

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**

**POR**

**M.C. LUIS JESUS GALAN WONG**

**MONTERREY, N.L., MEXICO.**

**MARZO DE 1993**

TD  
Z5320  
FCB  
1993  
G3



1020066522

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 MICROBIOLOGIA**

**POR**

**M.C. LUIS JESUS GALAN WONG**

**MONTERREY, N.L., MEXICO.**

**ABRIL DE 1993**

TD  
Z5320  
FCB  
1993  
G3



**FONDO TESIS**

32613

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

**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

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>LISTA DE TABLAS</b>	vi
<b>DEDICATORIA</b>	ix
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	x
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUCCION</b>	3
<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	4
<b>ANTECEDENTES</b>	5
<b>I     <i>Bacillus thuringiensis.</i></b>	5
1.- Control biológico.	5
2.- Desarrollo.	5
3.- Tipo de toxinas.	7
4.- Mecanismo de acción de la $\delta$ -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
<b>II    <b>Mercado de productos con <i>B. thuringiensis.</i></b></b>	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

<b>III</b>	<b>Biotecnología.</b>	<b>29</b>
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
<b>IV</b>	<b>Bioseguridad y ecología de <i>B. thuringiensis</i>.</b>	<b>45</b>
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
<b>MATERIAL Y METODOS</b>		<b>53</b>
<b>I</b>	<b>Aislamiento, registro, conservación e identificación de cepas de <i>B. thuringiensis</i>.</b>	<b>53</b>
<b>II</b>	<b>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.</b>	<b>53</b>
<b>III</b>	<b>Experimentos a nivel de matraz y fermentadores con las cepas nativas claves GM.</b>	<b>56</b>
<b>IV</b>	<b>Escalamiento del proceso en fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.</b>	<b>64</b>
<b>RESULTADOS</b>		<b>67</b>
<b>I</b>	<b>Cepas y serotipos de <i>B. thuringiensis</i> evaluados y seleccionados.</b>	<b>67</b>
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

<b>II</b>	<b>Bloensayos de las cepas de <i>B. thuringiensis</i>.</b>	<b>68</b>
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
<b>III</b>	<b>Producción de <i>B. thuringiensis</i> en fermentadores de 14 l de capacidad.</b>	<b>73</b>
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
<b>IV</b>	<b>Escalamiento a nivel de fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total.</b>	<b>87</b>
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
	<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>99</b>
	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>101</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Area transversal (m <sup>2</sup> )	Q	Velocidad de flujo
BM	Biomasa	r.p.m.	Revoluciones por minuto
B.	<i>Bacillus</i>	S <sub>E</sub>	Superficie específica (m)
C <sub>l</sub>	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 <sub>50</sub>	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 <sub>s</sub>	Velocidad superficial (m/s)
Hr <sup>-1</sup>	Hora (s) a la menos uno	V <sub>tip</sub>	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 <sub>2</sub>	Velocidad específica de consumo de oxígeno (gO <sub>2</sub> /gBM x h)
K <sub>La</sub>	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Hr <sup>-1</sup> )		
Km <sup>2</sup>	Kilómetro (s) cuadrado (s)		
l	Litro (s)		
l/ha	Litro (s) por hectárea		
lb	Libra (s)		
LMC	Litro de Medio de Cultivo		
m	Constante		
min	Minuto (s)		
ml	Mililitro (s)		
Na	Demanda biológica de oxígeno (g O <sub>2</sub> /LMC X h)		
N <sub>p</sub>	Número de Potencia (adimensional)		
N <sub>Re</sub>	Número de Reynolds (adimensional)		
%	Por ciento		
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno (g/l.h)		
Po	Potencia (kg m/seg, HP)		
P	Presión (atm)		
ppm	Parte (s) por millón		
P <sub>o</sub>	Potencia gaseada (H <sub>p</sub> )		
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H <sup>+</sup>		
PsCl	Proteínas cristal insecticidas		

### SUBINDICE

α	Constante
β	Constante
δ	Constante
γ	Constante
μ	Velocidad específica de crecimiento (Hr <sup>-1</sup> )

### GRIEGAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura No.</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
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

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

<b>13</b>	<b>Clasificación de las proteínas del cristal producidas por <i>B. thuringiensis</i>, de acuerdo a su organización proteica y rango de huésped.</b>	<b>32</b>
<b>14</b>	<b>Clasificación en México, de los plaguicidas según su peligrosidad.</b>	<b>46</b>
<b>15</b>	<b>Pruebas bioquímicas para la identificación de una subespecie de <i>B. thuringiensis</i>.</b>	<b>55</b>
<b>16</b>	<b>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.</b>	<b>65</b>
<b>17</b>	<b>Cepas de <i>B. thuringiensis</i> HD y sus serotipos de datos analizados en los datos de archivo para su selección y evaluación.</b>	<b>67</b>
<b>18</b>	<b>Serovariedades y resultados de los bioensayos de los extractos de fermentación almacenados de las cepas HD evaluadas para su selección.</b>	<b>69</b>
<b>19</b>	<b>Cepas y serotipos a las cuales pertenecen las cepas clave GM nativas de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas.</b>	<b>70</b>
<b>20</b>	<b>Resultados de bioensayos del extracto de fermentación almacenado (HD-263) y comparación de la Dosis Letal Media (<math>DL_{50}</math>) y porciento de mortalidad. Con el estándar internacional y Javelin.</b>	<b>72</b>
<b>21</b>	<b>Resultados de bioensayos efectuados para cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> clave GM contra <i>T. ni</i> y <i>H. virescens</i>.</b>	<b>74</b>
<b>22</b>	<b>Actividad tóxica de extracto almacenado (HD-530) clave 3035 del año 1980 y producido recientemente contra <i>T. ni</i>.</b>	<b>75</b>
<b>23</b>	<b>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>.</b>	<b>75</b>
<b>24</b>	<b>Composición de los medios de cultivo y condiciones</b>	<b>76</b>

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.

<b>25</b>	<b>Resultados de consumo de azúcares reductores de la fermentación de <i>B. thuringiensis</i> GM-7.</b>	<b>77</b>
<b>26</b>	<b>Resultados de consumo de azúcares reductores de la fermentación de <i>B. thuringiensis</i> GM-10.</b>	<b>78</b>
<b>27</b>	<b>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.</b>	<b>79</b>
<b>28</b>	<b>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.</b>	<b>80</b>
<b>29</b>	<b>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.</b>	<b>80</b>
<b>30</b>	<b>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.</b>	<b>81</b>
<b>31</b>	<b>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.</b>	<b>82</b>
<b>32</b>	<b>Efecto de la escala del fermentador sobre la producción y toxicidad de las cepas GM-7 y GM-10.</b>	<b>94</b>

## 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 Ramírez**, 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 París Francia, por su colaboración y amistad brindada durante el inicio de esta línea de investigación.

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

**Dr. Fernando Jiménez 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 **SEIC-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<sup>-1</sup> 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 analized, the ones which resulted much better with respect to its potency and toxicity belong to the serotype 7 var. *atzevati* 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<sup>-1</sup> 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. *atzevati*, strains GM-7 and GM-10 in which toxicity and production criteria are possible 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,<sup>188</sup> la cual produce cuerpos paraesporales también denominados  $\delta$ -endotoxina, que puede contener una o varias diferentes proteínas cristal insecticidas (PsCI) tóxicos para lepidópteros,<sup>158</sup> dípteros,<sup>3,319</sup> coleópteros,<sup>153,182,276</sup> y más recientemente contra nemátodos<sup>86,208</sup> y protozoarios.<sup>310</sup> 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.<sup>188</sup>

Esta bacteria es un bacilo esporulado Gram positivo con flagelos peritricos,<sup>294</sup> a excepción de un biotipo.<sup>69</sup> 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,<sup>69,239,271,272</sup> dentro de los cuales nuestro grupo de investigación en la Universidad Autónoma de Nuevo León aisló y ha aportado dos: *B. thuringiensis* var. *neoleonensis*<sup>272</sup> y *B. thuringiensis* var. *mexicanensis*,<sup>271</sup> serotipos H-24 y H-27, respectivamente.<sup>69</sup> Más recientemente, en Marzo de 1992, se reportó el último grupo H-30, el cual resultó tóxico para dípteros.<sup>239</sup>

Por otra parte, es bien conocido que el cristal glicoproteico de *B. thuringiensis* está formado por polipéptidos denominados  $\delta$ -endotoxina.<sup>325</sup> 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,<sup>333</sup> por ejemplo para lepidópteros, la protoxina es de 120-160 KDa y la toxina de 60 KDa,<sup>190,330</sup> algo muy similar es para dípteros.<sup>12,62</sup> Para coleópteros se ha encontrado una fracción tóxica de 64 KDa.<sup>76,286</sup>

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.<sup>93,114,193,195</sup>

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.<sup>273</sup> A las cepas nativas se les ha denominado con la clave GM, mismas que se han recuperado de suelo, insectos y granos almacenados.<sup>117,118,273</sup>

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,<sup>122,321</sup> 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.<sup>114</sup> 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.<sup>116</sup>

Los insectos son blanco susceptibles al ataque de una gran variedad de microorganismos, entre los que destacan virus,<sup>140,301</sup> bacterias,<sup>3,266</sup> hongos<sup>297,305</sup> y protozoarios.<sup>26,151,300</sup> 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*,<sup>18</sup> y virus han sido estudiados con más detalle.<sup>57,301</sup> *B. thuringiensis* es un producto comercial y de gran uso en el manejo integral de plagas.<sup>242</sup>

#### 2.- Desarrollo.

En 1901, el japonés Ishiwata descubrió a *B. thuringiensis*.<sup>161</sup> 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.<sup>2,93,95</sup>

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.<sup>107,143,146</sup>

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 spora en las células, resultaba indistinguible de *B. cereus*.<sup>231</sup> Transcurrieron 50 años desde el aislamiento original de *B. thuringiensis* antes que la acción tóxica de este microorganismo fuera reconocida.<sup>143</sup>

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.<sup>143,312</sup>

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.<sup>10,47</sup> 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.<sup>143</sup>

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.<sup>4,96</sup> 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.<sup>65</sup>

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.<sup>79,87,89</sup>

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<sup>20,132</sup> y otras especies de dípteros,<sup>124</sup> la cual también implicó un nuevo serotipo.<sup>66</sup> 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.<sup>69,162,163</sup>

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.<sup>163</sup>

### 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.<sup>22</sup>

Esta bacteria y sus variedades sintetizan 7 tipos de toxinas, entre los que se encuentran la  $\alpha$  y  $\beta$ -exotoxinas, la  $\delta$ -endotoxina, "el factor piojo", una bacteriocina (thuricina) y dos inhibidores de la respuesta inmune de los insectos denominados InA e InB.<sup>97</sup> Las dos primeras toxinas presentan efecto plaguicida sobre un amplio espectro de artrópodos,<sup>181</sup> mientras que la  $\delta$ -endotoxina actúa sobre un grupo reducido de insectos, nemátodos, protozoarios<sup>98,209,310</sup> y células tumorales,<sup>258,259</sup> además de presentar otras actividades biológicas como el incrementar la respuesta inmune y actuar como un coadyuvante en mamíferos.<sup>257</sup>

**$\alpha$ -exotoxina**, también denominada lecitinasa o fosfolipasa C (E.C.3.1.4.3),<sup>164</sup> puede ser sintetizada por *B. cereus*.<sup>185</sup> 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.<sup>75</sup>

**$\beta$ -exotoxina**: Una extensa revisión sobre esta toxina ha sido efectuada por Sebesta y col.<sup>284,285</sup> La  $\beta$ -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.<sup>275</sup> Químicamente, la  $\beta$ -exotoxina es una adenina con un residuo de glucosa y ácido alárico.<sup>105,338</sup> Es altamente tóxica para moscas y varios otros tipos de insectos.<sup>42,288</sup> 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,<sup>49,167</sup> 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.<sup>199,285</sup> 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.<sup>114</sup>

**$\delta$ -endotoxina:** De las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, la  $\delta$ -endotoxina es la más importante.<sup>107</sup> 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*.<sup>55,107,196</sup> 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  $\delta$ -endotoxina.<sup>44,197,244</sup> A esta porción se le denomina PsCl.<sup>188</sup> Generalmente, las PsCl son codificadas por genes que se localizan en megaplásmidos, pero algunas también se han localizado en el cromosoma bacteriano.<sup>243</sup>

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.<sup>40</sup>

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  $\delta$ -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  $\delta$ -endotoxina y la  $\beta$ -exotoxina.<sup>154,155,158,179</sup>

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.<sup>51,94,95,130,232</sup> Para la selección de cepas de *B. thuringiensis* se deberán tomar

en cuenta un conjunto de características ideales,<sup>20,39,56,78</sup> 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 triangular<sup>272</sup> y *B. thuringiensis* var. *coahuilensis* (serotipo 8), forma de cristal rectangular.<sup>120</sup> 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.<sup>254</sup>

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.<sup>55,67,96,137,163,226,241,244,265,275</sup>

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> , <b><i>kurstaki</i></b> , <i>kyushuensis</i> , <b><i>morrisoni</i></b> , <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> , <b><i>israelensis</i></b> , <i>kenyae</i> , <i>kyushuensis</i> , <b><i>morrisoni</i></b> , <i>thuringiensis</i> , <i>tolworthi</i> , <i>medellín</i> *
Coleópteros	<b><i>morrisoni</i></b> , <b><i>tenebrionis</i></b> <sup>1</sup> , <b><i>san diego</i></b> <sup>1</sup> , 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.

#### 4.- Mecanismos de acción de la $\delta$ -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*.<sup>246</sup> En 1992, Bauer utiliza el insecticida M-One<sup>R</sup> 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.<sup>23,24</sup>

*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.<sup>189,246</sup> Se concluye que la causa de hinchamiento por la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *san diego* después de aparecer la lisis celular, consiste en un modelo de lisis osmótico coloidal propuesto ya inicialmente.<sup>101</sup> 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  $\delta$ -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.<sup>334</sup> 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  $\delta$ -endotoxina-espora.<sup>188</sup>

N. Becker, de la Universidad de Heidelberg, describe que entre 1981-1989 más de 40,000 ha (400 Km<sup>2</sup>) 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.<sup>28</sup>

*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 Km<sup>2</sup>) 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. *morrisoni* cepa PG-14 y subespecies H y 1 contra *S. vittatum* y *Aedes triseriatus*. Sin embargo, son menos efectivas que *B. thuringiensis* var. *israelensis*.<sup>28</sup>

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*.<sup>168</sup>

Esta bacteria produce varias toxinas que tienen una alta resistencia pasiva a los sistemas inmunes de los huéspedes,<sup>97</sup> aunque la literatura solamente contiene tres reportes sobre el desarrollo de resistencia a la  $\delta$ -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,<sup>74</sup> 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.<sup>168</sup> Algunos investigadores han llamado la atención acerca del desarrollo potencial de la resistencia de plantas modificadas genéticamente,<sup>139</sup> 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,<sup>216</sup> 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.<sup>205</sup>

Finalmente *B. thuringiensis* es un agente de bastante utilidad para utilizarse en el manejo integral de insectos plagas,<sup>52,103,128,178</sup> debido a que el fenómeno de resistencia es casi nulo para los insectos blanco.<sup>129,136,204,328</sup> 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.<sup>2,102,188</sup>

## 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.<sup>28</sup> 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.<sup>34</sup>

#### **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.<sup>322,323</sup> 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 aspersion 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 aspersion y son mejores las aplicaciones en aspersiones en alta (7 l/ha) que en baja (2.4 l/ha).<sup>28</sup>

### **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,<sup>169,172</sup> 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.<sup>75</sup> 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  $3 \times 10^{22}$  moléculas por acre y 80,000 veces más alta que los organofosforados, de los cuales aplican  $10^{24}$  moléculas por acre.<sup>108</sup>

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

#### 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,<sup>231,275</sup> 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.<sup>265,266</sup>

## **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.<sup>188</sup> 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*.<sup>4,5</sup>

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,<sup>46</sup> 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).<sup>46</sup>

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

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.<sup>152,289</sup> Su control a base de productos químicos y liberación de insectos parásitos de huevo no ha sido del todo efectivo.<sup>245,282</sup> 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.<sup>19</sup> Así como *H. virescens*, también constituye una plaga importante en México<sup>290</sup> y en otros países.<sup>85</sup>

Actualmente se conoce que *H. virescens* ha desarrollado una mayor resistencia a los insecticidas químicos tradicionales.<sup>258</sup> Por otra parte, no todas las especies de insectos blanco son igualmente sensibles a la  $\delta$ -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.<sup>270</sup> 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.<sup>73</sup>

## **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  $\delta$ -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

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
		Chícharo
		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 limite

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

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

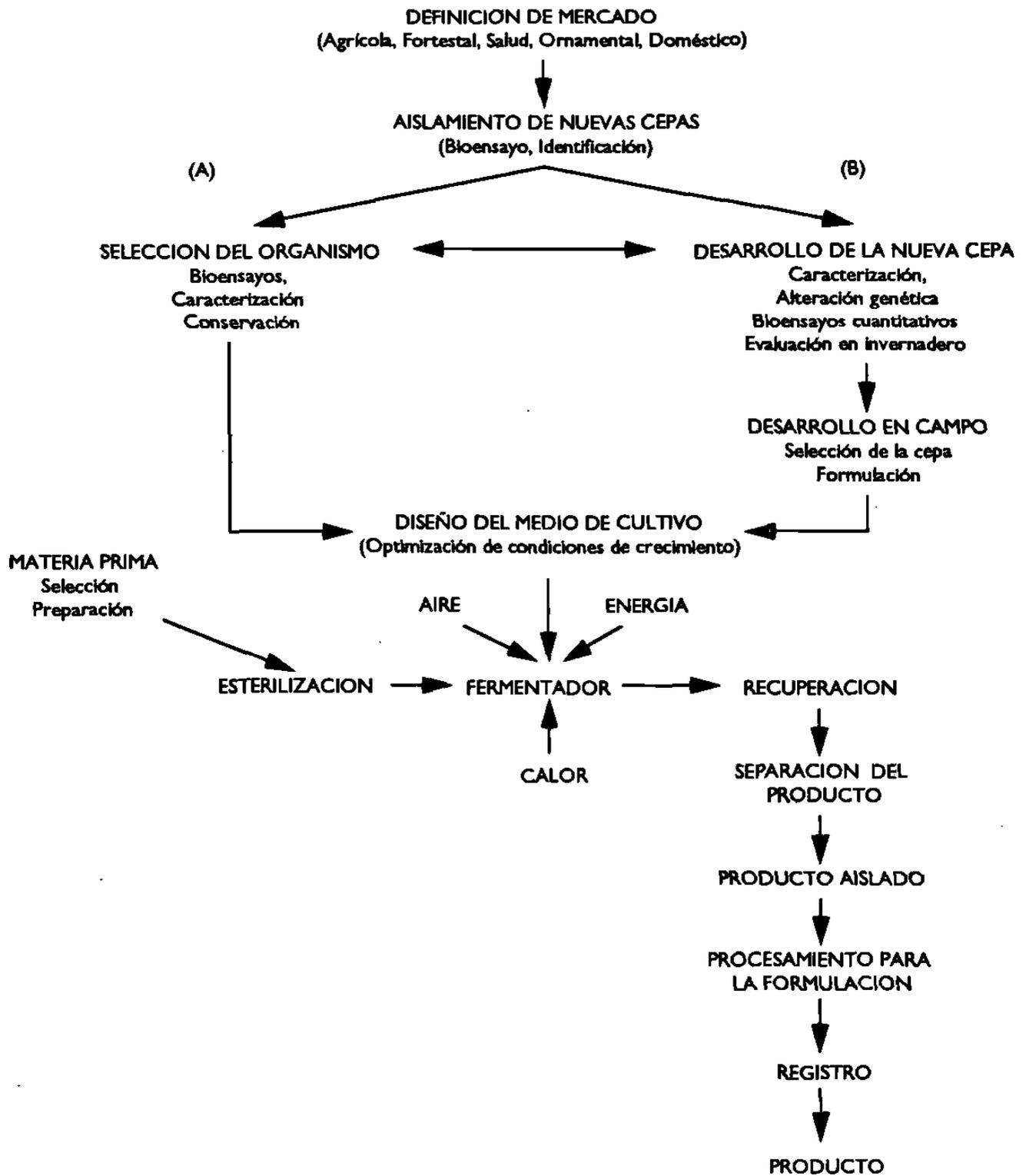


Figura 1.- Esquema de producción de un plaguicida natural o tradicional (A) y de nueva generación (B) de *B. thuringiensis*.

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.<sup>51</sup>

## 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.<sup>35</sup> 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 %.<sup>265</sup> 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.<sup>268</sup>

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,<sup>256</sup> 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*.<sup>265</sup> Es importante señalar que en 1989, se sembró en Estados Unidos un total de 28 millones de hectáreas de maíz (0.27 millones de Km<sup>2</sup>), para lo cual se utilizaron 9,090 toneladas de diversos productos químicos para el control de los insectos plagas en esta superficie,<sup>135</sup> razón que justifica más la búsqueda de nuevas cepas bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis*.<sup>134</sup>

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 Km<sup>2</sup>), 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.<sup>251</sup> 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.<sup>177</sup>

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.<sup>287</sup> 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.<sup>112</sup>

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.<sup>298,299</sup> 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*.<sup>114</sup>

## **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.<sup>275</sup>

**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,<sup>222</sup> así como otros de importancia forestal que fueron eficientemente controlados en Canadá.<sup>232</sup>

**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.<sup>275</sup>

**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  $\delta$ -endotoxina secas sin diluir, son utilizados en dosis de 1 Kg/ha para mosquitos y de 0.2 mg/l y para moscas negras.<sup>25,38,64,200</sup>

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

COMPAÑIA	ACTIVIDAD	ESTADO COMERCIAL		No. de PATENTES EN USA (desde el 1-1-88 al 31-12-91)
		DE	<i>B. t.</i>	
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 (muestras) "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

P= productos, L= laboratorio, PC= pruebas de campo, P=C= pruebas de gran escala, GC= gran escala P=E= pequeña escala Tomado de Feketeon 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.<sup>20,267</sup>

### 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.<sup>47,133</sup>

La estabilidad de la  $\delta$ -endotoxina en el medio ambiente es muy baja, ya que diversos factores ambientales, tales como la luz solar<sup>262</sup> y el contenido y tipos de taninos del follaje de los cultivos, actúan negativamente sobre ella.<sup>198</sup> 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,<sup>331</sup> dándole a la toxina una cápsula biológica, y más recientemente, formulaciones de ingrediente activo encapsulado y microencapsulado sobre matrices de almidón de maíz.<sup>206,207,208</sup>

Otro de los problemas que se pueden presentar para que la  $\delta$ -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.<sup>227,306</sup> 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.<sup>291</sup> 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.<sup>315</sup>

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.<sup>126</sup> Sin embargo, las esporas-cristales se pierden del área de alimentación de la larva rápidamente por sedimentación. La clonación del gen de la  $\delta$ -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.<sup>225,306</sup>

Otra opción para el control de insectos plaga ha sido la clonación del gen de la  $\delta$ -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.<sup>215</sup>

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.<sup>320</sup> Actualmente otras plantas, tales como tabaco, algodón, tomate o papa, pueden ser protegidas contra insectos que causan grandes pérdidas económicas.<sup>50,141</sup> Se espera que para mediados de los 90's se encuentren disponibles comercialmente las primeras plantas transgénicas.<sup>125</sup>

Considerable investigación ha sido enfocada a 3 grandes áreas generales: la localización de los genes que codifica para la estructura de la proteína  $\delta$ -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*,<sup>150</sup> 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.<sup>76,108,158</sup>

## 2.- Medios de fermentación.

La producción de bioinsecticidas requiere del diseño de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento,<sup>14</sup> esporulación y formación de la  $\delta$ -endotoxina.<sup>111,214</sup> 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.<sup>292</sup>

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.<sup>100</sup> 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.<sup>94</sup> Dulmage, en 1981, reporta que la omisión de estos suplementos retarda la esporulación y reduce la producción de la  $\delta$ -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.<sup>133</sup>

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  $Fe^{+2}$ .<sup>229</sup> 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  $K_2HPO_4$ .<sup>111</sup>

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
CryIIIB2 ***	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 espóra- $\delta$ -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  $\delta$ -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  $\delta$ -endotoxina en un medio que contiene (g/l): Dextrosa 5.0; extracto de levadura 2.0;  $K_2 HPO_4$  1.0;  $KH_2PO_4$  1.0; y recomienda el uso de sustratos baratos como harina de semilla de algodón y harina de soya.<sup>82,83</sup> Posteriormente, en 1971, recuperó complejos espóra- $\delta$ -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  $\delta$ -endotoxina producida por las diferentes cepas varía ampliamente en relación al serotipo y medio de cultivo.<sup>80</sup> 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.<sup>82,83,86,250</sup>

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  $\delta$ -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  $200 \times 10^3$  UI/mg.<sup>89</sup>

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 espóra 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 %.<sup>283</sup>

Goldberg y col., (1980) describieron un medio de fermentación para la producción de complejo espora  $\delta$ -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;  $\text{H}_2\text{PO}_4$  7 ml;  $\text{MgSO}_4$  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  $4 \times 10^9$  UFC/ml en 60 h de operación aproximadamente.<sup>133</sup>

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.<sup>55</sup>

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.<sup>196</sup>

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)  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . 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.<sup>224</sup>

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  $\delta$ -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  $\delta$ -endotoxina con apreciable actividad insecticida contra *Heliothis 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*.<sup>279</sup>

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.<sup>72</sup>

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.<sup>127</sup>

Poca información ha sido publicada en relación al efecto de la fuente de carbono sobre la velocidad de crecimiento o rendimiento. Arcas y col.<sup>13</sup> 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,<sup>111,119,120</sup> almidón,<sup>224,244</sup> 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  $6.5 \times 10^9$  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.<sup>243</sup>

En las especies de *Bacillus* sp. es necesario que los mecanismos de síntesis de proteasas se activen para lograr una buena esporulación,<sup>16</sup> 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,<sup>327</sup> 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.<sup>194</sup> 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.<sup>113,197</sup>

#### 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.<sup>197</sup> Como metabolitos primarios intermediarios se forma piruvato, acetato y poli- $\beta$ -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.<sup>311</sup> 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;<sup>100</sup> 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.<sup>100</sup> El efecto del oxígeno<sup>99</sup> y el gramicidín D<sup>291</sup> 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,<sup>157,277</sup> y en particular, para *B. thuringiensis* en medios de cultivo complejos. Holmberg y col.<sup>157</sup> encontraron los siguientes parámetros para *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*: velocidad de crecimiento específica de 1.3 a 1.4 Hr<sup>-1</sup>. 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.<sup>277</sup> 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.<sup>113</sup>

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

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,<sup>100</sup> 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  $\gamma$ -aminobutírico a glutamato se incrementa marcadamente durante la fase temprana de esporulación.<sup>17</sup> Finalmente, después de que los ácidos orgánicos han sido utilizados, empieza una fuerte producción de exoproteasas.<sup>274</sup>

#### **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.<sup>9</sup> 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.<sup>173,174,175,191</sup>

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.<sup>337</sup> Estos son usados para la síntesis de proteínas o como fuentes de energía y carbono.<sup>223</sup> 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.<sup>223</sup> Una buena producción es de 5 a 10 x 10<sup>9</sup> esporas/ml.<sup>197</sup>

#### **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  $\delta$ -endotoxina.<sup>160</sup> La producción óptima de la  $\delta$ -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.<sup>94</sup>

Para el crecimiento se requiere el oxígeno.<sup>164</sup> 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 10<sup>5</sup> células/g de oxígeno.<sup>115</sup> 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.<sup>197</sup> Esta activación del ciclo del ácido tricarboxílico 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<sup>-1</sup> a 0.95 Hr<sup>-1</sup>, mientras que el Yx/s se incrementó lentamente, indicando limitaciones de oxígeno en el crecimiento.<sup>157</sup> 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.<sup>94,197,339</sup>

En los procesos de oxidación incompleta, uno de los aspectos mas 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.<sup>302</sup>

La demanda de oxígeno de un proceso de fermentación se satisface normalmente mediante aereación y agitación del caldo de fermentación.<sup>171,192</sup> 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*.<sup>83,86,211,213,270</sup>

#### 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.<sup>37,171</sup>

En un fermentador agitado convencional, la agitación tiene las siguientes funciones básicas:<sup>36,230</sup> 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",<sup>217,329</sup> ya que produce los valores de  $K_L$  más altos y simultáneamente proporciona altas velocidades de corte o turbulencia.<sup>328</sup>

#### 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.<sup>31,110,162,165,263</sup>

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).<sup>264</sup>

- 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,<sup>238</sup> 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.<sup>1</sup>

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

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  $K_L$ .<sup>264</sup>

## 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 mas costoso.<sup>29,327</sup> 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.<sup>20</sup>

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 mas 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.<sup>80,81</sup> 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.<sup>122,211,321,327</sup>

## 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  $\delta$ -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.<sup>79,87,88,90</sup>

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.<sup>81,84</sup> 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.<sup>79</sup>

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.<sup>87</sup> 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.<sup>27,92</sup> A partir de 1980 se han realizado infructuosos esfuerzos por encontrar cepas con mayor potencial que las ya existentes,<sup>122</sup> 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.<sup>96</sup>

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.<sup>324</sup>

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.<sup>43</sup> 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,<sup>73</sup> 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,<sup>70,236,253,313</sup> granos almacenados,<sup>120,210</sup> insectos,<sup>95,260</sup> así como sitios de alimentación de insectos.<sup>20,200</sup>

En 1989, Martin y col. encuentran que *B. thuringiensis* es un microorganismo ubicado en suelo, usando muestras de suelo,<sup>202</sup> 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



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.<sup>201</sup>

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.<sup>236,237</sup> 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).<sup>234</sup> 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.<sup>234</sup>

### 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,<sup>131</sup> 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  $\beta$ -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*,<sup>104</sup> 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.<sup>268</sup>

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.<sup>30</sup>

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.<sup>30</sup>

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.<sup>255,256</sup>

Hadley y col. iniciaron un estudio de infectividad/toxicidad oral durante 5 meses con *B. thuringiensis* en borregos.<sup>142</sup> 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,<sup>296</sup> 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.<sup>296</sup>

Dentro de la literatura han sido reportados raros casos de patogenicidad en mamíferos por *B. thuringiensis*. Una salpicadura accidental de Dipel<sup>®</sup> (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*.<sup>280,281</sup> Así mismo, existe un reporte de una mastitis bovina fatal causada por *B. thuringiensis*.<sup>138</sup> 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*.<sup>159</sup>

En 1960, aparecieron varios reportes mencionando que ciertas cepas de *B. thuringiensis* producen una exotoxina estable al calor.<sup>32,106,148,235</sup> Posteriormente se han descubierto 4 unidades tóxicas en cultivos de bacterias cristalíferas, entre los que se encuentran:  $\alpha$ -exotoxina,<sup>145,148,187,312</sup>  $\beta$ -exotoxina,<sup>41,147,149</sup>  $\delta$ -endotoxina y  $\gamma$ -exotoxina.<sup>147,148</sup> 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.

**$\delta$ -endotoxina:** Pruebas de seguridad han sido efectuadas para las cepas productoras de  $\delta$ -endotoxina, en particular *B. thuringiensis* var. *israelensis*.<sup>6</sup> Estas pruebas han demostrado ser seguras para el hombre y vertebrados.<sup>269</sup> Estudios posteriores con este organismo fueron usados como un modelo en el desarrollo de pruebas de desafío máximo, para probar la seguridad en mamíferos.<sup>11</sup> 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.<sup>269</sup> 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.<sup>252,269</sup> Otros grupos indicaron la seguridad de esta bacteria para anfibios.<sup>203,218</sup>

**$\beta$ -exotoxina:** Estudios de seguridad para pruebas de  $\beta$ -exotoxina producen la muerte en ratas después de inyección intraperitoneal.<sup>32,106,285</sup> Ninguna lesión histopatológica fue detectada en estos estudios en cerebro, hígado, sistema linfático e intestino. Sin embargo, otras investigaciones,<sup>106</sup> revelaron necrosis hepáticas y lesiones en los riñones y pulmón. Dosis subletales muestran que no ocurren efectos acumulativos.<sup>32</sup> 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.<sup>33,144</sup> Estudios más recientes han

revelado lesiones después de la administración oral de la  $\beta$ -exotoxina para pollos,<sup>21,106</sup> entre las que se incluyen erosión de la molleja, enteritis, proventriculitis, anemia y regresión de los ovarios. En resumen, Galichet<sup>123</sup> observa anorexia y pérdida de peso en cobayos tratados y Ode y Mathys se muestran en sus investigaciones que los alimentos que contienen  $\beta$ -exotoxina son rechazados por las vacas.<sup>233</sup>

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.<sup>15,61,309</sup> Igualmente se ha demostrado la habilidad de solubilización de la  $\delta$ -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.<sup>61</sup> 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,<sup>63,309</sup> condujeron estudios para demostrar las diferencias de los efectos en mamíferos que fueron administrados con el cristal  $\delta$ -endotoxina nativo y la  $\delta$ -endotoxina solubilizada de *B. thuringiensis*. Ellos demostraron no actividad detectable de toxicidad de la  $\delta$ -endotoxina nativa cuando fue dada *per os*, subcutáneamente o intravenosa a ratas BALB/c. En contraste, la  $\delta$ -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  $\delta$ -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.<sup>309</sup>

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.<sup>101</sup>

Pruebas de seguridad y uso de este organismo datan de antes de los años 50's, con el desarrollo de Thuricide.<sup>109,149</sup> 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.<sup>109,147,149,304</sup> 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.<sup>186</sup> 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.<sup>45,159,318</sup>

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<sup>117,118,273</sup> y reaislamientos de las cepas HD de los extractos de fermentación almacenados de nuestra colección.<sup>273</sup> 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,<sup>48,77</sup> b) identificación por pruebas bioquímicas de una subespecie de *B. thuringiensis* (ver tabla 15) y serológicas,<sup>69,122,180,273</sup> c) registro<sup>226,273</sup> y d) conservación de las cepas recuperadas.<sup>48,59,226</sup> 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.<sup>273</sup> 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.