

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

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

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

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

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

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

1.- Experimentos a nivel de matraz.

a) Inóculo.

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

b) Medios de fermentación.

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

c) Condiciones de fermentación.

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

d) Recuperación del complejo espora-cristal.

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

e) Conteo de esporas.

Del extracto recuperado de fermentación, se utilizó 0.1 g y se diluyó con 9.9 ml de solución salina 0.85 % estéril pH de 7, contenidos en un tubo de ensaye, este fue pasteurizado a 80 °C por 10 minutos, posteriormente se efectuaron una serie de diluciones de 10^{-3} a 10^{-9} , sembrándose posteriormente por difusión 1 ml de las tres últimas diluciones en placas con agar nutritivo estéril, pH 7, incubándose a 30 °C por 24-48 h.⁸³ Finalmente se efectuó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en las tres últimas diluciones y se reportó en (UFC/g).

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

En la figura 4 se muestra el protocolo del bioensayo que fue usado para probar la toxicidad del extracto de fermentación recuperado a nivel de laboratorio de las cepas evaluadas a nivel de matraz y fermentadores, contra larvas neonatas de primer estadio de *T. ni* y *H. virescens*, para determinar el porcentaje de mortalidad. Las larvas fueron alimentadas con una dieta nutritiva de Shorei modificada,^{91,92} aplicando dos dosis únicas de 500 y de 50 g del complejo espora-cristal por ml de dieta de cada extracto. Se utilizaron 20 larvas distribuidas en 20 recipientes individuales, dejándose 20 larvas como control. El total de recipientes se incubó a 25 °C y a una humedad relativa de 55 %, determinándose después de 7 días el porcentaje de mortalidad.^{87,92,221} Posteriormente fue comparada su actividad con un estándar internacional

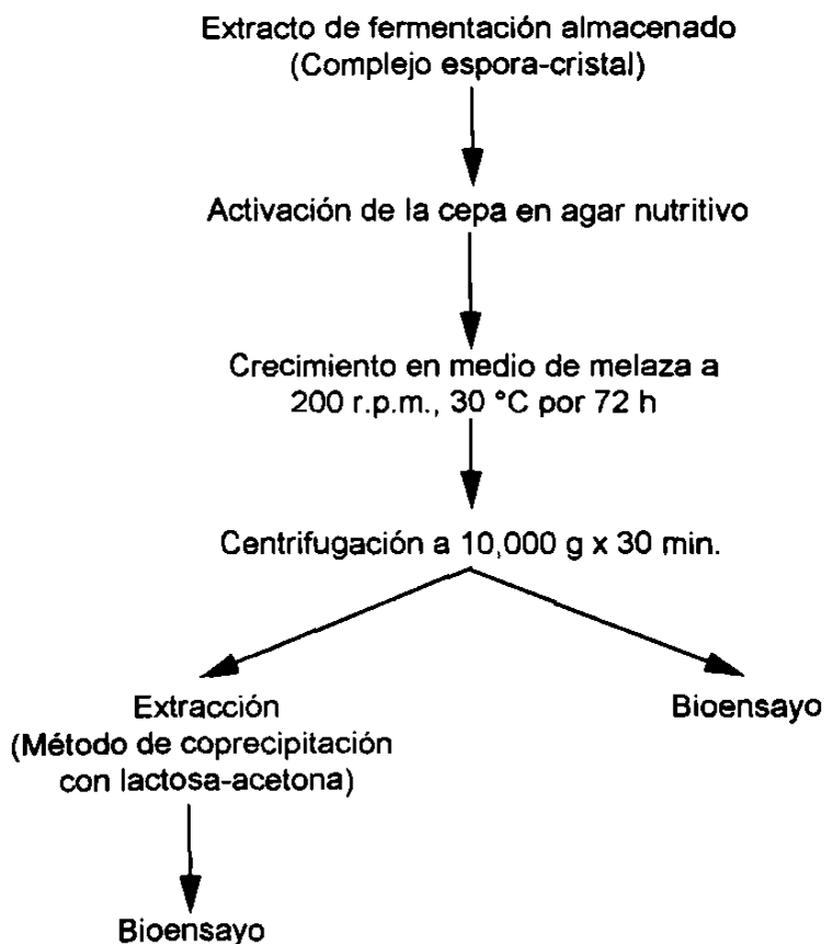


Figura 3.- Esquema de obtención del complejo espora-cristal.

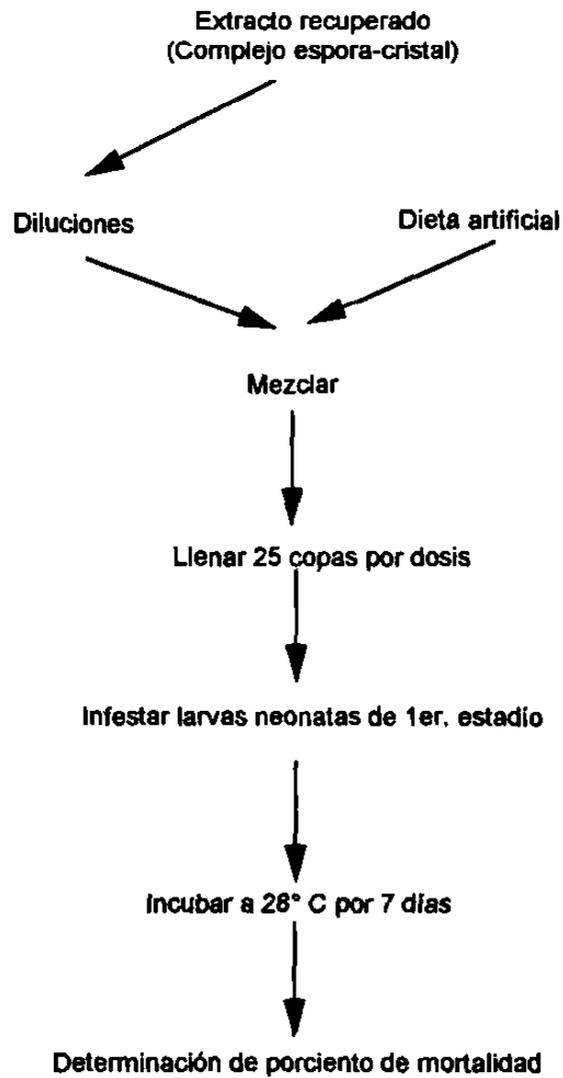


Figura 4- Esquema de bioensayo.

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

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

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

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

DL₅₀ = Dosis letal media (g/ml).

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

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

2.- Experimentos a nivel de fermentadores.

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

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

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

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

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

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

Fue encontrada en una etapa anticipada a la fase estacionaria con el fin de lograr una máxima cantidad de células. Esta demanda se encontró de acuerdo al equipo disponible usando el método Humphrey y col. (1967), que consiste en eliminar en dicha etapa la aereación y prácticamente también la agitación. En este momento la concentración de oxígeno disuelto se detectó en función de la concentración de células de *B. thuringiensis* presente, el valor de la pendiente al graficar la disminución del porcentaje de oxígeno disuelto contra tiempo en segundos, representa el requerimiento de oxígeno específico expresado como Na en $\text{gO}_2/\text{L.M.C.} \times \text{hora}$ (gO_2 = gramos de oxígeno, L.M.C. = Litro de Medio de Cultivo).^{213,332}

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

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

c) Cuantificación de la fuente de carbono.

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

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

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

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

Yx/s = Coeficiente de rendimiento en base a sustrato (g células secas/g de sustrato).

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

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

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

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

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

e) Recuperación del complejo espora-cristal.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

a) Recuperación del complejo espora-cristal.

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

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

Se determinó por los métodos anteriormente descritos.

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

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

Para ambos fermentadores se usó corriente de 220 volts.

* HP es igual a caballos de fuerza.

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

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

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

RESULTADOS

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

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

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

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

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

* ni = No identificado

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

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

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

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

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

1.- De los datos de archivo analizados.

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

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

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

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

* = Dosis en µg/ml

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(-) = No determinado.

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

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

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

DL_{50} = Dosis Letal Media.

3.- Toxicidad de las mejores cepas nativas GM.

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

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

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

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

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

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

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

1.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

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

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

Cepa	Dosis (µg/ml)	Toxicidad (% de Mortalidad)	
		<i>Trichoplusia ni</i>	<i>H. virescens</i>
GM-1	500 50	100 92	100 80
GM-2	500	4	12
GM-5	500	16	0
GM-6	500 50	96 32	44 4
GM-7	500 50	100 100	88 64
GM-8	500 50	4 0	0 0
GM-9	500 50	100 96	100 32
GM-10	500 50	100 92	100 4
GM-11	500 50	100 32	24 8
GM-12	500 50	100 24	48 4
GM-13	500 50	10 0	24 23
GM-14	500 50	100 88	36 8
GM-20	500 50	32 12	16 8
GM-23	500 50	96 8	10 12
GM-24	500 50	20 16	8 2
GM-25	500 50	8	4
GM-26	500 50	36 24	8 0
GM-27	500	16	4
GM-29	500 50 50	28 16 16	4 4 4
GM-39	500 50	12 4	4 12
GM-51	500 50	16 3	12 8
GM-52	500 50	36 8	8 8
GM-55	500 50	48 12	8 8
GM-58	500 50	100 80	76 76
GM-61	500 50	60 32	.
GM-62	500 50	32 20	16 16
GM-63	500 50	40 20	24 16
GM-64	500 50	8 20	8 4
GM-66	500 50	20 16	8 8
GM-78	500 50	68 32	28 24
GM-88	500 50	92 12	30 20
GM-89	500 50	76 40	36 0

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

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

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

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

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

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

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

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

* = El pH no se controló durante la fermentación, A = Agitación en r.p.m., VF = Volumen de fermentación en el reactor.

T = Tiempo final de la fermentación, AE = Aereación en VVM, LRM = Líquido de Remojo de Maíz.

¹ = Harina de soya de la marca comercial Proflo.

² = " " " " " " comercial Nutrisoy.

³ = Líquido de remojo de la marca comercial Soluform.

** = Este mismo medio de cultivo se usó para GM-10.

H.S.A. = Harina de semilla de algodón.

2.- Azúcares reductores iniciales y finales del proceso.

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

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

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

X = Promedio de tres repeticiones.

DS = Desviación Estándar

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

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

Producción = g de extracto/l.

X = Al valor promedio de tres repeticiones individuales

DS = Valor de la Desviación Estándar de cada tratamiento.

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

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

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

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

DS = Desviación estándar.

X = Promedio de tres repeticiones.

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

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

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

1 = Valor determinado a las 8 h.

2 = " " " " 10 h.

3 = " " " " 20 h.

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

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

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

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

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

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

² El $K_L a$ y el $N a^2$ se determinaron solamente en una repetición.

Yx/s = g de células secas/l.

Producción = g de extracto/l.

X = Promedio. DS = Desviación Estándar.

* Estos valores fueron calculados a las 20 h.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.- Cinética del consumo de oxígeno disuelto.

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

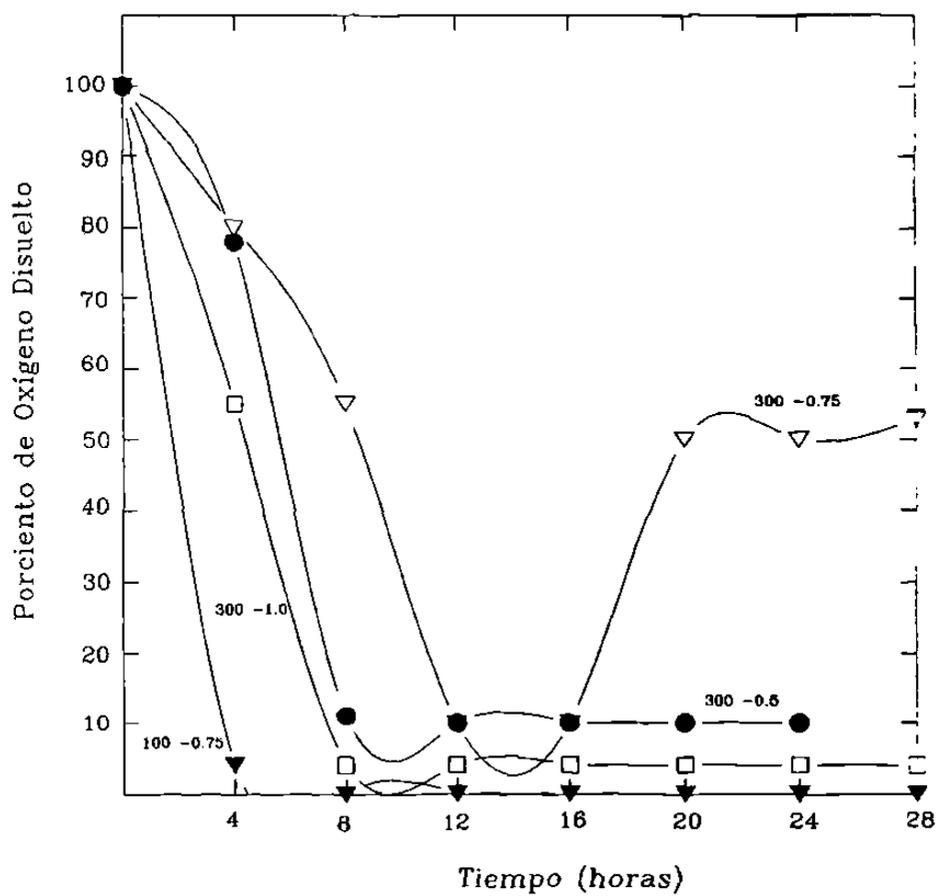


Fig.5.- Consumo de Oxígeno por *B. thuringiensis* cepa GM-7 bajo diferentes condiciones de VVM y r.p.m.

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

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

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

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

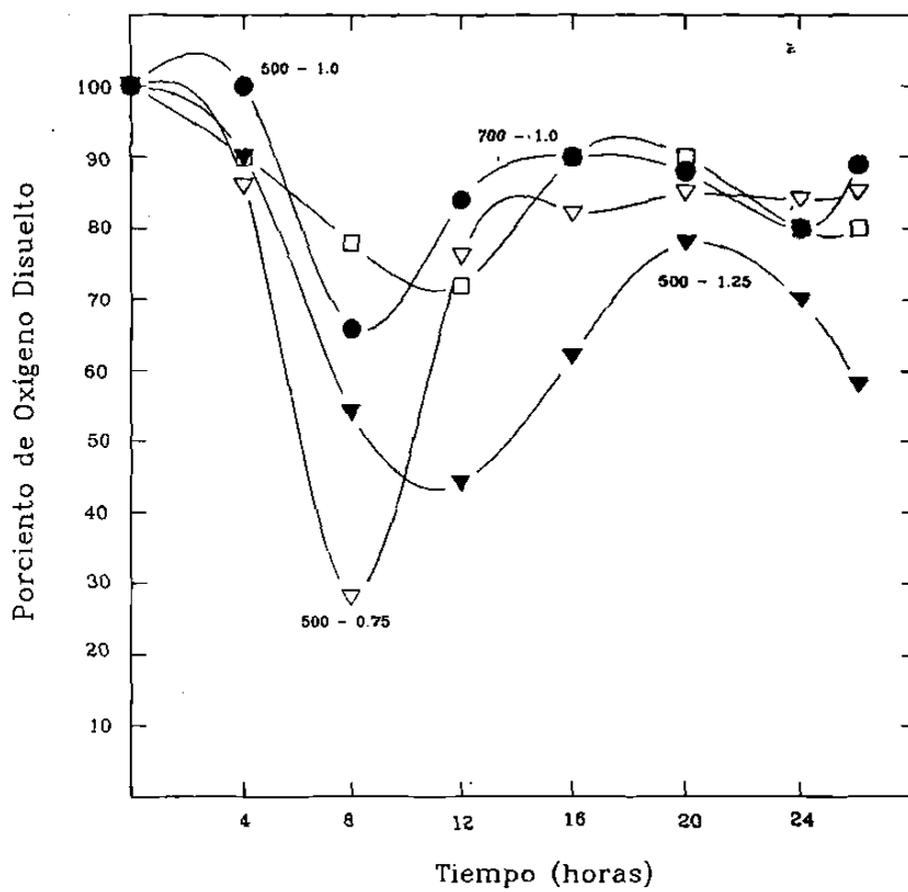


Fig. 6.- Consumo de Oxígeno por *B. thuringiensis* cepa GM-10 en diferentes condiciones de VVM y r.p.m.

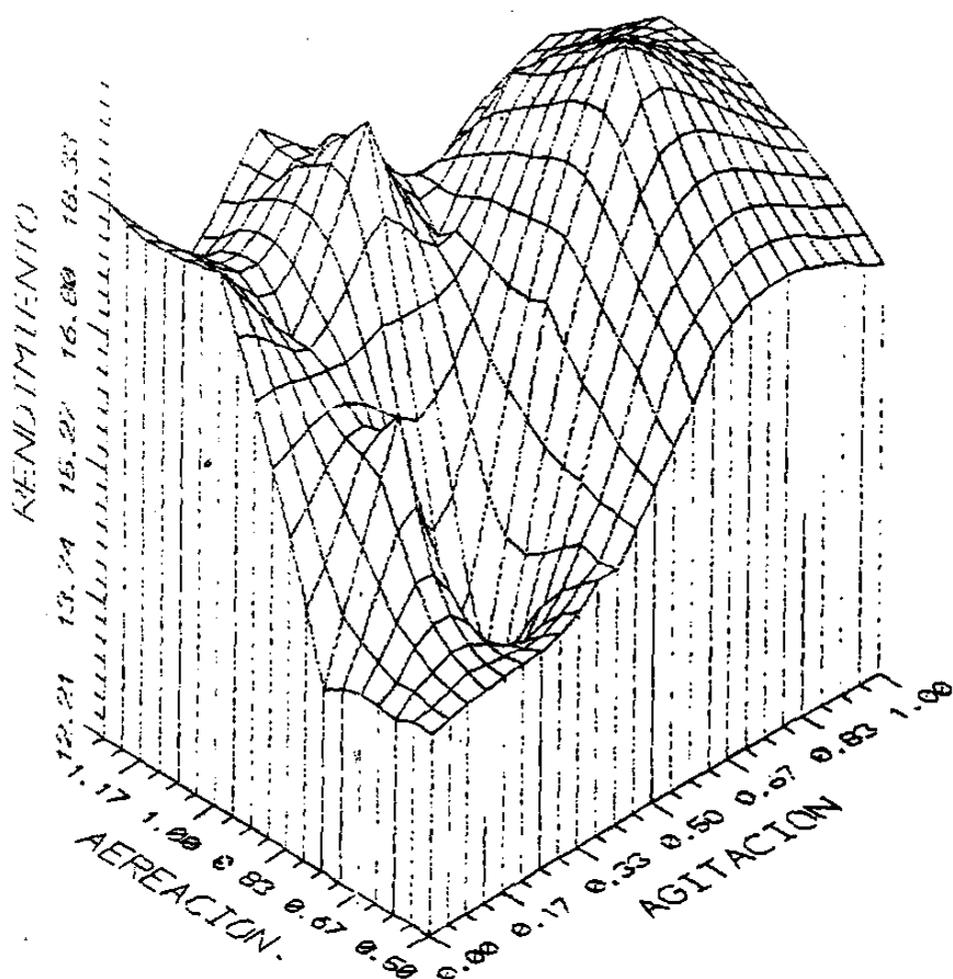


Fig. 7.- Efectos de los diferentes tratamientos (agitación y aereación) sobre la producción de B. thuringiensis cepa GM-7.

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

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

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

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

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

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

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

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

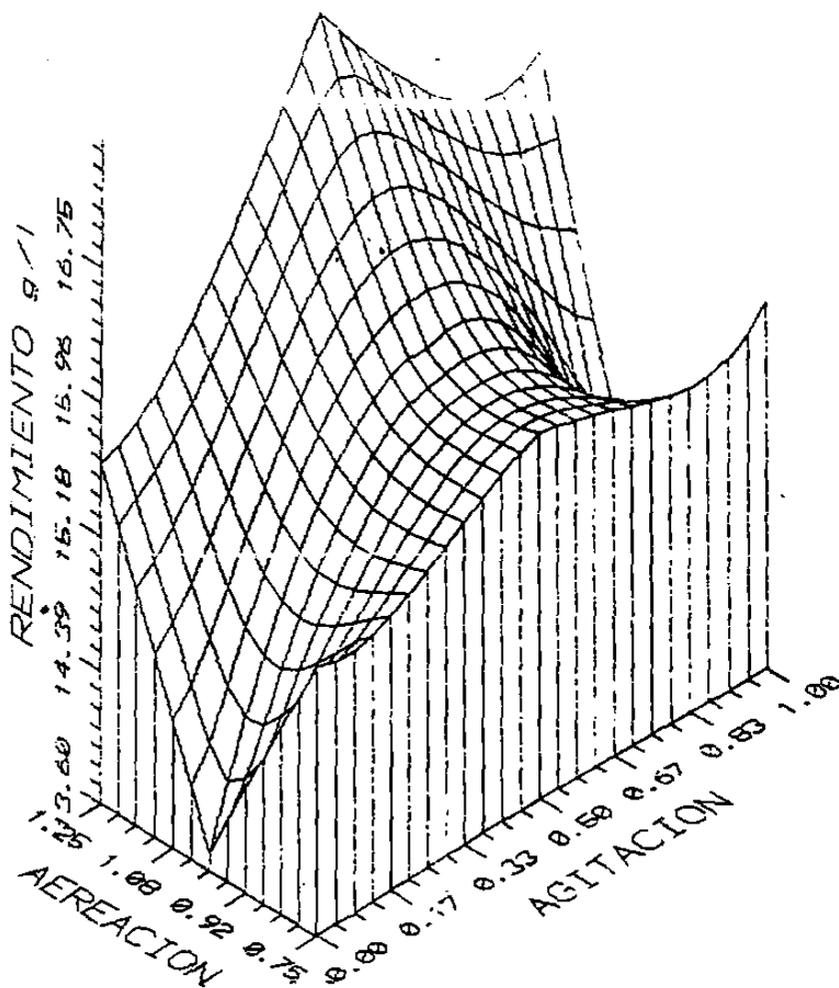


Fig. 8.- Efectos de los diferentes tratamientos (agitación y aereación) sobre la producción de B. thuringiensis cepa GM-10.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.- Producción y toxicidad.

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

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

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

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Actualmente, *T. ni* y *H. virescens* son dos insectos lepidópteros plaga de importancia a nivel nacional^{1270,282} y mundial.^{46,85,188,216} Es importante mencionar que los plaguicidas biológicos a base de *B. thuringiensis*, por su manejo y experiencia adquirida como producto comercial en las últimas tres décadas a nivel mundial son considerados en nuestro país y a nivel mundial como de menor riesgo en relación a su toxicidad,⁷³ así como por sus características ideales para utilizarse dentro del manejo integral de insectos plaga (Tabla 1).²⁰ También se ha investigado que el desarrollo de resistencia es casi nulo para los insectos blanco.¹³⁶ Sin embargo, recientemente se ha demostrado, para *H. virescens*, la presencia de resistencia a *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio.²⁰⁵ Lo anterior nos motivó a la selección de cepas nativas de *B. thuringiensis* para el control biológico de *T. ni* y *H. virescens* a partir de nuestra colección internacional y de extractos de fermentación almacenados de *B. thuringiensis*, para su posterior optimización y condiciones de operación y producción en fermentadores de 14 l de capacidad total, así como su escalamiento del proceso en fermentadores de 130 y 500 l para las cepas seleccionadas

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

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

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

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

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

Después de 22 años de almacenamiento, la cepa HD-193 (1971) var *galleriae* clave del extracto 93, al ser ensayada presentó un 96 y 12 % de mortalidad contra *T. ni*, utilizando dosis de 500 y 50 µg/ml de dieta, respectivamente. Otro extracto almacenado de esta misma cepa (clave 2024), después de 14 años, presentó un 32 % de toxicidad para *T. ni* y 28 % para *H. virescens*, con dosis de 50 µg/ml (*H. virescens*/*T. ni* = 0.875). Dentro de la var. *galleriae*, la cepa HD-193 de 1971 presentó la mayor actividad tóxica. Resultados opuestos se obtuvieron con la cepa HD-530 (extracto de 1980), al ser fermentada nuevamente no incrementó su actividad tóxica. Esto podría deberse a la pérdida de solubilidad de la fracción tóxica,²¹⁹ al cambio en la composición del medio de cultivo y/o a la presencia de determinados iones en el medio de cultivo durante su producción.^{83,243,275,278,327,335}

En las cepas tóxicas contra lepidópteros se encontró que después de diez años, algunos extractos poseen 88 % de actividad. Todavía más críticos fueron los resultados encontrados para *H. virescens*, ya que solamente dos muestras presentaron una regular actividad tóxica, encontrándose que un 95 % de las muestras de extractos fermentados y almacenados pierden su actividad tóxica. Esto quizás podría deberse a que la fracción tóxica para *H. virescens* es más sensible al ataque de proteasas y/o menos soluble. Estos resultados concuerdan con lo reportado para la especificidad de las toxinas CryIA(a) y CryIA(c) contra *H. virescens*.¹⁹⁶

Este es el primer reporte donde se demuestra que la actividad tóxica de los extractos de algunas cepas de *B. thuringiensis*, puede conservarse después de más de 10 años de almacenamiento. Este conocimiento nos llevó a proponer un criterio nuevo de selección de cepas de *B. thuringiensis*, el cual involucra su alta persistencia y potencia activa después de ser almacenada. Lo anterior nos daría la ventaja de poder predecir que la cepa seleccionada podría durar más tiempo en condiciones del medio ambiente y/o anaquel. Se puede señalar que esta nueva estrategia para seleccionar cepas de *B. thuringiensis*, agregada a las ya mencionadas,^{3,16} podría ser muy útil como fuente de cepas a partir de las colecciones internacionales (públicas y/o privadas) de extractos de fermentación almacenados, además de las tradicionales, tales como suelo,^{5,70,95,117,313} insectos,^{7,58,60,68,108,178} filoplano,²⁹³ granos almacenados,^{5,210} sitios de alimentación y criaderos de mosquitos.^{8,317,319}

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

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

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

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

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

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

Cepa	Escala (l)	$K_{L\alpha}$	Producción (g/l)	Toxicidad (%)	
				<i>T.ni</i>	<i>H.vi</i>
GM-7	14	145	18.0	91	48
	500	145	16.2	100	68
GM-10	14	145	19.0	90	20
	130	145	12.0	96	56

Escala = Volumen de capacidad total en litros.

$K_{L\alpha}$ = Hr⁻¹.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- ❑ Proponemos un nuevo enfoque para la recuperación de cepas de *B. thuringiensis* activas contra lepidópteros plaga de importancia agrícola.
- ❑ Encontramos que de nuestras mejores cepas nativas de *B. thuringiensis*, las pertenecientes a la var. *aizawai* son muy atractivas para ser producidas a nivel industrial.
- ❑ La aplicación de un modelo estadístico experimental de 2 factores y 8 tratamientos (cada tratamiento por triplicado) en fermentadores de 14 l de capacidad total, para la optimización de condiciones de operación para *B. thuringiensis* var. *aizawai*.
- ❑ Encontramos que un K_{La} de 145 Hr⁻¹ es un factor de escalamiento confiable en fermentadores de 130 y 500 l de capacidad total, manteniéndose la actividad tóxica y la producción de las cepas GM-7 y GM-10.

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

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

RECOMENDACIONES

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

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

LITERATURA CITADA

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

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

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

115.

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

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

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

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

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

Academic Press, London. pp 507-538.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4:274-276.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 337.- Young, I.E. y P.C. Fitz-James. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var *alesti*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**:483.
- 338.- Young, T.K. y H.T. Huang. 1970. The β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:100-108.
- 339.- Zamola, B., Valles, P., Meli, G., Miccoli, P. y F. Kajfez. 1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:1079-1086.

