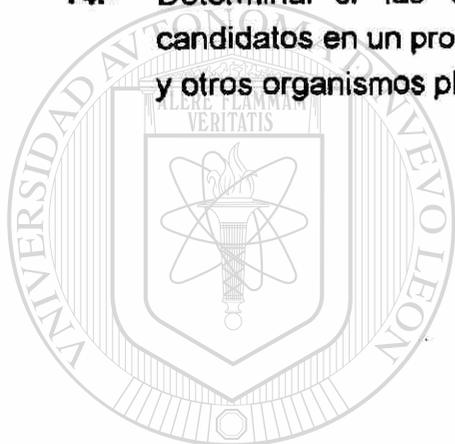


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RECOMENDACIONES

- 1.- Efectuar bioensayos de actividad tóxica de *B. thuringiensis* GM-7 y GM-10 contra otros insectos blanco, tales como *P. xylostella*, *Keiferia* sp., así como contra otro tipo de organismos, por ejemplo protozoarios, nemátodos, etc.
- 2.- En un futuro sería conveniente buscar, como estrategia para una cepa, que su toxina sea más persistente en campo y anaquel.
- 3.- Utilizar como estándar internacional la cepa HD-263 en lugar del estándar actual, ya que la primera demostró mayor estabilidad después de 12 años de almacenamiento.
- 4.- Utilizar los extractos de fermentación almacenados con otros insectos blancos, tales como *S. exigua*, *S. frugiperda* y *P. xylostella*.
- 5.- De acuerdo ^{con} a nuestros resultados se recomienda, para las cepas nativas de *B. thuringiensis* claves GM, buscar dosis de entre 25 y 50 µg/ml de dieta.
- 6.- Determinar la concentración de proteína soluble en los diferentes tipos de extractos almacenados para tratar de relacionar cantidad de proteína soluble con toxicidad.
- 7.- Rediseñar el medio de cultivo denominado A-1, que fue el que se utilizó para *B. thuringiensis* GM-7 y GM-10 a 17.0, en lugar de 20.0 g/l de la fuente de carbono (melaza).
- 8.- Sería interesante probar la producción y toxicidad de nuestras cepas en el medio de cultivo D-19 y B-8a.
- 9.- Investigar la influencia de algunos iones para determinar si incrementan las UFC al final del proceso de fermentación.
- 10.- Se recomienda poner más énfasis en lo referente a la cinética de fermentación para la cepa que sea seleccionada, principalmente al tipo y cantidad de ácido y base utilizados para controlar el pH.

- 11.- Sería deseable tratar de disminuir el tiempo de fermentación al mínimo posible, ya que esto evitaría problemas de contaminación en el transcurso del proceso.
- 12.- Investigar la aplicación del método estadístico de optimización de condiciones de operación utilizado durante este trabajo, para otras cepas que sean seleccionadas contra otros insectos blanco.
- 13.- Explorar el potencial de persistencia de la actividad tóxica de los extractos almacenados contra otros insectos blanco.
- 14.- Determinar si las otras cepas nativas seleccionadas pueden ser buenos candidatos en un proceso industria l para utilizarse contra otros insectos blanco y otros organismos plaga.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LITERATURA CITADA

- 1.- Aiba, S., Humphrey, A.E. y N.F. Millis. 1973. *Biochemical Engineering*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y.
- 2.- Aizawai, K. 1971. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. En: *Microbial control of insects and mites*, Burges D. y H. Hussey (eds.), Academic Press, London. pp 655-672.
- 3.- Aizawai, K., Fujiyoshi, N., Ohba, M. y Yoshikawa. 1975. Selection and utilization of *B. thuringiensis* strain for microbial control, *Proceeding of Intersectoral Congress of IAMS*. Tokyo. 2:597-606.
- 4.- Aizawai, K. 1978. Recent development in the utilization of *Bacillus thuringiensis* preparations in Japon. *International Symposium on Insecticide of Bacillus thuringiensis*. Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China, October 14-18.
- 5.- Aizawai, K. 1987. Strain improvement of insect pathogens. En: *Biotechnology in invertebrate pathol. and cell culture*, K. Maramorosch (ed.), Academic Press, New York, N.Y. pp 3-11.
- 6.- Ali, A. 1981. *Bacillus thuringiensis* serotype *israelensis* (ABG-6108). *J. Invertebr Pathol* 38:264-272.
- 7.- Anderson, R.M. y R.M. May, 1980. Infections disease and population cycles of forest insects. *Sci.* 210:658-661.
- 8.- Anderson, B.T. 1990. Effects of carbon: Nitrogen ratio and oxigen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield bioinsecticidal crystal protein. M.Sc. Thesis. The University of Western Ontario, Canada.
- 9.- Andrews, R.E., Betchel, D.B., Campbell, B.S., Davidson, L.I. y L.A. Bulla. 1981 Solubility of parasporal crystals of *B. thuringiensis* presence of toxic protein during sporulation, germination and outgrowht. En: *Sporulation and germination*, Levinson H.S., Sonenshein A.L. y J.D. Tipper (eds.), American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 174.
- 10.- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*. 173:545-546.
- 11.- Angus, T.A. 1971. *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. En: *Naturally occurring insecticides*, Jacobson M. y D.G. Crosby (eds.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 463.

- 12.- Angusthanasombat, C., Chungjatupornchai, W., Kertbundit, K., Luxananil, P., Settasation, P., Wilairat, P. y S. Panyem. 1987. Cloning and expression of 130-kd mosquito-larvicidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 208:384-389.
- 13.- Arcas, J., Yantorno, O., Arraras, E. y R. Ertola. 1984. A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* 6:495-500.
- 14.- Arcas, J., Yantorno, O. y R. Ertola. 1985. Production of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by batch and fed-batch cultures. 7th. GIAM Conference, Helsinki, Finland.
- 15.- Armstrong, J.L., Rohrmann, G.F. y G.S. Beaudreau. 1985. δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 161:39-41.
- 16.- Aronson, A.I., Angelo, N. y S.C. Holt. 1971. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: Characterization of mutants producing altered amounts of protease. *J. Bacteriol.* 106:1016-1025.
- 17.- Aronson, J.N., Borris, D.P., Doerner, J.F. y E. Akers. 1975. τ -aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 30:489.
- 18.- Aronson, A.I., Beckman, W. y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. En: Microbiological reviews, J.L. Ingraham (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 1-24.
- 19.- Banda, T.J.F. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* y determinación del umbral económico. distribución matemática y muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en maíz criollo, Tesis de Doctor en Ciencias, I.T.E.S.M., División Ciencias Agropecuarias y Marítimas, Monterrey, N.L., México. pp 55-60.
- 20.- Barak, B., Zaritsky, A. y J. Margalit. 1988. The fate of *B. t.* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) in the natural habitat. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis* Hubei. Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China. October 14-18.
- 21.- Barker, R.J. y W.F. Anderson. 1975. Evaluation of beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* for control of flies in chicken manure. *J. Med. Entomol.* 12:103.
- 22.- Baskin, Y. 1987. Testing engineered microbes in the field. *ASM News.* American Society for Microbiology. Washington, D.C. 53:611-614.

- 23.- Bauer, L.S. 1992. Response of the imported willow leaf beetle to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on poplar and willow. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:330-331.
- 24.- Bauer, L.S. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cotton wood leaf beetle. *J. Invertebr. Pathol.* pp 15-25.
- 25.- Becker, N. 1990. Microbial control of mosquitos and black flies. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia. pp 84-89.
- 26.- Becnel, J.J. 1990. *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Ambyosporidae) as a biocontrol agent of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia. pp 56-60.
- 27.- Beegle, C.C. 1979. Use of entomogenous bacteria in agroecosystems. Development in Industrial Microbiology. Elsvier Inc. New York, N.Y. **20**:97-104.
- 28.- Beer, Andrew. 1991. A model agent still waiting to take off? *Agrow*. PJB Publications Ltd. London. No. 141. August 16th. pp 22-24.
- 29.- Bernhard, K. 1986. Studies on the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**:261-265.
- 30.- Betz, F.S., Forsyth, S.F. y W.E. Stewart. 1990. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in North America. En: *Safety of microbial insecticides*, Laird M., Lacey L.A. y E.W. Davidson (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 3-10.
- 31.- Blakebrough, N. y M. Moresi. 1981. Scale-up of whey fermentation in a pilot-scale fermenter. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**:173-178.
- 32.- Bond, R.P.M., Boyce, C.B.C., Rogoff, M.H. y T.R. Shieh. 1971. The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial control of insects and mites*, Burges H.D. y N.W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N.Y. pp 275.
- 33.- Borgatti, A. y G. Guyer. 1963. The effectiveness of commercial formulations of berliner on house fly larvae. *J. Insect Pathol.* **5**:377.
- 34.- Bourque, S.N., Valéro, J.R., Mercier, J., Lavoie, M.C., y R.C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and diferentation of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:523-527.
- 35.- Bowen, N. 1991. World agrochemical markets, PBJ Publication, Richmond, U.K. pp

115.

- 36.- Brauer, H. 1985. Stirred vessel reactors. En: *Biotechnology*, Rehm H.J. y G. Reed (eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 2:395-394.
- 37.- Brauer, H. 1987. Development and efficiency of a new generation of bioreactors, Part I. *Bioprocess Eng.* 2:149-159.
- 38.- Brownbridge, M. y J. Margalit. 1986. New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 48:216-222.
- 39.- Bucher, G.E. 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. *J. Insect Pathol.* 2:172-195.
- 40.- Bulla, L.A. Jr., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I. y P.C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* Boca Raton, Florida. 8:147-204.
- 41.- Burgerjon, A. 1965. Le titrage biologique des cristaux de *Bacillus thuringiensis berliner* par reduction de consommation au Laboratoire de La Miniere. *Entomophaga.* 10:21-23.
- 42.- Burgerjon, A. y H. De Barjac. 1967. Another serotype (4: 4a 4c) of *B. thuringiensis* which produces thermostable toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 9:574-577.
- 43.- Burgerjon, A. y H.T. Dulmage. 1977. Industrial and international standarization of microbial pesticides I. *B. thuringiensis*. *Entomophaga.* 22:121-129.
- 44.- Burges, H.D., Thompson y Latchford. 1976. Importance of spores and δ -endotoxin protein crystals of *B. thuringiensis* in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 27:87-94.
- 45.- Burges, H.D. 1981. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. En: *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*, H.D. Burges (ed.), Academic Press, New York, N.Y. pp 737.
- 46.- Burges, H.D. 1985. Pest lepidoptera on vegetable crops and their control by *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Annual general meeting of the Division for Microbial Control, Society for Invertebrate Pathology Newsletter, England. August.
- 47.- Burges, H.D. 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on pest control with emphasis on genetic manipulation. *J. Mircen.* 2:101-120.
- 48.- Calam, C.T. 1969. The culture of microorganisms. En: *Liquid medium in methods*, R.

Norris (ed.), Academic Press, New York, N.Y. 1:225-326.

- 49.- Carlberg, G. 1973. Biological effects of the thermostable beta-exotoxin produced by different serotypes of *B. thuringiensis*. Academic Dissertation for Public Criticism. Univ. of Helsinki.
- 50.- Carlton, B.C. 1988. Genetic improvements of *Bacillus thuringiensis* as a bioinsecticide. En: Biotechnology biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management, Roberts D.W. y R.R. Granados (eds.), Proceeding of the Center Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University, U.S.A. July 18-20. pp 38-43.
- 51.- Carlton, B.C., Gawron-Burke, C. y T.B. Johnson. 1990. Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new bioinsecticides. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 18-22.
- 52.- Carter, L.J. 1976. Pest control: NAS panel warns of possible technological breakdown. *Sci.* **91**:836-837.
- 53.- Castro-Franco, R. 1989. Variabilidad espacial de variables agronómicas en un predio cultivado con alfalfa. Tesis de maestría en ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah., México.
- 54.- Castro-Franco, R., Arévalo Niño, K. y L.J. Galán-Wong. 1991. Evidencias teóricas sobre la necesidad de desarrollar investigaciones multifactoriales e integradas en biotecnología. Memorias del IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. SMBBAC. Mérida, Yucatán, México.
- 55.- Couch, T.L. y R. Ross. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. and Bioeng.* **22**:1297.
- 56.- Crueger, W. y A. Crueger. 1989. Biotechnology. A textbook of industrial microbiology, Sinauer Associates. Sunderland MA. pp 338-340.
- 57.- Cunningham, J.C. 1988. Baculoviruses. Their status compared to *Bacillus thuringiensis* as microbial insecticides, outlook on agricultural, Pergamon Press, England. **17**:10-16.
- 58.- Cunningham, J.C. 1990. Use of microbials for control of defoliating pests of conifers. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 164-168.
- 59.- Chang, L.T. y Elander. 1986. Long-term preservation of industrially important

- microorganisms. American Society for Microbiology and Biotechnology. Washington, D.C. 5:14-20.
- 60.- Chapman, H.C. y F.E. Glenn. 1972. Incidence of fungus *Coelomomyces punctatus* and *C. dodgi* in larval populations of the mosquito *Anopheles crucians* in two Louisiana ponds. *J. Invertebr. Pathol.* **19**:256-261.
- 61.- Cheung, P.Y.K., Roe, R.M., Hammock, B.D., Judson, C.L. y M.A. Montague. 1985. The apparent *in vivo* neuromuscular effects of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in mice and insects of four orders. *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**:85.
- 62.- Chilcott, C.N., Kalmakoff, J. y J.S. Pillai. 1984. Neurotoxic and haemolytic activity of a protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 259.
- 63.- Chilcott, C.N., Kalmakoff, J. y J.S. Pillai. 1985. Cytotoxicity of two proteins isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals to insect and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**:83.
- 64.- Davidson, E.W. 1982. Bacteria for the control of arthropod vectors of human and animal disease. En: *Microbial and viral pesticides*, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 289.
- 65.- De Barjac, H. y A. Bonnefoi. 1968. A. Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key to their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.* **11**:347-355.
- 66.- De Barjac, H. 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotype 14. *R. Acad. sc. Paris. T. 268, D*: pp 797-800.
- 67.- De Barjac, H. 1989. New facts and trends in bacteriological control mosquitoes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **84**: Sup. III. pp 101-105.
- 68.- De Barjac, H., Sebald, M., Charles, J.F., Cheong, W.H. y H.L. Lee. 1990. *Clostridium bifermentans* serovar. *malaysia* une nouvelle bacteria anaerobie pathogene des larves de moustiques. Et de simules C.R. Acad. Sci. Paris, t. 310, Serie III. pp 383-387.
- 69.- De Barjac, H. y E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga.* **35**:233-240.
- 70.- De Lucca, A.J. II, Simonson, J.G. y A.D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* **27**:865-870.

- 71.- Demain, A.L. y N.A. Solomon. 1986. Industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- 72.- Dharmsthini, S.C., Pantuwatana y Bhumiratana. 1985. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1583 on media using a by-product from a monosodium glutamate factory. *J. Invertebr. Pathol.* **46**:231-238.
- 73.- Diario Oficial de la Federación 1991. Catálogo oficial de plaguicidas 1991, Primera sección, tomo CDLV, No. 13, 19 de Agosto. México, D.F. pp 18-19.
- 74.- Dimock, M.B., Beach, R.M. y P.S. Carlton. 1989. Endophytic bacteria for delivery of crop protection agents. En: Biotechnology, biopesticides and novel plant-pest resistance management, Roberts D.W. y R.R. Granados (eds.), Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York, N.Y. pp 88-92.
- 75.- Dixon, B. 1991. *Bacillus thuringiensis* toxins studied. *Bio/Technology.* **9**:415.
- 76.- Donovan, W.P., Rugar, M.J., Slaney, A.C., Malvar, T., Gawron-Burke y T.B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein toxic to coleoptera species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3921-3927.
- 77.- Drew, S.W. 1981. Liquid culture. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 151-179.
- 78.- Dubois, N.R. 1985. Selection of new more potent strains of *Bacillus thuringiensis* for use against gypsy moth and spruce budworm. En: Microbial control of spruce budworms and gypsy moths, Grimble D.G. y F.B. Lewis (eds.), Proceedings of a Symposium, Windsor Locks, Ct USDA Forest Service, GTR-NE-100, Broomall, PA. pp 99-102.
- 79.- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:232-239.
- 80.- Dulmage, H.T. 1970. Production of the spore-endotoxin complex by variants of *B. thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* **16**:385-389.
- 81.- Dulmage, H.T., Correa, J.A. y A.J. Martínez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:15-20.
- 82.- Dulmage, H.T. y R.A. Rhodes. 1971. Production of pathogens in artificial media. En: Microbial control of insects and mites, Burges H.D. y N.W. Hussey (eds.),

Academic Press, London. pp 507-538.

- 83.- Dulmage, H.T. 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*. Serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol. **18**:353-358.
- 84.- Dulmage, H.T., Boening, Rehnberg y Hunsen. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. J. Invertebr. Pathol. **18**:240-245.
- 85.- Dulmage, H.T. 1972. Distribution abundance and control of *Heliothis* species in cotton and other host plant. Southern Cooperative Series, Bulletin. No. 169. USDA Brownsville, Texas, January. pp 57-64.
- 86.- Dulmage, H.T. 1973. Procedural factors that effect the success of microbial insecticides. Annals of the New York Academic of Science. **217**:187-199.
- 87.- Dulmage, H.T. 1973. Assay and standarization of microbial insecticides. Annals of the New York Academy of Science. **217**:187-199.
- 88.- Dulmage, H.T. 1973. U.S. Assay standard. Report on the adoption of a primary U.S. reference standard for assay formulations containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Bulletin of the Entomology Society of American. **19**:200-202.
- 89.- Dulmage, H.T. y H. De Barjac. 1973. HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of δ -endotoxin. J. Invertebr. Pathol. **22**:273-277.
-
- 90.- Dulmage, H.T. 1975. The standarization of formulation of the δ -endotoxins. Produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **25**:279-281.
- 91.- Dulmage, H.T., Martínez, A.J. y T. Peña. 1976. Bioassay of *Bacillus thuringiensis* (*berliner*) δ -endotoxin using the tobacco budworm. Technical Bulletin. Núm. 1528. Agricultural Research Service. U.S. Department of Agriculture in Cooperation with Texas Agricultural Experimental Station. Brownsville, Texas. pp 1-15.
- 92.- Dulmage, H.T. y Orlin. 1977. A proposed standardized bioassay formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. J. Invertebr. Path. **18**:240-245.
- 93.- Dulmage, H.T. y K. Azawai. 1980. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Nature. Published by U.S.D.A., Brownsville, Texas, U.S.A. No. **4**:209-236.
- 94.- Dulmage, H.T. 1981. Production of bacteria for biological control of insects. En: Biological control of crop production, G.C. Papavizas (ed.), Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun and Co., Totowa, N.J. **5**:129.

- 95.- Dulmage, H.T. y K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker. New York, N.Y. pp 209-237.
- 96.- Dulmage, H.T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis* perspective from, 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. Supl. III. 84:113-122.
- 97.- Edlund, T., Sidén, I. y H.G. Boman. 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. Infect. Immun. 14:934-941.
- 98.- Edwards, D.L., Payne, J. y G.G. Soares. 1989. New isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. European Patent. Application number: 88307309.0, Publication number: 0 305 426 A3.
- 99.- Egorov, N.S., Yudina, T.G. y K.Zh. Loriya. 1980. Effect aeration on synthesis of extracellular protease of *Bacillus thuringiensis*. Biol. Nauki (Moscow). 1:98-99.
- 100.- Egorov, N.S., Loriya, Zh.K. y T.G. Yodina. 1984. Influence of aminoacids of the synthesis of exoproteasa by *Bacillus thuringiensis*. Appl. Biochem. Microbiol. 19:481.
- 101.- Ellar, D.J., Knowles, B.H., Drobniewski, F.A. y M. Haider. 1986. The insecticidal specificity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin may be determined respectively by an inbinding to membrane-specific receptors followed by a commechanism of cytolysis. En: Fundamental and applied aspect invertebrate pathology, Samson R.A., Vlák J.M. y D. Pet (eds.), Foundation of the 4th International colloquium invertebrate pathology, Wageningen, The Netherlands. pp 7-11.
- 102.- Ertola, R. 1987. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. En: Horizons of biochemical engineering, Suichi Aiba (ed.), University of Tokio Press, Japan. pp 187-199.
- 103.- Falcon, L.A. 1971. Use of bacteria for microbial control. En: Microbial control of insects and mites, Burges H.D. y N.W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N.Y.
- 104.- Falcon, L.A. 1971. Microbial control as a tool in integrated control programs. En: Biological control, C.B. Huffaker (ed.), Plenum Press, New York, N.Y. pp 346.
- 105.- Farkas, J., Sebesta, K., Horská, K., Samek, Z. y F. Sorm. 1976. Structure of thuringiensis, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 42:2843-2845.

- 106.- Faust, R.M. 1973. The *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. Current status, Bull. Entomol. Soc. Amer. 19:153-156.
- 107.- Faust, R.M. y Bulla. 1982. Bacterial and their toxins as insecticides microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, New York, N.Y. 3:75-206.
- 108.- Feitelson, J.S., Payne, J. y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond, Bio/Technology. 10:271-275.
- 109.- Fisher, R. y L. Rosner. 1959. Toxicology of the microbial insecticide thuricide, J. Agric. Food Chem. 7:686.
- 110.- Flickinger, M.C., Greenstein, M., Bremmon, C. y J. Conlin. 1990. Strain selection, medium development and scale-up of toyocamycin production by *Streptomyces chrestomyceticus*. Bioprocess Eng. 5:143-153.
- 111.- Foda, M.S., Salama, H.S. y M. Selim. 1985. Factores affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:50-52.
- 112.- Fox, L.J. 1989. Natural pesticide A. challenge to manipulate. Bio/Technology. 7:1004.
- 113.- Freese, E. y Y. Fujita. 1976. Control of enzyme synthesis during growth and sporulation. En: Microbiology-1976, D. Schlesinger (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 164.
-
- 114.- Frost y Sullivan. 1990. Biopesticides: A technology impact report, Frost & Sullivan Inc. New York, N.Y. pp 1-341.
- 115.- Fuxa, J.R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Ann. Rev. Entomol. 32:225-251.
- 116.- Gabriel, C.J. y C.R. Cook. 1990. Biological control the need for a new scientific framework. Bio/Science. 40:204-207.
- 117.- Galán-Wong, L.J., Donalson, G., Dulmage, H.T. y C. Rodríguez Padilla. 1982. Serotipos de *Bacillus thuringiensis* aislados de suelo. XIII Congreso Nacional de Microbiología. Guanajuato, Gto., México.
- 118.- Galán-Wong, L.J. 1983. Isolation and identification of native strains of *Bacillus thuringiensis* from soils in Mexico. International workshop of new methods of isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* and its products. USDA, Brownsville, Texas, U.S.A.

- 119.- Galán-Wong, L.J., Rodríguez-Padilla, C., De Barjac, H., Taméz-Guerra, R.S., Rodríguez-Tovar, M.L., Román-Calderón, E., Dulmage, H.T. y H. Medrano-Roldán 1988. Production and toxicity of strains of *Bacillus thuringiensis* against plague insects of agricultural and modifical importance in Mexico. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis*. Hubei Academy of Agricultural Science. Wuhan, People's. Republic of China, October 14-16.
- 120.- Galán-Wong, L.J., Rodríguez-Padilla, C., Taméz-Guerra, R.S., Gómez-Treviño, M y H.T. Dulmage. 1990. GM-2 A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* n subsp *coahuilensis*. with an unusual form of parasporal inclusion body. Publicaciones Biológicas. FCB-UANL. 4:53-58.
- 121.- Galán-Wong, L.J. y C. Rodríguez-Padilla. 1991. Proceso biotecnológico de plaguicidas de nuevos aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* serovariedad *aizawai* cepas GM-7 y GM-10 efectivas y específicas contra insectos lepidópteros SECOFI. Diciembre. pp 1-32 (Registro de patente de invención en trámite)
- 122.- Galán-Wong, L.J., Rodríguez-Padilla, C., Medrano-Roldán, H., Taméz-Guerra, R.S y H.A. Luna-Olivera. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. México, D.F. pp 1-200. (En prensa).
- 123.- Galichet, P.F. 1966. Administration aux animaux domestiques d'une toxine thermostable secretee par *Bacillus thuringiensis berliner*, en vue d'empecher la multiplication de *Musca domestica* Linnaeus dans les feces, Ann. Zootechnol Paris. 15:135.
- 124.- Garcia, R., Des Roches, B. y W. Tozer. 1981. Studies of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* against mosquito larvae and other organisms. Proc. Calif. Mosq. Vector Contr. Assoc. 49:25-29.
- 125.- Gasser, C.S. y R.T. Fraley. 1992. Transgenic crops. Sci. Am. June. pp 62-69
- 126.- Gaugler, R. y J.R. Finney. 1982. A review of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) as a biological control agent of black flies. Misc. Pub. Entomol. Soc. Amer. 12:1-18.
- 127.- Gawron-Burke, C. y J. Baum. 1991. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes. En: Bacteria genetic engineering, J. K. Setlow (ed.), Plenum Press, New York, N.Y. 13:237-263.
- 128.- Gelernter, W.D. 1990. *Bacillus thuringiensis*, bioengineering and the future of bioinsecticides. Paper presented at, the Brighton Crop protection conference on pests and diseases, Brighton, U.K.

- 129.- Georghiou, G.P., Baker, J., Al-Khatib, Z., Mellon, R., Murray, C., Tran, H., Vasquez, M., Pelsue, F. y J. Hazelrigg. 1983. Insecticide resistance mosquito control research, Annual report 1983, University of California, Los Angeles, E.U.A.
- 130.- Gill, S.A., Dai, S.M., Chang, C., Georghiou, G.P. y E. Chow. 1989. Mosquito resistance to the 72 kDa toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Mosquito control research, Annual report, University of California.
- 131.- Golburg, R.J. y G. Tjaden. 1990. Are B.T.K. plants really safe to eat? *Bio/Technology*. 8:1011-1013.
- 132.- Goldberg, L. y J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*. 37:355-358.
- 133.- Goldberg I., Sneh B., Battat, E. y D. Klein. 1980. Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *B. thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. *Biotechnol. Lett.* 2:419-426.
- 134.- Goldberg, M.I. 1988. New *Bacillus thuringiensis* technology. *ASM News*. Washington, D.C. 54:169-170.
- 135.- Goldberg, M.I. 1989. Protecting corn with natural pesticide proves a challeng. *ASM News*. Washington, D.C. 5:590-591.
-
- 136.- Goldman, I.F., Arnold, J. y B.C. Carlton. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* 47:317.
- 137.- Gómez-Treviño, M., Galán-Wong, L.J., Taméz-Guerra, R.S. y C. Rodríguez Padilla. 1985. Aislamiento y caracterización de una nueva subespecie de *Bacillus thuringiensis*. XVI Congreso Nacional de Microbiología. Durango, Dgo., México.
- 138.- Gordon, R.E. 1977. Some taxonomic observations on the genus *Bacillus*, in biological regulation of vectors: The saprophytic and aerobic bacteria and fungi, NIH-77-1180, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C. pp 67.
- 139.- Gould, F. 1988. Evolutionary biology and genetically engineered crops. *Bio/Science*. 38:26-33.
- 140.- Granados, R.R. 1981. Simposium de insecticidas microbiológicos. Resumen del IV Simposio sobre parasitología agrícola. Instituto Tecnológico y de Estudios

Superiores de Monterrey, Monterrey, N.L., México. pp 8.

- 141.- Greenplate, J.T. y D.A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*. **8**:939-942.
- 142.- Hadley, W.M., Burchiel, S.W., McDowell, T.D., Thilsted, J.P., Hibbs, C.M., Whorton, J.A., Day, P.W., Friedman, M.B. y R.E. Stoll. 1987. Five-month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep, *Fund. Appl. Toxicol.* **8**:236.
- 143.- Hannay, C.L. 1953. Cristaline inclusions in aerobic spore forming bacteria. *Nature*. **127**:1004.
- 144.- Hauffler, M. y S. Kunz. 1985. Laboratory evaluation of an exotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* to hornfly larvae (Diptera: Muscidae) and mice. *J. Econ. Entomol.* **8**:613.
- 145.- Heimpel, A.M. 1955. Investigations of the mode of action of strains of *Bacillus cereus* frankland and frankland pathogenic for the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii* (Htg). *Can. J. Zool.* **33**:311.
- 146.- Heimpel, A.M. y T.A. Angus. 1959. The site action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. *J. of Insect Pathol.* **1**:152-170.
- 147.- Heimpel, A.M. y T.A. Angus. 1963. Diseases caused by certain spore forming bacteria. En: *Insect Pathology: An Advanced Treatise*, E.A. Steinhaus (ed.), Academic Press, New York, N.Y. **2**:21.
- 148.- Heimpel, A.M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis berliner* and other crystalliferous bacteria, *Ann. Rev. Entomol.* **12**:287.
- 149.- Heimpel, A.M. 1971. Safety of insect pathogens for man and vertebrates, in microbial control of insects and mites, Burges H.D. and N.W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N.Y. pp 469.
- 150.- Held, G.A., Bulla Jr., L.A., Ferrari, E., Hoch, J.A., Aronson, A.I. y S.A. Minnich. 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **79**:6065-6069.
- 151.- Henry, J.E. 1971. Experimental application of *Nosema locustae* for control of grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.* **18**:389-394.
- 152.- Hernández, J.L. 1988. Evaluation de la toxicite de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. *Entomophaga*. **33**:163-171.

- 153.- Herrnstadt, C., Soares, G.G., Wilcox, E.R. y D.L. Edwards. 1986. New strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Bio/Technology* 4:305-309.
- 154.- Hofmann, C., Lüthy, P., Hutter, R. y V. Pliska. 1988. Binding of the δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *FEBS Lett.* vol. 85-91.
- 155.- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., VanRie, J., Jansens, S. y H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7844-7848.
- 156.- Höfte, H. y H.R. Witeley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Reviews.* 53:242-255.
- 157.- Holmberg, A., Sievanen, R. y G. Carlberg. 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.* 22:1707-1724.
- 158.- Huber-Lukac, M., Herbst, H., Lüthy, P. y D.G. Braun. 1982. Monoclonal antibodies against functionally distinct sites on the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Experienta.* 38:1103-1105.
- 159.- Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 217:141.
- 160.- Insell, J.P. 1983. Studies on the structure and origin of the parasporal inclusion of sporulating Bacilli. Ph.D. thesis, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.
- 161.- Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe. Flashesire (*sotto*) disease). *Dainihan Sanbshi Kaiho.* 9:1-5.
- 162.- Jain, D. y B.C. Buckland. 1988. Scale-up of the erythromycin fermentation using a computer-controlled pilot plant. *Bioprocess Eng.* 31:31-36.
- 163.- Jamieson, K.B. 1990. Thirty years of *Bacillus thuringiensis*. Research pay off bulletin. *De L'Institut pour la repression des. ravageurs. Forestiers, Canada.* 9:2-7.
- 164.- Jarai, M. 1972. Oxygen transfer in the fermentations of primary and secondary metabolites. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today.* pp 97-103.
- 165.- Jensen, A.L. 1966. Scale-Up of antibiotic fermentations by control of oxygen

- utilization. *Biotech. and Bioeng.* **8**:525.
- 166.- Johnson, M.J. y J. Borkowsky. 1964. Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. *Biotechnol. and Bioeng.* **6**:457-463.
- 167.- Johnson, E. Donovan. 1978. Inhibition of RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by β -exotoxin. *Can. J. Microbiol.* **24**:537-543.
- 168.- Johnson, D.E., Brookhart, G.L., Kramer, K.J., Barnett, B.D. y W.H. McGaughey. 1990. Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the Indian meal moth *Plodia interpunctella*: Comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae. *J. of Invertebr. Pathol.* **55**:235-244.
- 169.- Jutsum, A.R. 1988. Commercial application of biological control: Status and prospects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **318**: 357-373.
- 170.- Kalk, J.P. y A.F. Langlykke. 1986. Cost estimation for biotechnology projects. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain A.L. y N.A. Solomon (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 363-385.
- 171.- Karow, E.O., Bartholomew, W.H. y M.R. Sfat. 1953. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **1**:302-306.
- 172.- Kenney, D.S. y T.L. Couch. 1981. Biological control in crop production. *Beltsville Symposia in Agricultural Research.* **5**:161-180.
-
- 173.- Keynan, A., Evenchik, Z., Halvorson, H.O. y J.W. Hastings. 1964. Activation of bacterial endospores. *J. of Bacteriol.* **88**:313-318.
- 174.- Keynan, A. y Z. Evenchik. 1969. *The bacterial spore*, Academic Press, London. pp 359-396.
- 175.- Keynan, A. 1978. Spore structure and its relations to resistance, dormancy, and germination. En: *Spores VII*, Chambliss G. y J.C. Vary (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 43-53.
- 176.- Klein, M.G. 1988. Pest management of soil-inhabiting insects with microorganisms. *Agric. Ecosystems Environ.* **24**:337-349.
- 177.- Klier, A., Bourgouin, C. y G. Rapoport. 1983. Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. *Mol. Gen. Genet.* **191**:257-262.
- 178.- Klier, A. & G. Rapoport. 1987. *Bacillus* larval. Toxin crystal protein. *Microbiol. Sci.*

4:274-276.

- 179.- Knowles, B.H. y D.J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity, *Biochem. Biophys. Acta.* **924**:509-518.
- 180.- Krieg, A. 1980. The genus *Bacillus*: Insect pathogens. En: *The Prokaryotes*, Starr M., Stolp H., Truper H.G., Balows A. y H.G. Schlegel (eds.), Springer Verlag, New York, N.Y. vol. II. **136**:1743-1755.
- 181.- Krieg, A. y G.A. Langenbruch. 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial control of pests and plant diseases*, H.D. Burges (ed.), Academic Press, London. pp 837.
- 182.- Krieg, A., Huger, A., Langenbruch, G. y W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: A new pathology effective against larvae of coleoptera. *J. Appl. Entomol.* **96**:500-508.
- 183.- Krieg, W., Schnetter, A.M., Huger y G.A. Langenbruch. 1987. *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, strain. BI 256-82 a third pathotype within the H serotype 8a 8b. *System. Appl. Microbiol.* **9**:138-141.
- 184.- Kume, Takashi, Ryo, Taguchi y Hiroh Ikezawa. 1991. Action of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* is significantly influenced by coexisting lipids in substrate-detergent micelles. *Chem. Pharm. Bull.* **39**:2063-2067
-
- 185.- Kume, Takashi, Ryo, Taguchi y Hiroh Ikezawa. 1991. The effects of coexisting lipids on the action of *Bacillus thuringiensis* phosphatidylinositol-specific phospholipase C toward liposomal substrate. *Chem. Pharm. Bull.* **39**:2980-2983.
- 186.- Kurstak, E., Tijssen, P. y K. Maramorosch. 1978. Safety considerations and development problems make an ecological approach of biocontrol by viral insecticides imperative. En: *Viruses and Environment*, Kurstak E. y K. Maramorosch, (eds.), Academic Press, New York, N.Y. pp 571.
- 187.- Kushner, D.J. y A.M. Heimpel. 1957. Lecithinase production by strains of *Bacillus cereus* Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly *Pristiphora erichsonii* (Htg). *Can. J. Microbiol.* **3**:547.
- 188.- Lambert, B. y M. Peteroen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Science.* **42**:112-122.
- 189.- Lane, N.J., Harrison, J.B. y W.M. Lee. 1989. Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by and insecticidally active

bacterial delta-endotoxin. *J. Cell Sci.* **93**:337-347.

- 190.- Lereclus, D., Bourgouin, C., Lecadet, M.M., Klier, A. y G. Rapoport. 1989. Role, structure, and Molecular Organization of gens. Coding for the parasporal δ -endotoxin of *B. thuringiensis*. En: *The regulation of Prokaryotic Development*, Smith, Slepecky y Setlow (eds.), American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 255-276.
- 191.- Li, E. y A.A. Yousten. 1975. Metalloprotease of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **30**:354-356.
- 192.- Linek, Vaclav, Bernes, P. y Vaclav Vacer. 1988. Measurement of the aeration capacity of fermenters. *Chem. Eng. Technol.* **12**:213-217.
- 193.- Lisa, D. Taylor y Williams F. Burke Jr. 1989. Improved procedure for the transformation of the entomopathic microorganisms. *Bacillus sphaericus* 1593. *J. Microbiol. Methods.* **9**:35-39.
- 194.- López, S.H. 1964. Ensayos de purificación de melazas. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México. D.F.
- 195.- Lüthy, P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**:1-7.
- 196.- Lüthy, P. y H.R. Ebersold. 1981. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Pergamon Press, Great Britain. **13**:257-283.
- 197.- Lüthy, P., Cordier, J.L. y H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* a bacterial insecticide: Basic considerations and application. En: *Microbial and viral pesticides*, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 35.
- 198.- Lüthy, P., Hofmann, C. y F. Jaquet. 1985. Inactivation of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by tannin. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**:31-33.
- 199.- Marec, F., Martha, V. y J. Weiser. 1989. Analysis of genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin by means of the *Drosophila* wing spot test. *J. Invertebr. Pathol.* **53**:347-353.
- 200.- Margalit, J. y D. Dean. 1985. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i.*), *J.Am. Mosq. Control Assoc.* **1**:1-7.
- 201.- Martin, P.A.W., Haransky, E.B., Travers, R.S. y C.F. Reichelderfer. 1985. Rapid biochemical testing of large numbers of *Bacillus thuringiensis* isolates using agar dots. *Bio/Tech.* **3**:386-392.

- 202.- Martin, P.A.W. y Russel S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* pp 2437-2442.
- 203.- Mathavan, S. y A. Velpandi. 1984. Toxicity of *Bacillus sphaericus* strains to selected target and non-target aquatic organisms. *Indian J. Med. Res.* **80**:653.
- 204.- McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Sci.* **229**:193-195.
- 205.- McGaughey, W.H y M.E. Whalon. 1992. Managing insects resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Sci.* **258**:1451-1455.
- 206.- McGuire, M.R., Shasa, B.S., Lewis, L.C., Bartelt, R.J. y K. Kinney. 1990. Evaluation of granular starch formulation of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **83**:2207-2210.
- 207.- McGuire, M.R. y B.S. Shasa. 1990. Sprayable self-encapsulation starch formulation for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **83**:1813-1817.
- 208.- McGuire, M.R. 1991. Encapsulation of pesticide in starch. Annual agricultural outlook conference. United States Department of Agriculture. Washington, D.C.
- 209.- Meadows, J., Gill, S.S. y L.W. Bone. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *turbatrix acetii*. *Invertebr. Reprod. Dev.* **17**:73-76.
-
- 210.- Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P. y D. Burges. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1344-1350.
- 211.- Medrano-Roldán, H., Casillas, Solís, Pérez, Sifuentes S., Reveles, V., Galán-Wong, L.J., Rodríguez-Padilla, C. y C. García Gutiérrez. 1987. Production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis* D-1 at pilot plant level and its use on insect pest maize *Spodoptera frugiperda*. 4th European Congress on Biotechnology. Bruselas, Bélgica.
- 212.- Medrano-Roldán, H., Solís, H., Pérez, Casillas, Vega, Córdova, Peraza, García, Rodríguez-Padilla, C. y L.J. Galán-Wong. 1988. Production a bioinsecticide from a native *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* and its application against insect pest maize *Spodoptera frugiperda*. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis*. Whuan, Republic of China. October 14-18.
- 213.- Medrano-Roldán, H. 1992. Estudio sobre los parámetros de fermentación de importancia industrial durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var.

kumamotoensis C-4 para la producción de bioinsecticidas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.

- 214.- Megna, J.C. 1963. Preparation of microbial insecticide. U.S. Patent 3073749.
- 215.- Merryweather, A.T., Weyer, U., Harris, M.P.G., Hirst, H., Booth, T. y R.D. Possee. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta-endotoxin. J. Gen. Virol. 71:1535- 1544.
- 216.- Metcalf, C.L. 1962. Insectos destructivos e insectos utiles. 4ta. Ed. CECSA. México.
- 217.- Middleton, J.C. 1985. Gas-liquid dispersion and mixing. En: Mixing in the process industries, Harnby N., Edwards M.F. y A.W. Nienow (eds.), Butterworth & Co. LTD U.K. pp 322-355.
- 218.- Millar, E. 1965. *Bacillus thuringiensis* in the control of flies breeding in the droppings of caged hens, N.Z.J. Agric. Res., 8:721.
- 219.- Moar, W.J., Trumble, J.T. y B. Frederici. 1989. *Bacillus* a comparative toxicity of spores and crystals from the NRD-12 and HD-1 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to neonate beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 82:1593-1603.
- 220.- Moresi, Mauro y Michele Patete. 1988. Prediction of K_L in conventional stirred fermentors. J. Chem. Tech. Biotechnol. 42:197-210.
- 221.- Moraes, O. y Chaib. 1978. Bioassay for microbial insecticide. Process Biochem. pp 23-24.
- 222.- Morris, O.H. 1982. Bacteria as pesticides: Forest applications. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 239.
- 223.- Munro, R.E. 1961. Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of *B. thuringiensis*. J. Biochem. 81:225-230.
- 224.- Murga, G.M.A. 1983. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-2 en diferentes medios de cultivo. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México.
- 225.- Murphy, R.C. y S.E. Stevens. 1992. Cloning and expression of the cryIVD gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. Appl. Environ. Microbiol. 58:1650-1655.

- 226.- Nakamura, L.K. y H.T. Dulmage. 1988. *Bacillus thuringiensis* cultures available from the U.S. Department of Agriculture, U.S.D.A. Peoria, Illinois. U.S.A. Technical Bulletin No. 1738. pp 1-38.
- 227.- Nambiar, P.T.C., Ma, S.-W. y V.N. Iyer. 1990. Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the pigeon pea (*Cajanus cajan*) by engineering expression of an entomocidal gene in its root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2866-2869.
- 228.- Nei, T. 1969. Freezing and drying of microorganisms. University of Tokyo. Press. Tokyo.
- 229.- Nickerson, K.W. y L.A. Bulla Jr. 1974. Physiology of spore forming bacteris associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation and paraesporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **28**:124-128.
- 230.- Nienow, A. W. 1990. Agitators for mycelial fermentation. *Tibtech.* August. **8**:224-233
- 231.- Norris, J.R. 1978. Microbial control of pest insects. En: Companion to microbiology, Bull y Meadow (eds.), Longman. pp 459-479.
- 232.- Norris, O.N. 1988. Current use of and research on *Bacillus thuringiensis* in Canada. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis*, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China, Oct. 14-18.
-
- 233.- Ode, P.E. y J.G. Matthyse. 1964. Feed additive larviciding to control face fly. *J. Econ. Entomol.* **57**:637.
- 234.- Ohba, M. y K. Aizawa. 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **33**:387-388.
- 235.- Ohba, M., Tantichodok, A. y K. Aizawa. 1981. Production of heat-stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* **38**:26.
- 236.- Ohba, M. y K. Aizawa. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**:277-288.
- 237.- Ohba, M. y K. Aizawa. 1990. Occurrence of two pathotypes in *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Flagellar Serotype 3a:3d:3e). *J. Invertebr. Pathol.* **55**:293-294.
- 238.- Oldshue, J.Y. 1966. Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnol. Bioeng.* **8**:3-24.

- 239.- Orduz, S., William, R., Correa, M.M., Montoya, A.E. y H. De Barjac. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 59:99-103.
- 240.- Padidam, M. 1992. The insecticidal crystal protein CryIa(c) from *Bacillus thuringiensis* is highly toxic for *Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol. 19:109-111.
- 241.- Padua, L.E., Gabriel, B.P., Aizawa, K. y M. Ohba. 1982. *Bacillus thuringiensis* isolated from the Philippines. Philipp. Ent. 5:185-194.
- 242.- Payne, C.C. 1988. Insect pest management concepts: The role of biological control. En: Biotechnology biological pesticides and novel plant. Pest resistance for insect pest management, Roberts D.W. y R.R. Granados (eds.), Proceedings of the Center Boyce Thompson Institute for Plant Research. Cornell University, U.S.A. July. pp 1-7.
- 243.- Pearson D. y O.P. Ward. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnol. Lett. 10:451-456.
- 244.- Pendleton, I.R. 1969. Insecticides of crystal forming bacteria. Process Biochem. pp 29-32.
- 245.- Peralta, G., Delgado, L.J. y A. Ramírez. 1981. Evaluación de diferentes dosis del parásito *Trichograma* sp en los cultivos de la región de Tamaulipas. Norte. IX Reunión Nacional de Control Biológico, Oaxaca, México. pp 120-149.
- 246.- Percy, J. y P.G. Fast. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J. Invertebr. Pathol. 41:86-98.
- 247.- Pereyra-Alfárez, B., Soberón, X. y R. Quintero. 1991. Analysis of several structural parameters of the δ -endotoxin family. First International conference of molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. San Francisco, Cal., E.U.A.
- 248.- Pereyra-Alfárez, B. 1992. Clonación, caracterización y manipulación del gen que codifica para la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10. Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología, U.N.A.M. Cuernavaca, Mor., México.
- 249.- Pereyra-Alfárez, B., Bravo, A., Quintero, R. y X. Soberón. 1992. The δ -endotoxin protein family displays a hydrophobic motif which might be implicated in toxicity. Mol. Microbiol. 6:2095-2098.
- 250.- Pérez, O.C., Rodríguez, M.L. y L.J. Galán-Wong. 1985. Efecto de tres extractos de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* Say

- (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Folia Entomológica Mexicana*. **63**:75-81.
- 251.-Perlark, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. y D.A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*. **8**:939-942.
- 252.- Peterson, J.J. 1985. Nematodes as biological control agents. I. Mermithidae, *Adv. Parasitol.* **24**:307.
- 253.- Petras, S.F. y L.E. Casida. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1496-1501.
- 254.- Pierantonio, P.V. y S.S. Gill. 1992. The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongiensis*. Characterization and screening for insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:295-302.
- 255.- Pimentel, D., Krummel, J., Gallahan, D., Hough, J., Merrill, A., Schreiner, I., Vittum, P., Koziol, F., Back, E., Yen, D. y S. Fiance. 1981. A cost-benefit analysis of pesticide use in U.S. food production. En: *CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*, D. Pimentel (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. vol. II, pp 27.
- 256.- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., Lipner, V., Giordano, S., Horowitz, A. y M. D'Amore. 1992. An assessment based on currently available US data, although incomplete, tallies \$ 8 billion in annual costs. *Bio/Science*. **42**:750-760.
-
- 257.- Prasad, S. y Y.I. Shetna. 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**:517-523.
- 258.- Prasad, S. y Y.I. Shetna. 1976. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Rev.* **47**:70-77.
- 259.- Prasad, S. y Y.I. Shetna. 1976. Mode of action of a purified protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma. *Cells. Antimicrob. Agents and Chemother.* **10**:293-296.
- 260.- Prasertphon, S., Areekul, P. y Y. Tanada. 1973. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in host cadavers. *J. Invertebr. Pathol.* **21**: 205-207.
- 261.- Puchkov, E.O., Govorunova, V.A. y V.P. Babaeva. 1984. Effects of gramicidin D on the exoprotease activity *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **19**:469-472

- 262.- Puzstai, M., Fast, P., Gringorten L., Kaplan, H., Lessard, T. y P.R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* 273:43-47.
- 263.- Quintero, R.R. 1985. Prospectiva de la biotecnología en México. Fundación Javier. Barros Sierra, A.C. CONACYT. México.
- 264.- Quintero, R.R. 1990. Ingeniería bioquímica. Teorías y aplicaciones, Ed. Alhanbra, México.
- 265.- Rajnchapel-Messai, J. 1990. Les biopesticides. *Biofutur*. Juillet/Aout. pp 23-34.
- 266.- Reardon, R.C. 1990. Use of microbials for control of defoliating insects of broadleaved trees. Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 169.
- 267.- Reichelderfer, K.H. 1981. Economic feasibility of biological control of crop pests in biological control in crop production, G.C. Papavizas (ed.), Beltsville Symposia in Agricultural Research, Allanheld, Osmun and Co., Totowa, N.J. 5:403.
- 268.- Rigby, S. 1991. *Bt in Crop Protection*, PJB Publ., Richmond, Surrey, UK.
- 269.- Rishikesh, N., Burges, H.D. y M. Vandekar. 1983. Operational use of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 and environmental safety, mimeographed document WHO/VBC/83.371, World Health Organization.
-
- 270.- Rodríguez Monroy, M., De la Torre Martínez, M. y E. de Urquijo Niembro. 1991. *Bacillus thuringiensis*: Características biológicas y perspectivas de producción. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 33:279-292.
- 271.- Rodríguez-Padilla, C. y L.J. Galán-Wong. 1989. Serotypes of *Bacillus thuringiensis* in Mexico. International Symposium on Biological Control Implementation. McAllen, Texas. pp 185.
- 272.- Rodríguez-Padilla C., Galán-Wong, L.J., De Barjac, H., Calderón, M.E., Taméz-Guerra, R.S. y H.T. Dulmage. 1990. *Bacillus thuringiensis*, subsp. *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *J. Invertebr. Pathol.* 56:280-282.
- 273.- Rodríguez-Padilla, C. y L.J. Galán-Wong. 1992. Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos: Catálogo de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- 274.- Rogoff, M.H. y A.A. Yousten. 1969. *Bacillus thuringiensis* microbiological

- considerations, *Annu. Rev. Microbiol.* **23**:357.
- 275.- Rowe, Gerald E. y Argyrios Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. En: *The Critical Reviews in Biotechnology*, G.G. Stewart y Inge Rusell (eds.), CRC Press. Boca Ratón, Florida. **6**:87-123.
- 276.-Ruper, M.J., Donovan, W.P., Groat, R.G., Slaney, A.C., Mattison, J.W., Johnson, J., Charles, F., Dumanoir, V.C. y H. de Barjac. 1991. Two novel strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3337-3344.
- 277.- Sakharova, Z.V., Ignatenko, Yu. N., Shchul, ts, F., Khovrychev, M. P. y L.I. Rabortnova. 1985. Kinetics of the growth and development of *Bacillus thuringiensis* during batch culturing. *Microbiol.* **54**:483.
- 278.- Salama, H.S., Foda, M.S. y A.M. El-Sharaby. 1981. Potency of spore δ -endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests. *Z. Angew. Entomol.* **91**:388.
- 279.- Salama, H.A., Foda, M.S., Dulmage, H.T. y A.M. El Sharaby. 1983. Novel fermentation media for production of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **41**:8-19.
- 280.- Samples, J.R. y H. Buettner. 1983. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). *Am. J. Ophthalmol.* **95**:258.
-
- 281.- Samples, J.R. y H. Buettner. 1983. Ocular infection caused by a biological insecticide. *J. Infect. Dis.* **148**:614.
- 282.- SARH. 1986. Avances de propuestas de investigación. 1985-1986 en cultivos básicos, CIAPAC-CAETECO. Tecomán, Col., México.
- 283.- Scherrer, P., Lüthy y B. Trumpli. 1973. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis*. As a function of glucosa concentrations. *Appl. Microbiol.* **25**:644-646.
- 284.- Sebesta, K. & K. Horská. 1968. Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*. *Biochem. Biophys.* **164**:281-282.
- 285.- Sebesta, K., Horska, K. y J. Ankova. 1969. Inhibition of the novo RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Collect. Czach. Chem. Commun.* **34**:891.
- 286.- Sekar, V., Thomson, D.V., Maroney, M.J., Bookland, R.G. y M. Adang. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of

Bacillus thuringiensis var. *tenebrionis*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84:7036-7040.

- 287.- Sherman, J. 1992. Pesticides get green. Chemical Engineering. Jan. pp 57-59.
- 288.- Shieh, T.R., Bannockborn y M.H. Rogoff. 1973. Production of exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. United States Patent Office.
- 289.- Sifuentes, J.A. 1978. Plagas del Maíz de México, algunas consideraciones sobre su control. Folleto de divulgación No. 58. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México.
- 290.- Sifuentes, J.A. 1978. Plagas del algodnero en México. Folleto de Divulgación, No. 67. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México.
- 291.- Skot, Leif, Stephen, P., Harrison, Amit Nath, Lancer, Mytton, R. y Brian C. Clifford. 1990. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the δ -endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Plant and Soil. 127:285-295.
- 292.- Smith, R.A. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Can. J. Microbiol. 28:1089-1092.
- 293.- Smith, R.A. y G.A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl. Environ. Microbiol. 57: 311-315.
-
- 294.- Sneath Peter, H.A. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Baltimore. 2:1104-1135.
- 295.- Solomons, G.L. 1969. Materials and methods in fermentation. Academic Press, New York, N.Y.
- 296.- Som, N.C., Ghosh, B.B. y M.K. Majumdar. 1986. Effects of *Bacillus thuringiensis* and insect pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, on mammalian gastrointestinal tract. Indian J. Exp. Biol. 24:102.
- 297.- Soper, R.S. y D.M. LaLeod. 1981. Descriptive apizootiology of an aphis mycosis. U.S. Dept. Agric. Teach. Bull. 1634:1-17.
- 298.- Spalding, B.J. 1992. Agbiotech R. & D. Rise 5 percent. Bio/Technology. August. pp 850.
- 299.- Spalding, B.J. y Bruce Shriver. 1992. First agrobiotech Profit. Bio/Technology. 10:497.

- 300.- Sprenkel, R.K., Brooks, W.M., Van Duyn, J.M. & L.L. Dietz. 1979. The effects of three cultural variables on the incidence of *Nomuraea rileyi* phytophagous lepidoptera, and their predators on soybeans. *Environ. Entomol.* **8**:334-339.
- 301.- Stairs, G.R. 1971. Use of viruses for microbial control of insects. En: *Microbial control of insects and mites*, Burges H.D. y N.W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N.Y.
- 302.- Stanbury, P.F. y Whitaker. 1984. Media for industrial fermentations. *Principles of fermentation technology*. Pergamon Press, London. pp 78-192.
- 303.- Steel, D.G. y J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrial approach. McGraw-Hill, London. pp 1-622.
- 304.- Steinhaus, E.A. 1959. On the improbability of *Bacillus thuringiensis berliner* mutating to forms pathogenic for vertebrates. *J. Econ. Entomol.* **52**:506.
- 305.- Steinkraus, D.C. 1990. Control of vector by the entomophthorales: Current status and future challenges. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 97-101.
- 306.- Stock, C.A., McLoughlin, T.J., Klein, J.A. y M.J. Adang. 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. *Can. J. Microbiol.* **36**:879-884.
-
- 307.- Summer, J.B. 1924. Method 3,5, DNA Acid. *J. Biol. Chem.* **62**:287.
-
- 308.- Thanabalu, T., Hindley, J., Brenner, S., Oei, C. y C. Berry. 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for a biological control of aquatic insect larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:905-910.
- 309.- Thomas, W.E. y D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* **60**:181.
- 310.- Thompson, M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent. Application number: 91305048.0. Publication number: 0 461 799 A3.
- 311.- Tobey, J.F. y A.A. Yousten. 1976. Factors affecting the production of amylase by *Bacillus thuringiensis*. *Dev. Ind. Microbiol.* **18**:499-501.
- 312.- Toumanoff, C. 1953. Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus*

ceruus Frank. and Frank. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf, Ann. Inst. Pasteur. **85:90**.

- 313.- Travers, R.S., Martin, P.A. y C.F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. Appl. Environ. Microbiol. **53:1263-1266**.
- 314.- Trilli, A. 1986. Scale-up of fermentation, En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American society for Microbiology, Washington, D.C. pp 277-308.
- 315.- Turner, J.T., Lampel, J.S., Stearman, R.S., Sundin, G.W., Gunyuzlu, P. y J.J. Anderson. 1991. Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. Appl. Environ. Microbiol. **57:3522-3528**.
- 316.- Turrent-Fernández, A. 1985. El método gráfico estadístico para la interpretación económica de experimentos conducidos con la matriz plan puebla 1. Escrito sobre la metodología de la investigación en productividad. Ed. Colegio de Posgraduados de Chapingo. Chapingo, México. pp 1-64.
- 317.- Umphlett, E.J. 1969. Infections levels of *Coelomomyces punctatus*, an aquatic fungus parasite, in a natural population of the common malaria mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. J. Invertebr. Pathol. **15:299-305**.
- 318.- Undeen, A.H. y N.E. Alger. 1977. Agglutination and immunofluorescent tests for infection of mammals by *Nosema algerae* (Cnidospora: Microsporida). Sci. Biol. J. pp 259.
- 319.- Undeen, A.H. y W.L. Nagel. 1978. The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Goldberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. Mosq. News. **38:524-527**.
- 320.- Vaeck M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. y J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature **327: 33-37**.
- 321.- Valenzuela, I.E. 1987. Microorganismos entomopatógenos. Su aprovechamiento en el control de insectos plaga. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- 322.- Van, Frankenhuyzen, K. y P.G. Fast. 1989. Susceptibility of three coniferophagous *Choristoneura* species (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Econ. Entomol. **82:193-196**.
- 323.- Van, Frankenhuyzen K., Gringorten, J.L., Milne, R.E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R. y L. Masson. 1991. Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest Lepidoptera. Appl.

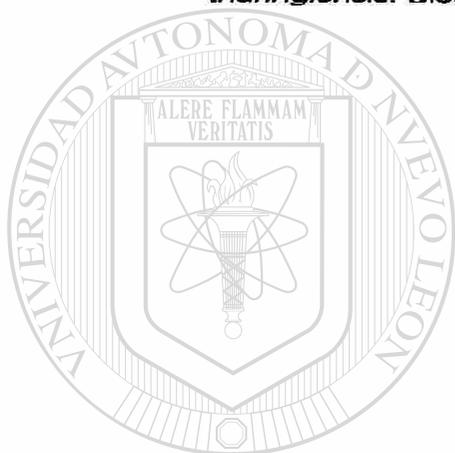
- Environ. Microbiol. **57**:1650-1655.
- 324.- Van, Frankenhuyzen K., Ross, M., Brousseau, R. y L. Masson. 1992. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to Defoliating Forest Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol. **59**:149-154.
- 325.- Van, Rie J., Stefan Jansens, Herman Hofte, Danny Degheele y Herman Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. J. Biochem. **186**:239-247.
- 326.- Van, Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D. y H. Van Mellaert. 1989. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Sci. **247**:72-74.
- 327.- Vandekar, M. y H.T. Dulmage. 1983. Guidelines for production of *B. thuringiensis* H-14. UNDP/World Bank/WHO. Geneva, Switzerland.
- 328.- Vardar-Sukan, F. 1985. Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors, Part I. Operating variables affecting mass transfer. Process Biochem. **20**:181-184.
- 329.- Vardar-Sukan, F. 1986. Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors, Part II. Design variables. Process Biochem. **21**:40-44.
- 330.- Visser, Bert. 1989. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strains. FEMS Microbiol. Lett. **58**:121-124.
- 331.- Waalwijk, C., Dullemans, A. y C. Maat. 1991. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol. Lett. **77**:257-264.
- 332.- Wang, D.I.C., Cooney, CH., Demain, A., Dunhill, H. y A. E. Humphrey. 1979. Fermentation and enzymes technology. John Wiley and Sons. New York, N.Y. pp 374.
- 333.- Whiteley, H.R. y H.E. Schnepf. 1986 The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. **40**:549.
- 334.- World Health Organization. 1986. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. Technical Report Series 737.
- 335.- Xie, Tianjiaw, Wang, Binggao, Zhong, Liansen y WuGixin. 1988. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticide in China. Internacional Symposium on insecticide of *Bacillus thuringiensis*, Hubei, Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China. October 14-18.
- 336.- Yano, T. 1961. Fundamentals studies on the aerobic fermentation VIII. Oxygen

transfer within a mold pellet. *Agr. Biol. Chem.* **25**:580.

337.- Young, I.E. y P.C. Fitz-James. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var *alesti*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**:483.

338.- Young, T.K. y H.T. Huang. 1970. The β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:100-108.

339.- Zamola, B., Valles, P., Meli, G., Miccoli, P. y F. Kajfez. 1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:1079-1086.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS