

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



"ASPECTOS DE LA FERMENTACION DE  
Bacillus thuringiensis var. aizawai  
A NIVEL DE PLANTA SEMIPILOTO"

TESIS

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

PRESENTA

Q.B.P. LUCIA LETICIA PALACIOS CORTEZ

20  
3  
MONTERREY, N.L.

FEBRERO DE 1993

3 20

3





1020091315

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



**"ASPECTOS DE LA FERMENTACION DE  
Bacillus thuringiensis var. aizawai  
A NIVEL DE PLANTA SEMIPILOTO"**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**Q.B.P. LUCIA LETICIA PALACIOS CORTEZ**

**MONTERREY, N L**



FONDO E' S

24054

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

"ASPECTOS DE LA FERMENTACION DE Bacillus thuringiensis var.  
aizawai A NIVEL DE PLANTA SEMIPILOTO"

T E S I S

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

PRESENTA


Q.B.P. LUCIA LETICIA PALACIOS CORTEZ

COMISION DE TESIS

DIRECTOR  
EXTERNO:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. HIRAM MEDRANO ROLDAN.

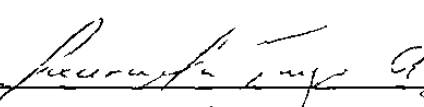
PRESIDENTE:  
(DIRECTOR)

  
\_\_\_\_\_  
M.enC. LUIS J. GALAN WONG.

SECRETARIO:

  
\_\_\_\_\_  
M.enC. LILIA H. MORALES RAMOS.

VOCAL:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. LAURA TREJO AVILA.

MONTERREY, N. L.

FEBRERO DE 1993

## AGRADECIMIENTOS

M.C. Luis J. Galan Wono.

Por toda la ayuda y apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo.

M.C Lilia H. Morales Ramos.

Por sus consejos y atenciones que presentó para la revisión de este manuscrito.

Dra. Laura Trejo Avila.

Por su ayuda tan acertada en la redacción del presente.

Dr. Hiram Medrano Roldán.

Por todo su apoyo y valiosa asesoría, sugerencias y recomendaciones.

De manera especial agradezco a Marivel, Magdalena, Kathiushka, Hugo y Lidia y a todo el personal del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, así como a la Planta Piloto del Instituto Tecnológico de Durango.

Existen muchas personas a quienes le debo mi agradecimiento, a todos. Gracias.

## DEDICATORIA

Primeramente a Jehová, el Dios a quien yo sirvo, por darme vida y amor que contribuyen para felicidad y reposijo.

A mi Esposo, Fransisco Javier Medina Aquilar por darme su mano con apoyo y estímulo en todo momento y por el intenso amor y respeto que siento por él.

A mi madre, Sra. Julia Cortés vda. de Palacios por toda la ayuda que siempre me da.

A mis hermanas Julia Ana, Clara y Ma. Ofelia y sus familias y a mis familiares y amigos.

A la memoria de mi padre Rubén Palacios Arriaga, por darme el ser y todo lo que soy.



## REALIZACION DEL TRABAJO

### I.- Experimentos a nivel de laboratorio.

Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo,  
Depto. de Microbiología e Inmunología, Fac. de Ciencias  
Biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Monterrey, N.L.

### II.- Experimentos a nivel de Planta Semipiloto.

Planta de Fermentaciones del Instituto Tecnológico de  
Durango, Centro de Graduados e Investigación, Durango,  
Dgo. Bajo la Dirección del Dr. Hiram Medrano Roldán.

## INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.- Cinética de Fermentación ( Nivel de Laboratorio ).
- Fig. 2.- Cinética de Fermentación ( Planta ).
- Fig. 3.- Bioensayo Contra Spodoptera frugiperda.
- Fig. 4.- Comportamiento del pH y Consumo de Azúcar Reductor (A.R. g/l) durante la propagación de Bacillus thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en tres diferentes medios de cultivo a nivel de matraz. ( ; Mz; Melaza, ; Dx: Dextrosa, ; J.A.; Juco de Agave).
- Fig. 5.- Comportamiento del pH y Consumo de Azúcar Reductor (A.R. g/l) durante la propagación de Bacillus thuringiensis var. aizawai cepa GM-10 en tres diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio. ( ; Mz; Melaza, ; Dx: Dextrosa, ; J.A.; Juco de Agave).
- Fig. 6.- Mortalidad obtenida a partir de extractos de B. thuringiensis var. aizawai cepas GM-7 v GM-10 propagadas en tres diferentes medios de cultivo, propagadas contra larvas neonatas del 1er. estadio de Spodoptera frugiperda a 500 ug/ml. de extracto y expresado en % de muerte (Mz; Melaza, Dx; Dextrosa. J.A.; Juco de Agave).
- Fig. 7.- Relación entre formulación del medio, condiciones de proceso y toxicidad de los bioinsecticidas producidos por B. thuringiensis. (102)
- Fig. 8.- Cinética de fermentación de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 a nivel semibiolito en fermentadores de 14 l en medio melaza (Mz), pH ( ), # C. (cel/o) número de células ( ), A.R. (g/l) Azúcar Reductor ( ) y % D. D. por ciento de Oxígeno Disuelto ( ).

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.- Distribución del contenido de tres diferentes medios de cultivo para la producción del complejo espora & endotoxina de Bacillus thuringiensis var. aizawai cepas GM-7 y GM-10.
- Tabla 1a.- Análisis parcial del Líquido de Remojo de Maíz.
- Tabla 1b.- Composición de la dieta Shorei modificada.
- Tabla 2.- Relación entre producción de B. thuringiensis, var. aizawai cepas GM-7 y GM-10, a nivel de matraz en tres diferentes medios de cultivo v mortalidad (%) contra el gusano cogollero del maíz, Spodoptera frugiperda.
- Tabla 3.- Producción de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l en el medio de cultivo a base de melaza (Mz) v mortalidad (%) contra el gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda).
- Tabla 4.- Efecto de la velocidad de agitación sobre la cinética microbiana de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l.
- Tabla 5.- Efecto de la velocidad de agitación sobre la propagación v esporulación de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l.
- Tabla 6.- Efecto de la aereación sobre la cinética microbiana de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l.
- Tabla 7.- Efecto de la aereación sobre la propagación y esporulación de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l.

## CONTENIDO

Apéndice.....	9
Resumen.....	11
Introducción.....	12
Antecedentes.....	13
Historia.....	13
Toxinas de <u>Bacillus thuringiensis</u> .....	15
Modo de Acción.....	18
Medios de Cultivo.....	19
Recuperación del Insecticida.....	22
Estandarización y Bioensayo.....	23
Insecto Blanco.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Resultados y Discusión.....	32
Literatura Citada.....	39
Figuras.....	47
Tablas.....	55
Análisis Estadístico.....	64



## APENDICE

<u>B.</u>	<u>Bacillus</u>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta
$\mu$	velocidad de crecimiento
ml	Mililitro
g	Gramo
l	Litro
g/l	Gramos por Litro
mg	Miligramo
ug	Microgramo
mu	Milimicras
g S	Gramos de Sustrato
gO <sub>2</sub>	Gramos de Oxígeno
1 N	Uno Normal
V	Volúmen
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
cel.	Células
X	Gramos de células por litro
Yx/s	Gramos de células por gramo de sustrato
# C	número de células
# E	Número de esporas
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal Media
UI	Unidades Internacionales
cm	Centímetros
seg	Segundos
h	Horas
Tp	Tiempo de proceso
Te	Tiempo de esporulación
°Brix	Grados Brix
VVM	Volumen de Aire por Volumen de Medio por Minuto
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
ARN	Acido Ribonucleico
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por Minuto
Dx	Dextrosa
Mz	Melaza
J.A.	Jugo de Agave
ACL	Agua de Cocimiento de Levadura
LRM	Líquido de Remojo de Maíz
CTP	Caldo Triptosa y Fosfato
MF	Medio de Fermentación
OD	Oxígeno Disuelto

D.O.	Demanda de Oxígeno
$N_a$	Demanda de Oxígeno
$q_{O_2}$	Coefficiente de Respiración
$KLa$	Coefficiente de Transferencia de Oxígeno
$HR^{-1}$	Horas a la menos uno
$H_o$	Potencia (Caballos de Fuerza)
$NRe$	Número de Reynolds
$Di^2$	Diámetro del Agitador (cm)
$N$	Velocidad del Agitador
$\rho$	Densidad ( $g/cm^3$ )
$\eta$	viscosidad
$R^2$	Coefficiente de regresión
$r$	Coefficiente de correlación
EE	Error estandar
$A_a$	Agitación
$A_e$	Aereación
$A_a^2$	Agitación al cuadrado

## RESUMEN

Debido a que en la actualidad son escasos los conceptos sobre biotecnología de Bacillus thuringiensis, y existen pocas publicaciones al respecto, el presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar algunos aspectos como la propagación, toxicidad y producción, apropiadas para la obtención del bioinsecticida, para ello se utilizaron dos cepas nativas de Bacillus thuringiensis var. aizawai claves GM-7 y GM-10, se cultivaron en tres diferentes medios de cultivo, a nivel de laboratorio, a base de Melaza de caña de azúcar, Dextrosa y Jugo de Agave como fuentes de carbono y adicionados con Harina de Soya como fuente de Nitrógeno y Líquido de Remojo de Maíz, como factores de crecimiento y  $\text{CaCO}_3$  como amortiguador de pH; de los extractos de fermentación recuperados, se determinó su actividad insecticida contra el Gusano Cogollero del Maíz Spodoptera frugiperda mediante Bioensayo, a una dosis única de 500µg/ml. y se encontró que la cepa GM-7 presentó un porcentaje de muerte de 93% en el medio a base de Dextrosa y un 89% en el medio a base de Melaza y la cepa GM-10, resultó con un 84% de muerte en el medio de Jugo de Agave y 73% en el medio de Dextrosa. Al comparar la producción de los extractos finales, el mejor fue para el medio con Melaza en la cepa GM-7 con 17 g/l y de 14 g/l. para la cepa GM-10 en el mismo medio. Fue por ello que se consideró el medio con Melaza, el más apropiado para optimizar condiciones a nivel de Fermentador de 14 l (planta semipiloto) y con la cepa GM-7, donde se observó un incremento en la producción hasta de 19 g/l y un porcentaje de muerte del 100% a la dosis de 500µg/ml y bajo las siguientes condiciones de propagación: velocidad de agitación 700 rpm, aereación 1 VVM, tiempo de proceso 30h y, se observó que la Demanda de Oxígeno para B. thuringiensis var. aizawai GM-7, presentó valores entre 0.109 y 0.141  $\text{gO}_2/\text{l} \times \text{h.}$  lo cual se consideró bajo por tratarse de un microorganismo aeróbico.

## INTRODUCCION

Los procedimientos actuales para erradicar insectos de interés agrícola, son químicos y biológicos; los primeros ocasionan nuevos problemas al hombre, requiriéndose de mayores dosis para eliminar plagas de importancia, produciéndose con esto efectos nocivos para la progresiva contaminación de los ecosistemas, como resistencia adquirida por los insectos, toxicidad selectiva y otras alteraciones de tipo ecológico.

Por lo anterior, se prefiere los métodos de control biológico basándose en el uso de microorganismos patógenos como agentes de control. Entre uno de los más estudiados es una bacteria esporulada y gram positiva denominada Bacillus thuringiensis, que ha demostrado ser altamente patógena para diversos insectos, debido a una de sus toxinas llamada  $\delta$ -endotoxina, o cuerpo paraesporal o cristal, es la responsable de la propiedad bioinsecticida de este microorganismo (43,54). El control biológico se define como: El uso de microorganismos naturales o modificados, genes o productos de ellos para reducir el efecto de organismos indeseables (plagas) a favor de insectos benéficos y microorganismos (37).

Actualmente se conocen numerosos medios de cultivo para estudiar el metabolismo de B. thuringiensis, ya que existe diversa variabilidad en la actividad tóxica de las preparaciones derivadas de los distintos medios de fermentación para una cepa usada (22).

Estas características estimulan a la investigación de B. thuringiensis, y ofrecen buenas perspectivas como la búsqueda de cepas nativas con rendimientos de fermentación favorables y una toxicidad superior dirigida a plagas de importancia en México como lo es el gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda que se encuentra ampliamente distribuido, ocasionando severos daños (76).

Tomando en cuenta que es escasa la información relacionada con las condiciones de propagación de Bacillus thuringiensis var. aizawai a nivel de laboratorio y planta semipiloto es que nos proponemos los siguientes objetivos.

Objetivo general: Determinar algunos aspectos sobre la propagación de B. thuringiensis var. aizawai a nivel de laboratorio y planta semipiloto.

Objetivos particulares: a).- Encontrar la mejor actividad tóxica de B. thuringiensis var. aizawai en diferentes medios de cultivo contra el gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda). b).- Optimizar condiciones de operación a nivel de fermentador de 14 l (planta semipiloto).



## ANTECEDENTES

### HISTORIA.-

Bacillus thuringiensis ha sido estudiada intensamente en las últimas tres décadas, y a demostrado ser apropiada como agente de control biológico de insectos plaga.

El interés en este microorganismo principia por el aislamiento de una bacteria de orugas enfermas del gusano de seda (Bombix mori), efectuadas por el japonés Ishiwata (1905), denominándolo Bacillus sotto, pero esta identificación no fue completa y la primera descripción microbiológicamente válida del bacilo fué hecha en Alemania por Berliner (1911) y lo aisló de larvas enfermas de la palomilla del mediterráneo (Anagasta khueniella). En 1915 Berliner en Alemania identificó estos aislados como una subespecie nueva y propone el nombre de B. thuringiensis, ya que originalmente fue aislada en Berlín en la Provincia de Thuringen, donde encontró e inició sus estudios con este bacilo (28,47,55).

Un aislamiento similar fue hecho en 1927 por otro alemán, Mattes, quien trabajó con el mismo insecto. Ambos bacteriólogos hicieron observaciones importantes con este microorganismo, mientras células vegetativas crecían y maduraban, éstas producían, además de la espora oval, un segundo cuerpo, y Berliner lo nombró "Restekörper" o cuerpo de desecho, tiempo después un canadiense (Hannay, 1953), utilizando el Microscopio Electrónico, redescubrió este cuerpo y confirmó las observaciones anteriores, mientras examinaba la esporulación en bacterias, observó cristales en forma de diamante libres del esporangio, en preparaciones de cultivos esporulados de B. thuringiensis y se refiere a ellos como paraesporal. Hasta ese tiempo, se desconocía esto como una función de patogenicidad, Hannay, por el contrario, sugiere que los cristales, al encontrarse en el intestino medio, están conectados con la formación de una sustancia tóxica que induce una posterior septicemia en larvas de insectos (30,34).

Posteriormente Angus en los años del 1953 al 1954 separó el cuerpo paraesporal de la espora en cultivos viejos, y demostró que el cristal contenía una toxina alcalina soluble para insectos y que la toxicidad para el gusano de seda (Bombix mori) está en función de éste y requiere para ejercer su efecto, encontrarse en el intestino medio anterior del insecto, sitio susceptible a la acción del cristal paraesporal (31,43,56,68).

CLASIFICACION DE SEROVARIEDADES DE B. thuringiensis

---



---

SEROTIPO H	SEROVAR
1	thuringiensis
2	finitimus
3a	alesti
3a, 3b	kurstaki
3a, 3d	sumivoshiensis
3a, 3d, 3e	fukuokaensis
4a, 4b	sotto
4a, 4b	dendrolimus
4a, 4c	kenyae
5a, 5b	galleriae
5a, 5c	canadiensis
6	entomocidus
6	subtoxicus
7	aizawai
8a, 8b	morrisoni
8a, 8c	ostrinae
8a, 8d	nigeriensis
9	tolworthi
10	darmstadiensis
11a, 11b	toumanoffi
11a, 11c	kyushuensis
12	thompsoni
13	pakistan
14	israelensis
15	dakota
16	indiana
17	tohokuensis
18	kumamotoensis
19	tochiensis
20a, 20b	yunnanensis
20a, 20c	pondicheriensis
21	colmeri
22	shandooiensis
23	japonensis
24	neoleonensis
25	correanensis
26	siloesis
27	mexicanensis
**	whuanensis

---

\*\* = Cepa de B. thuringiensis que no presenta flabelos.  
 ref. De Barjac (16) y Dhba (69).

En 1958-1959 Heimpel y Angus, intentaron una clasificación de bacterias cristalíferas, en base a la morfología y pruebas bioquímicas. Después Krieg óbica otra clave en base a la clasificación de Heimpel y Angus con algunas modificaciones (24, 47). De Barjac y Bonefoi, en 1962, reportan un análisis de 161 cepas de B. thuringiensis y proponen una clasificación en base a sus antígenos flagelares H y pruebas bioquímicas, y organizaron 9 serotipos con 12 variedades (25,28,55,56). Más adelante, en 1967, Heimpel clasifica como  $\delta$ -endotoxina a la toxina presente en el cuerpo paraesporal (30,47). Hasta 1990 se han descrito un total de 38 serotipos incluyendo dos nuevos aislados en México (15,42,67,74).

### TOXINAS DE B. thuringiensis

Pasaron cerca de 50 años desde el aislamiento original de B. thuringiensis sin que la acción tóxica de este microorganismo fuera reconocida (55).

La habilidad que presenta B. thuringiensis para producir toxinas varía de cepa en cepa y también depende de las condiciones del medio de cultivo (70).

En las cepas de B. thuringiensis, se han descrito 7 toxinas diferentes: Fosfolipasa C ( $\alpha$ -exotoxina), una exotoxina termoestable ( $\beta$ -exotoxina), una enzima no identificada que puede no ser tóxica ( $\tau$ -exotoxina), el cristal de proteína paraesporal ( $\delta$ -endotoxina), una "toxina lábil", una toxina soluble en agua aislada a partir de una formulación comercial y una exotoxina conocida como "factor ratón" (34).

#### $\alpha$ -exotoxina

Esta toxina (fosfolipasa C o lecitinasa) es producida por B. thuringiensis y B. cereus, actúa afectando los fosfolípidos en membrana y causando lisis y necrosis. Por su acción sobre la misma, probablemente facilita la penetración de células vegetativas de B. thuringiensis, del intestino al hemocele del insecto (34,54).

La lecitinasa es una proteína termoestable, su biosíntesis y acumulación ocurre en un rango de pH 6.0-9.0. Heimpel (1954-1955) demostró la coincidencia entre el pH óptimo (6.9-7.4) para lecitinasa y el pH dentro del intestino de algunos insectos (34).

Algunas especies de Bacillus que son incapaces de producir lecitinasa, desconociéndose su patogenicidad. Al probar B. cereus contra algunas especies de insectos, se encontró que las especies resistentes presentan un pH alcalino medio. Así, la condición alcalina en el intestino de algunos insectos puede ser un factor limitante en el crecimiento del organismo y la actividad lecitinasa (34).

### **$\beta$ -exotoxina**

Ciertas variedades de B. thuringiensis reportan ser productoras de una exotoxina ( $\beta$ -exotoxina, factor mosca o exotoxina termoestable) y entre los serotipos productores de ésta toxina se encuentran: 1, 5a5b, 5a5c, 7, 8a8b, 9, 10 y 11a11b de B. thuringiensis (34).

La  $\beta$ -exotoxina es un producto que se caracteriza por ser estable al calor excretado al medio durante la fase de crecimiento vegetativo, soluble en agua y dializable, absorbe a 260 nm y de estructura nucleotídica. Farkas y col. (1969), determinaron su estructura química, compuesta por adenina, ribosa, glucosa y ac. alárico con un grupo fosfato (34,55,68,70, 72.). Su actividad teratógena se ha demostrado en insectos, en los cuales produce deformaciones físicas en la emergencia de las larvas, en mudas y durante la metamorfosis. Actúa inhibiendo la síntesis de ARN, resulta por lo anterior un compuesto altamente tóxico (34,73).

### **$\tau$ -exotoxina**

Es una enzima sin estar identificada, responsable del aclaramiento del agar vema de huevo, con indeterminada toxicidad y presencia en la naturaleza (34).

### **$\delta$ -endotoxina**

Es considerada la de mayor importancia en Microbiología Industrial, ya que la actividad insecticida de B. thuringiensis se basa en la  $\delta$ -endotoxina, ésta se forma durante el proceso de esporulación, dentro de la célula vegetativa, al mismo tiempo que la espora, la  $\delta$ -endotoxina es producida y aparece como una inclusión cristalina, considerándose una característica constante de las especies de B. thuringiensis (14,34,43,54,76).

A esta inclusión se le adjudican algunos sinónimos como: Cuerpo paraesporal, cristal de proteína o solamente cristal. Aunque es denominado así a todo el cuerpo paraesporal, solo la porción activa dentro del cristal debe ser considerada  $\delta$ -endotoxina (56).

Bulla y col. (1976), determinaron que el cristal es una glicoproteína, sin demostrarse actividad biológica, y proponen que su actividad ocurre bajo condiciones naturales por proteasas del intestino del insecto hospedero (54).

El cuerpo paraesporal mide en tamaño, cerca de un tercio de la espora (30% del peso seco del esporangio y largo como la espora 1 $\mu$ M), además de ser una característica constante en las especies de B. thuringiensis y única diferencia entre éste y B. cereus (43,54), por otra parte se han clasificado los genes que codifican las proteínas de inclusión cristalina de la  $\delta$ -endotoxina (48).



DEFERENTES TOXINAS DE CEPAS DE Bacillus thuringiensis

SEROTIPO	BIOTIPO	VARIEDAD	α-		β-		γ-		δ-		TOXINA- LABIL	TOXINA- SOLUBLE	FACTOR- RATON
			EXOTOXINA	EXOTOXINA	EXOTOXINA	ENDOTOXINA	EXOTOXINA	ENDOTOXINA					
1	I	thuringiensis	+		+				+				+
2	II	finitimus	+						+				+
3	III 1	alesti	+						+				+
3a, 3b	III 2	kurstaki	+						+				+
4a, 4b	IV 1	sotto	+						+				+
4a, 4b	IV 1'	dendrolimus	+						+				+
4a, 4c	IV 2	kenyae	+						+				+
5a, 5b	V 1	galleriae	-						+				+
5a, 5c	V 2	canadiensis	-						+				+
6	VI	subtoxicus	-						+				+
6	VI'	entomocidus	-						+				+
7	VIII	aizawai	+						+				+
8a, 8b	VIII 1	morrisoni	-						+				+
8a, 8c	VIII	ostrinae	+						+				+
9	IX	tolworthi	+						+				+
10	X	darumstadiensis	-						+				+
11a, 11b	XI 1	toumanoffi	+						+				+
11a, 11c	XI 2	kyushuensis	+						+				+
12	XII	thompsoni	+						+				+
13	XIII	pakistanii	+						+				+
14	XIV	israelensis	+						+				+
15	XV	dakota	+						+				+
16	XVI	indiana	+						+				+
17	XVII	wuhanensis	-						+				+
18	XVIII	tohokuensis	-						+				+
19	XIX	kumamotoensis	+						+				+
19	XIX	tochigiensis	+						+				+

Otras exoenzimas producidas por B. thuringiensis, con propiedades insecticidas o enzimas donde también reside su patogenicidad son: Quitinasa; otra enzima que daña la membrana peritrófica, facilita el acceso de la  $\delta$ -endotoxina o bacterias al epitelio del intestino. Proteasa: enzima proteolítica extracelular, asociada con el inicio de la esporulación y obligatoria para el completo éxito del proceso. Todas ellas expresan su acción en combinación con la  $\delta$ -endotoxina y la  $\beta$ -exotoxina (54).

#### MODO DE ACCION

La infección por B. thuringiensis, comienza en el estadio larval por ingestión del alimento. La  $\delta$ -endotoxina es una protoxina, que es hidrolizada por enzimas que intervienen en el proceso de ingestión, en combinación con el pH alcalino del intestino medio, donde actúa y causa destrucción del epitelio, lo cual provoca una parálisis y el insecto deja de ingerir alimento (14).

La acción específica de la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis se basa principalmente en tres factores, que determinan su potencia y son: La variedad, la cual produce cierto tipo de cristal, y el modo de activación del mismo por proteasas del jugo intestinal en donde la protoxina se transforma en la  $\delta$ -endotoxina y el tipo de células epiteliales del intestino, que actúan como blancos para la toxina activada (51).

Heimpel y Angus describen los síntomas del modo de acción de B. thuringiensis. Parálisis general; observada en las larvas del cusano de seda B. mori, después de la ingestión de cultivos esporulados de las serovariedades sotto, alesti o thuringiensis. El desarrollo de ésta parálisis es rápida y acompañada por un incremento progresivo en la alcalinidad de la hemolinfa, separándose las células unas de otras y de la membrana basal, los músculos circulares y longitudinales se relajan y cesan sus movimientos peristálticos normales (46,83). Parálisis intestinal; los síntomas notados por otros investigadores en un rango amplio de lepidópteros infectados con variedades de B. thuringiensis, revelan que ocurre una inactividad en la larva, deja de alimentarse, se observan vómitos y diarreas, no ocurre parálisis rápida y general como en B. mori. Mediante rayos X se demostró que el intestino de larvas infectadas tienen un cese en sus funciones; la muerte se presenta en 24 a 48 h (44).

Tojo y Aizawa (1983), en un estudio del efecto de la proteasa digestiva, presente en el jugo del intestino del cusano de seda B. mori sobre la  $\delta$ -endotoxina, reveló que para la disolución del cristal requiere valores del pH de 10.0 y 11.0, y sugieren que causa el hinchamiento de los cristales y en seguida la disolución por la proteasa (84).

Klowden y col. (1983), hicieron bioensayos en mosquitos adultos de Aedes aegypti con B. thuringiensis var. israelensis, sin embargo ellos utilizaron cristales intactos y solubilizados y reportaron buenos rendimientos de toxicidad para el cristal intacto en larvas y el cristal solubilizado en adultos, y no tienen explicación de la gran actividad que presenta este último. Además, reportan baja potencia para larvas cuando es solubilizado el cristal y proponen que es debido a la forma de alimentación de la larva que puede ingerir menos componente activo cuando el cristal se ha solubilizado (52).

## MEDIOS DE CULTIVO

Se han usado y descrito numerosos medios de cultivo para estudiar el metabolismo de Bacillus thuringiensis. Dubois (1968) describe un procedimiento a nivel de matraz, para la producción de B. thuringiensis el cual produce  $2 \times 10^8$  esporas/ml, usando un medio a base de glucosa 2.0g; bactopectona 2.0g;  $(NH_4)_2SO_4$  3.0g;  $K_2HPO_4$  17.4g;  $MgSO_4$  0.03g;  $CaCl_2 \cdot H_2O$  18mg;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  7.5mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  7.5mg;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  40mg; por 1,000 ml de agua destilada (20).

Dulmage (1970) reporta la producción del complejo espora  $\delta$ -endotoxina, usando 12 variedades de B. thuringiensis cultivadas en diversos medios de fermentación. Los resultados indicaron una gran variabilidad en la actividad tóxica de las preparaciones derivadas de los medios medida por bioensayo, observó que la actividad de la  $\delta$ -endotoxina no correspondía con las cuentas de esporas o rango de crecimiento del organismo, concluye que la toxicidad de una preparación varía en función tanto del medio de cultivo donde se cultivó, como la cepa usada. En ese mismo año reportó el aislamiento de B. thuringiensis HD-1 var. kurstaki, la cual produce en fermentación altos niveles de  $\delta$ -endotoxina en un medio que contiene (g/l): Dextrosa 5.0; extracto de levadura 2.0;  $K_2HPO_4$  1.0;  $KH_2PO_4$  1.0; y recomienda el uso de sustratos baratos como harina de semilla de aludón 1.0 y harina de soya 1.0 (21).

Dulmage, en 1971 recuperó complejos espora  $\delta$ -endotoxina de 16 aislados de B. thuringiensis var. alesti (serotipo 3a) y de 2 aislados de B. thuringiensis var. kurstaki serotipo 3a, 2b) cultivados en 3 medios a base de sales minerales, utilizando distintas fuentes de carbono y nitrógeno tales como triptona, proflo, harina nutrisoya, almidón de maíz, extracto de levadura y bacto peptona. Demostró que la cantidad de  $\delta$ -endotoxina producida por los aislados varía ampliamente dependiendo del serotipo y medio en el cual crece, así la actividad insecticida de las preparaciones de B. thuringiensis es imposible de ser estimada por serotipos, ya que algunos aislados del mismo serotipo producen diferentes actividades insecticidas al cultivarse en medios diferentes (22).

Con la capacidad de obtener un producto con alto nivel de esporulación, patógeno para larvas de la palomilla del almendro (Ephestia cautela). Nagamma y col. en 1972, reportan un medio

sólido para cultivar B. thuringiensis que consiste en nuez molida y polvo de médula de tamarindo (75).

Dulmage y De Barjac (1973), llevaron a cabo una fermentación con un aislado nuevo de B. thuringiensis HD-187 identificado como serotipo 5 (5a5b) el cual produce altos rendimientos de  $\delta$ -endotoxina, muy superiores a los aislados anteriores, cultivándolo en tres medios: B-4; contiene harina de semilla de algodón al 1%. B-4b; al 2% y B-8 al 2% adicionado con líquido de remojo de maíz al 1%, todos con peptona 0.2%; glucosa 1.5%; extracto de levadura 0.2% y sales minerales. Obtuvieron una actividad de  $2.000 \times 10^6$  Unidades Internacionales por litro de caldo cosechado y el producto tenía una potencia de  $200 \times 10^3$  UI/mg. (29).

Scherrer y col. (1973), al variar la concentración de glucosa y aereación en un medio que contenía extracto de levadura y sales observaron que se afecta la longitud del cristal, en la variedad thuringiensis, sin intervenir con el tamaño de la spora y toxicidad. El cristal tiene un incremento en la longitud de 0.2 a 0.5  $\mu$ m con un aumento en la concentración de glucosa de 0.1 a 0.6% (77).

Golberg y col. (1980), optimizaron un medio de cultivo para la producción del complejo spora  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis a escala piloto con fermentadores de 500 l de capacidad con: glucosa 30.0g; peptona de soya 20.0g; extracto de levadura 4.5g; líquido de remojo de maíz 5.0ml; KCl 3.0g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0g;  $\text{H}_2\text{PO}_4$  7.0ml;  $\text{MgSO}_4$  2.0g;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  36.0mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  13.5mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  7.5mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.5mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  40mg por cada 1,000 ml de agua destilada a 32 °C con aereación de 0.3 VVM, agitación de 120 a 160 rpm, pH de 6.2 a 7.4 con una producción de  $4 \times 10^7$  UFC/ml en 60 h de operación aproximadamente (41).

Couch y Ross (1980), recomendaron el uso de productos naturales como fuentes de nitrógeno, tales como: harina de pescado, harina de semilla de algodón, líquido de remojo de maíz, harina de soya, levadura autolizada y caseína. Las fuentes de carbono incluyen: Productos de maíz hidrolizados, almidón y dextrosa, los cuales son adecuados y necesarios para disminuir los costos de mercado (14).

Luthy y Ebersold (1981), desarrollaron un medio complejo basado en ingredientes baratos, con la siguiente composición: (g/l) harina de soya 35.0; almidón de maíz 12.15; extracto de malta 2.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.08;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.08; el pH se ajustó a 7.2 y con menos de 48 horas de incubación lograron una esporulación total (55).

Maldonado (1981), reporta actividad insecticida en B. thuringiensis GM-1 en un medio compuesto por jugo de agave y harina de soya el 1% y obtiene una potencia contra I. ni de 10,900 UI/mg en promedio, difiriendo de la cepa HD-1 reportada por el Dr. Dulmage (1970), la que presenta una potencia de 18,000

UI/mg. la de mayor actividad (57).

Castro (1982) prueba 8 diferentes medios de cultivo para la producción del complejo espora-cristal de B. thuringiensis clave GM-1 y encuentra: en medios sin  $\text{CaCO}_3$ , con melaza y jugo de agave, un 44% de mortalidad para larvas neonatas de S. frugiperda y para I. ni los extractos más tóxicos (14.500 UI/mg) con los obtenidos en los medios a los cuales se les agrega  $\text{CaCO}_3$  (9).

Salama y col. (1983) proponen el uso de varios subproductos industriales y agrícolas, incluyendo: harina de semilla de albondón, harina de pescado, líquido de remojo de maíz, levadura de forraje, sangre de res, subproductos secos de aves, suero de queso, líquido variable (resultado de la centrifugación final de almidón de maíz), así como semillas de leguminosas incluyendo: frijol de soya, garbanzo, habas, cacahuates y lentejas, todo incorporado a un medio base: (g/l) Glucosa 6.0; extracto de levadura 2.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.3;  $\text{CaCO}_3$  2.0 y sales minerales en una concentración del 2% para investigar su potencial en mantener la producción de complejos espora  $\delta$ -endotoxina en 2 variedades de B. thuringiensis, kurstaki y entomocidus, y encontraron que la producción de esporas de estos productos fueron diferentes, de acuerdo a la variedad de B. thuringiensis probada, por otra parte hacen notar que las mezclas de estos productos con la levadura de forraje, resultan siempre más altas las cuentas de esporas y productos finales para ambas variedades cuando se agrega sangre de res; indicándose que estos productos también fueron eficientes en mantener la biosíntesis de  $\delta$ -endotoxina con apreciable actividad insecticida contra Heliothis armigera. Además, señalaron que las leguminosas soportan altas producciones de espora para cada variedad probada. Finalmente describen que la subespecie entomocidus, tiene buena actividad contra Spodoptera litoralis sin importar que leguminosa sea usada en el medio de fermentación (75).

Murqa (1983) utiliza catorce medios de cultivo diferentes con B. thuringiensis cepa GM-1 y GM-2, variando la fuente de carbono, 8 con jugo de agave a 1°Brix (concentración de 0.1 y 2%) y 6 con melaza (2%) y variando concentración de harina de soya, líquido de remojo de maíz, agua de cocimiento de levadura (ACL)  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . De los extractos finales de B. thuringiensis clave GM-2, se realizaron bioensayos contra larvas neonatas de I. ni y Heliothis virescens; encontrando que la preparación derivada del medio que contiene harina de soya, ACL y sales, mostró la más alta actividad contra I. ni (32%) y con el medio que contiene jugo de agave, harina de soya, ACL y sales contra H. virescens un 28%. En comparación con la cepa de B. thuringiensis GM-1 crecida en los mismos medios, resultó con una actividad mayor de 100% (66).

Dharmsthini y col. (1985) desarrollaron dos medios, con un subproducto hidrolizado a partir de una factoría de glutamato monosódico, para comparar la esporulación y toxicidad de B. thuringiensis y B. sphaericus en un fermentador de 3 litros de

capacidad al ser probadas contra larvas de Aedes aegypti y Culex quinquefasciatus respectivamente. Los medios contenían el hidrolizado al 4% y 7% para B. thuringiensis y B. sphaericus respectivamente, suplementados con  $K_2HPO_4$  0.05% y obtienen una buena esporulación y toxicidad. El costo de estos medios a partir de subproductos agroindustriales es bastante bajo al compararse con medios definidos, \$7.05 dolar para cultivar B. thuringiensis y \$11.67 dolar para B. sphaericus. Además sugieren el uso de materiales baratos disponibles localmente para la producción de B. thuringiensis, por ejemplo; extracto de malta, sangre seca de bovino, extracto de semillas de leguminosa, proteína animal, estiércol animal, agua de drenaje, desechos de agricultura; todos éstos pueden demostrar altos rendimientos celulares. Así la utilización de éstos subproductos presentan buenas ventajas, las que se pueden considerar apropiadas para estimar un subproducto de la industria, entre los que estarían: 1) Un medio fácil de preparar sin requerir pre-tratamiento de ninguno de sus constituyentes, 2) Obtener el medio de cultivo que soporte un buen crecimiento y toxicidad, 3) Los costos del material para la fermentación bajos al usar productos de la fermentación industrial (18).

#### RECUPERACION DEL INSECTICIDA

Una etapa importante en la producción de insecticidas biológicos es la recuperación del complejo espora-cristal, procediéndose a la eliminación de agua. Entre los objetivos importantes es la preservación del producto durante un almacenamiento prolongado. El procedimiento de deshidratación es necesario para reducir la humedad final del ingrediente activo, lo cual nos permite limitar el crecimiento de otros organismos y otras reacciones indeseables. Otro objetivo de la deshidratación es la significativa reducción del volumen del producto, proporcionándose eficiencia en el transporte y almacenamiento del producto.

El primer método para obtener concentraciones estables y secas del complejo espora-cristal en el laboratorio fue la liofilización, pero frecuentemente se tenían significativas pérdidas de esporas y cristales y considerable aglomeramiento del complejo. Un método más satisfactorio para obtener materiales liofilizados involucra la utilización de suspensiones de lactosa con el complejo. Sin embargo, la liofilización no fue ampliamente aceptada debido al gran volumen de líquido involucrado, mismo que finalmente resulta bastante difícil y costoso (32).

La acetona, considerada como un precipitante de las proteínas, fue utilizada para recuperar células bacterianas y esporas de concentrados acuosos, lo cual resultó un posible sustituto, sin embargo, el producto fue después apelamizado y difícil de resuspender. Por lo tanto se intentó modificar el proceso de precipitación de acetona para hacerlo más adecuado a la recuperación del complejo espora-cristal de B. thuringiensis,

utilizandose lactosa; el apelmazamiento fue reducido suspendiendo el complejo concentrado en soluciones de lactosa y precipitando la lactosa con el complejo por la adición de acetona, el precipitado fue fácilmente recuperado como una preparación seca y estable, y sin presentar dificultad para resuspenderlo en agua (32).

Sin embargo, este proceso de precipitación es utilizado en recuperación de pequeña escala, resulta impráctico cuando se trata de recuperación a niveles más grandes (piloto o industrial), por el costo de acetona empleada, una solución a este problema fue mediante la utilización de un método que consiste en dos etapas, la primera de ellas por medio de una separación mecánica como lo es la centrifugación y la segunda mediante un proceso térmico como es el secado por aspersión.

Este tipo de secado fue adaptado a fluidos con un alto contenido de humedad y que son sensibles al calor. Dentro de las ventajas que ofrece el secado por aspersión están su rápido ciclo de secado, un corto tiempo de retención del producto dentro de la cámara de secado y el producto final es fácil de envasar. El tiempo de retención es tan bajo como 3-10 segundos y la partícula del producto nunca puede alcanzar una temperatura más alta que la temperatura del bulbo húmedo del aire usado para secar. La anterior situación permite el uso de altas temperaturas sin causar daño al producto (63).

## ESTANDARIZACION Y BIENSAYO

En un esfuerzo por conocer las unidades más apropiadas para medir la actividad insecticida de una preparación patógena de *B. thuringiensis*, necesidad que surgió al observar que las preparaciones comerciales presentaban una baja y variable actividad insecticida según la cepa utilizada comercialmente (2,5). De esta forma la cuenta de esporas o rangos de crecimiento se desechó sin encontrar relación con la actividad insecticida de la  $\delta$ -endotoxina (24,33). En Wageningen, países bajos, se recomendó que la formulación E-61 de *B. thuringiensis* fuera adoptada como un estándar primario de referencia internacional asignándole una potencia de 1,000 Unidades Internacionales (UI/mg) (4,31). Mas adelante, Dulmage (1969), recuperó el aislado de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, designado como HD-1, la cual fue 20 a 200 veces más potente en la producción de la  $\delta$ -endotoxina (2).

En 1972, en una reunión celebrada en Brownville Texas, representantes de tres productos en Estados Unidos: proponen que las formulaciones de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis*, se estandarizan mediante un bioensayo contra *Trichoplusia ni* y compararlo con un material estándar internacional, las actividades de estas formulaciones son expresadas en UI/mg. De esta manera una formulación de HD-1 llamada HD-1-S-1971, fue adoptada como una referencia primaria, la cual presenta una potencia de 18,000 UI/mg (4,24,23,25).

La estandarización se define como la adopción de las unidades más apropiadas para medir la potencia insecticida de una preparación patógena y existen varios métodos para la aplicación de insecticidas; los de contacto matan todos los estadios de un insecto por exposición directa con sus superficies corporales, a diferencia de los insecticidas biológicos a base de B. thuringiensis: la infección se presenta principalmente por ingestión con el alimento, en el estadio larval. Los cultivos esporulados de bacterias, pueden ser secados y formar un polvo fino, que es aplicado como suspensión; o bien mediante algunas técnicas desarrolladas para químicos, como aplicación con adhesivos, agentes humectantes, emulsificadores diluyentes y acarreadores, los cuales están libres de efectos bactericidas y bacteriostáticos. Entre los compuestos satisfactorios para la aplicación de los insecticidas biológicos se encuentran: leche en polvo descremada, lacas de vinil, mezclas de aminosterato, agua, aceite y algunas arcillas.

Dulmage (1970), recuperó el complejo espora-cristal, de caldos producidos de 12 variedades de B. thuringiensis, donde encontró que es inadecuado predecir la actividad por: variedad, cantidad de crecimiento del organismo y medio de fermentación; por lo tanto, para determinar la potencia de las formulaciones de  $\delta$ -endotoxina, se requiere de un bioensayo: determinación de serotipo, medio de fermentación o cuenta de esporas. Sternohous y Jerrel (1950) encontraron apropiado y necesario estimar las siguientes características: 1) especificar la variedad y aislado usado; 2) medir la actividad por medio de un bioensayo, ya que resulta inadecuada la cuenta de esporas, 3) estudiar la producción de la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis como un efecto de la fermentación.

En cuanto a la medición por bioensayo, el primer reporte de adopción del mismo fue propuesto en 1971, utilizando I. ni como organismo de prueba, en 1973 Galowali, propone uno mediante una suspensión purificada de los cristales, que es depositada en un pequeño triángulo de hoja de col fresca que es insertada a través de una rendija a un recipiente en el que se encuentra la larva del quinto estadio de Pieris brassicae, la cual consume en breve tiempo la dosis aplicada, encontrándose bastante variación debido a la distribución de la toxina y apetito larval individual (40).

Dulmage y col. (1976) establecieron un procedimiento de bioensayos basado en el anterior, pero con modificaciones para aumentar su eficiencia: utilizando larvas neonatas de Heliothis virescens como insecto prueba y adoptándose formulaciones de B. thuringiensis HD-1-S-1971 como el estándar primario oficial de referencia (24,33).

Schesser y col. (1977), proponen dos formas de introducción de la toxina, una: el material insecticida es incorporado en la dieta agar-base y otra: la cantidad de material insecticida es depositado en la superficie de la dieta artificial (78).



PREPARACIONES COMERCIALES A BASE DE

B. thuringiensis

CEPA	NOMBRE COMERCIAL
H 1 / thuringiensis	Bactosbeine
H 3 / kurstaki	Thuricide. Delfin. Javelin Forav 48 B Biobit Novo-Dupont Foil/Condor/Citlass Dendrobacilline Larvo-Bt Boxil-Bt Dipel
H 7 / aizawai	Certan Florbac
H 8 / morrisoni (tenebrionis v san diego)	Di Terra M-Uno Trident Novodor
H 14 / israelensis	Vectobac Bactimos Teknar Skeetal
B-Exotoxina-espora-cristal	Eksotoksine Toxobacterine

ref. Galán. (38)

En 1978, Moraes y Chaib, realizaron un bioensayo para determinar el efecto de B. thuringiensis sobre larvas de Plodia interpunctella por medio de espolvoreo asperjado del producto insecticida sobre un sustrato alimenticio (arroz) obteniendo una DL<sub>50</sub> igual a 0.725% (65).

## INSECTO BLANCO

El gusano cogollero del maiz, S. frugiperda (Smith) es una plaga agrícola de importancia económica para cultivos de maiz en México, las larvas que lo infectan, se encuentran ampliamente distribuidas en los estados de Morelos, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo y Yucatán, los daños son bastante considerables cuando una parcela se deja sin protección con algún método de control, se pierden unas dos terceras partes aproximadamente del cultivo, y en ocasiones estas pérdidas son mayores (48,80).

Actualmente esta plaga causa daños de alrededor del 50% de la cosecha en regiones como la Península de Yucatán. Situaciones similares se presentan en el Noreste y Noroeste del país, como en el Valle del Yaqui en Sonora y la Comarca Lagunera de Coahuila (80).

El rizador del Repollo Trichoplusia ni; se encuentra distribuido en las zonas algodonerías de los Estados de Baja California, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango, Tamaulipas, Morelos y Chiapas (81).

Además de atacar a plantas de la familia de las crucíferas, ésta daña también a la lechuga, espinaca, betabel, chícharo, apio, perejil, papa, clavel, berro, algodón, melón, sandía y cártamo (64).

## MATERIALES Y METODOS

### I.- Obtención, Identificación y Mantenimiento de Cepas:

Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por la colección de cepas de B. thuringiensis GM-UANL del Depto. de Microbiología e Inmunología, FCB-UANL, las cuales poseen las claves de colección GM-7 y GM-10, ambas cepas fueron identificadas por medio de métodos serológicos como B. thuringiensis var. aizawai y mantenidas para su conservación por resiembras periódicas en Agar Nutritivo pH de 7.0 y se incubaron a 30°C/24 h y se almacenan a temperatura de refrigeración.

### II.- Medios de Cultivo:

Se probaron tres diferentes medios de cultivo, los que contienen como fuente de carbono Melaza, Dextrosa y Jugo de Agave; como fuente de nitrógeno harina de soya, suplementados con Líquido de Remojo de Maíz como factor de crecimiento, (Tabla 1a) además de CaCO<sub>3</sub> como amortiguador del pH y fuente de Calcio (Tabla 1).

### III.- Experimentos a Nivel de Matraz:

a) **Inóculo.**- Las cepas de Bacillus thuringiensis se activaron en Agar Nutritivo pH de 7.0 y se incubaron a 30°C/24 h, para tomar varias asadas e inocular en Matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con caldo Triptosa y Fosfato (CTP) a pH de 7.0, manteniéndose en agitación a 200 rpm durante 18-24 horas a 30°C. en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific). En seguida se tomaron 0.5% (V/V) de este inóculo para sembrar en los medios de producción del complejo spora-cristal de este microorganismo. Por otro lado, se determinó el número de células viables introducidas al medio de producción (Fig. 1).

b) **Condiciones de Propagación.**- Se usaron matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio, manteniéndose en agitación a 200 rpm a temperatura de 30°C para la selección del medio de fermentación (MF) cuyas condiciones resultaron más apropiadas para producir esta bacteria.

c) **Determinación de la Cinética.**- Se tomaron alícuotas de 5 ml cada 24 h, efectuándose frotis consecutivos hasta encontrar un 80% de liberación de esporas y cristales.

- 1.- Determinación del pH.- Se depositó 1 ml de la muestra del cultivo en 15 ml de agua destilada a pH= 7.0 para medir el pH resultante.
- 2.- Consumo de azúcares.- Las muestras de cada 24 horas fueron almacenadas bajo congelación y posteriormente descongeladas para centrifugarlas a 3,000 rpm durante 15 minutos, y del sobrenadante se cuantificó azúcares reductores por el método del Acido 3,5, DNS, (Dinitrisalicílico), realizándose lecturas a una longitud de onda de 540 nm (84).

d) **Recuperación del Complejo Espora-Cristal.**- Se efectuó al final de la fermentación, usando el procedimiento descrito por Dulmage y Col. (1970), que consiste en una coprecipitación con Lactosa-Acetona (32) (Fig. 1).

e) **Conteo de Esporas.**- Se utilizó 1.0g de extracto y se diluyó en 9 ml de solución salina estéril pH= 7.0 pasterurizándose a 80°C por 10 minutos, posteriormente se hicieron 8 diluciones más y el recuento se llevó a cabo por la técnica de Difusión en Placa por duplicado, incubándose a 37°C por 24 horas.

f) **Bioensayos de los Extractos de Matraz.**- De los extractos recuperados de las fermentaciones, se probaron contra larvas neonatas de *S. frugiperda*, mediante bioensayo, para determinar el % de muerte. Las larvas fueron alimentadas con una dieta nutritiva de Shorei modificada (Tabla 1b), aplicando una dosis única de 500µg del complejo espora-cristal por ml de dieta de cada uno de los extractos. Se utilizaron 20 larvas distribuidas en 20 recipientes, dejándose 10 larvas para control. El total de recipientes se incubaron a 25°C y a una humedad relativa de 55%; después de 7 días de incubación se determinó el porcentaje de muerte (Fig. 3). Al obtenerse ese dato de cada muestra, se seleccionó el mejor medio de cultivo para extrapolar datos a un fermentador de 14 litros de capacidad.

#### IV.- Experimentos a Nivel de Planta Semipiloto.

El resultado de los experimentos a nivel de matraz, se extrapoló a un microfermentador, Modelo M19-1410 New Brunswick Scientific con capacidad de 14 litros de la siguiente manera:

a) **Inóculo.**- Se utilizó como preinóculo el medio CTP bajo las mismas condiciones ya mencionadas; transfiriéndose 1.0% (V/V) aun un Matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml del Medio de Cultivo (MF) seleccionado, manteniéndose en agitación a 200 rpm por 20 h a 30°C y con éste se inoculó el fermentador, el cual contenía un volumen de operación de 9 litros del mismo medio de cultivo (Fig.2).

**b) Condiciones de Propagación.**— Manteniéndose constantes a todo lo largo del proceso de fermentación como sigue: La agitación fue de 700 rpm y una aireación de 1 VVM con respecto a la temperatura, ésta fue de 30°C, el pH del medio se mantuvo a 7.0 ajustándose con HCl 1N o NaOH 1N, hasta observar el inicio de la esporulación para posteriormente dejar que se eleve hasta 8.0 para la liberación final de la espina y cristal. Para el control de la espuma fue mediante Antiespumante Tipo "A" (Dow Corning) al inicio de la fermentación.

**c) Cuantificación de Parámetros de Cultivo.**— Se colectaron muestras de 15 ml del microfermentador a intervalos de 2 h, durante un período de 20-26 h de fermentación. Mediante frotis consecutivos se corroboró el final de la esporulación hasta observar una liberación del 80% de esporas y cristales.

- 1.- Cuenta Viable.— Se tomó 1 ml de la muestra para posteriormente efectuar diluciones en solución salina estéril a pH= 7.0, y el conteo se efectuó por el método de difusión en placa, por duplicado e incubándose a 37°C por 24 h.
- 2.- Determinación de pH.— Se llevó a cabo con un electrodo de pH tipo Inoold conectado directamente al fermentador y para corroborarlo, se midió por separado la muestra, mediante potenciómetro.
- 3.- Determinación de la Demanda de Oxígeno (D.O.).— Esta cuantificación se realizó en una etapa anticipada a la fase estacionaria, con el fin de tener la máxima cantidad de células, donde al final se obtiene una buena cantidad de esporas y cristales. Esta demanda se basa siguiendo el método Humphrey, A.E. et al. (1967), que consiste en eliminar en dicha etapa, la aireación y prácticamente la agitación. En este momento la concentración de oxígeno disuelto es abatida como una función de la concentración de células presente, las cuales, de esta manera muestran su requerimiento de oxígeno expresado como  $Na = \frac{dO_2}{dt} \times \text{hora}$  ( $dO_2$  gramos de oxígeno, l= Litro de Medio de Cultivo) (89).

Esta determinación se realiza valiéndose del apoyo que proporciona un electrodo de Oxígeno Tipo Johnson - Borkowsky a base de plomo y plata, el cual independientemente de medir actividad de oxígeno, nos permite dilucidar el porcentaje de saturación del gas en un medio de cultivo.

La información de la D.O., es importante, ya que permite visualizar si el reactor es capaz de cumplir con esa demanda, a través de su sistema de agitación y aireación.

4.- Determinación del Coeficiente de Respiración,  $QO_2$ .- Es un factor más importante que el D.O. debido a que éste, representa una velocidad específica de utilización de oxígeno expresada como:  $QO_2 = qO_2/g \text{ cel.} \times \text{hora.}$  ( $qO_2 =$  gramos de Oxígeno por g cel.= gramos de Células), obteniéndose a través de dividir la D.O. entre la cantidad de células existente en cada litro de medio de cultivo.

5.- Coeficiente de Transferencia de Oxígeno ( $Kla$ ).- Hay que hacer notar que la D.O. y  $QO_2$  son dos parámetros específicos o afines al microorganismo, sin embargo, el coeficiente de transferencia de Oxígeno ( $Kla$ ) es un parámetro que representa las características de un reactor biológico, y que aunque se cuantifique durante el proceso de fermentación no deja de ser una representación de las características físico-mecánicas del fermentador.

Para medir este parámetro se puede realizar siguiendo la técnica de Humphrey, A. et al. (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 suponerse que esta situación no es así (89).

Para establecer una metodología sencilla de medición de este parámetro, se divide la D.O. entre el gradiente de concentración de Oxígeno que prevalece durante la medición, obteniéndose un coeficiente de transferencia de oxígeno expresado como  $Kla = HR^{-1}$ .

6.- Energía de Agitación.- El consumo de energía por concepto de mezclado es uno de los factores económicos de gran interés en una fermentación aeróbica. El sistema de mezclado formado por el motor, las propelas, difusor de aire, las mamparas, permiten crear mejores condiciones posibles de homogeneidad en el caldo de fermentación, sin embargo, se conoce de antemano que la reología de Bacillus thuringiensis es del tipo No Newtoniano, por lo que este parámetro se vuelve más importante aún. Su medición está respaldada por el uso de un multímetro que nos permite cuantificar el amperaje empleado por la fuerza de agitación; éste dato puede ser traducido fácilmente a unidades de potencia,  $H_p$ , que componen la potencia por unidad de Volumen expresada como:  $H_p/V$  ( $H_p/1000 \text{ l}$ ).

7.- Cuantificación de la Fuente de Carbono.- Las muestras recuperadas durante el monitoreo se almacenaron a temperatura de congelación y posteriormente se descongelaron y centrifugaron a 3,000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se analizó por el método del Ácido 3,5 Dinitrosalicílico, método espectrofotométrico

para determinar azúcares reductores, leyéndose la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (84).

d) **Recuperación del Complejo Espora-Cristal.**— Al finalizar la fermentación, se ajustó el pH del medio a 7.0 con HCl 1N. luego se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos. El precipitado se secó en un aspersor con un atomizador de centrifuga a una temperatura de entrada de 130°C y una temperatura de salida de 70-80°C (Fig. 2).

e) **Cuenta de Esporas Viables.**— Se llevó a cabo de la misma manera que para los extractos obtenidos a nivel de laboratorio.

f) **Bioensayos de los Extractos de Fermentador.**— Se utilizaron larvas del primer estadio del Gusano Cogollero del Maíz (*S. frugiperda*), alimentándolas con una dieta artificial de Shorei modificada (Tabla 1b) (49). Para encontrar el porcentaje de muerte del complejo espora-cristal, se partió de una solución madre de 500µg del producto de la extracción, y de aquí se obtuvieron las diluciones correspondientes a 500µg, 250µg, 100µg, 50µg, 25µg, 10µg y 1µg por ml de dieta, utilizándose 10 larvas por dilución, distribuidas en 10 copas, posteriormente se incubaron a una humedad relativa de 55% y 25°C de temperatura, por un periodo de 7 días. Se tomó el número de larvas muertas en cada dilución de la muestra, para a partir de este dato, determinar la mortalidad (Fig. 3).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Experimentos a Nivel de Laboratorio

En todos los ensayos realizados se obtuvo un buen crecimiento y esporulación de Bacillus thuringiensis, de igual manera, se encontraron resultados semejantes en el consumo de azúcares por estos aislados como se puede ver en las Figuras 4 y 5.

Se observa que en los diferentes medios de cultivo (Tabla 1) el pH se mantiene durante la fase de crecimiento exponencial, para luego llegar a un rango de 8.0 a 8.5 y con esto alcanzar la esporulación al presentarse su marcado descenso en el consumo de la fuente de carbono hasta llegar a valores mínimos al rededor de las 48-72 hrs. (Figs. 4 y 5).

Al observar los conteos de esporas de los extractos, éstas presentan similitud, excepto en algunos casos, aún y cuando no existe una relación con el porciento de muerte y a pesar de que las cepas hubiesen crecido en distintos medios de cultivo (Mz, Dx y JA), dado que son pequeñas las diferencias en el conteo final de esporas y cristales para cada uno de los aislados (Tabla 2).

Se puede ver en la Figura 6 y Tabla 2 el grado de actividad de B. thuringiensis var. aizawai cepas GM-7 y GM-10 contra larvas del primer estadio del gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda), que varía su porcentaje de muerte y concuerda con lo reportado por Dulmage (1970) y Smith (1982), quienes señalaron que la toxicidad de esta bacteria a insectos es específica y depende tanto de la cepa (serotipo o variedad), como del medio donde se cultivó dicho aislamiento (21,82).

Los resultados de bioensayos efectuados con el complejo espора- cristal  $\delta$ -endotoxina, para cada una de las cepas de B. thuringiensis var. aizawai a una concentración de 500  $\mu$ g de extracto por ml en la dieta, se encontró que la GM-7 cultivada en medio a base de dextrosa (Dx) como fuente de carbono, resultó con un 93% de muerte y la misma cepa en el medio de melaza (Mz) con un 89% de mortalidad y la GM-10 en el medio con jugo de agave (JA) con un 84% de muerte. De ellos cabe destacar la producción en g/l de la cepa GM-7 en melaza con 17g de extracto por litro de medio y en dextrosa con 7 g de extracto por litro de medio, y por otro lado la cepa GM-10, con estos mismos medios se obtubieron 14 y 13 g de extracto por litro de medio respectivamente (tabla 2). Un medio a base de melaza como fuente de carbono; fue reportado por Sánchez (1985), quien cultivó la cepa HD-1 y encontró una potencia mayor que el estándar (STD-HD-1-1980) de 18,242 UI usando como insecto de prueba Heliotis virescens (76).

Dulmage (1971), señala que una cepa de igual variedad que otra, y sin embargo aislada por otra fuente puede presentar distinta actividad biológica, así como obtenerse varios rangos de toxicidad para un mismo insecto de prueba, sin importar si crecen



en medios de cultivo idénticos, lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo (22).

La importancia de seleccionar un medio de cultivo que soporte una alta producción de esporas y cristales, es un factor determinante en la mortalidad que presenta ésta cepa; por lo que, con estos resultados se nos indica que resultó mejor probar a nivel de fermentador de 14 litros la cepa GM-7 en el medio de melaza (Tablas 1 y 2) (54).

### Experimentos a Nivel de Planta Semipiloto

La cuantificación de la cinética microbiana de cepas de Bacillus thuringiensis var. aizawai cepa GM-7, mostró un perfil de comportamiento muy similar al reportado por otros autores (39, 58, 59, 60, 61, 62, 63) que componen el grupo de investigación a nivel nacional. Por otro lado, es importante mencionar que conceptos sobre biotecnología de B. thuringiensis, hay muy pocos publicados en la literatura científica, la mayoría de ellos son de tipo bioquímico, microbiológico y toxicológico.

El definir las condiciones de propagación de B. thuringiensis cepa GM-7 permitió la obtención de la mayor cantidad posible del número de cristales, tomando en consideración parámetros que están relacionados con la Transferencia de Masa, como el Oxígeno, el cual se vio reflejado en forma de demanda de Oxígeno ( $N_a = gO_2/l \times h$ ) parámetro típico y afín del microorganismo. (10, 11, 19, 44, 51, 53), mientras que la transferencia de Oxígeno ( $K_{La} = Hr^{-1}$ ) es parámetro típico de las características de diseño y construcción de un Reactor Biológico (12, 13, 88).

Durante el desarrollo de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 a nivel de planta semipiloto, se obtuvo una respuesta general de crecimiento que se expresa en las tablas 5 y 7, esta cinética es típica, sin embargo, algunos autores han encontrado anomalías que reflejan la posibilidad de que el microorganismo posea diferentes alternativas enzimáticas para la utilización de los componentes del medio de cultivo (8).

La existencia de una reología de tipo no newtoniano en el caldo de fermentación en el cual se propaga B. thuringiensis (Tabla 1), se ve expresada por los valores obtenidos en los conceptos de Oxígeno Disuelto (O.D.); Coeficiente de Respiración  $QO_2$  y Coeficiente de Transferencia de Oxígeno ( $K_{La}$ ). Con las Tablas 4 y 6 se puede observar que los experimentos realizados con el propósito de verificar el efecto de mezclado de la cinética microbiana de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 indican claramente que los requerimientos de oxígeno por parte del microorganismo son bajas. Así por ejemplo, al observar el efecto de la agitación se establece que la Demanda de Oxígeno para esta cepa, oscila entre 0.109 y 0.141  $gO_2/l \times h$ . valores que, definitivamente por tratarse de una fermentación aeróbica, son relativamente bajos al compararse con los de otros autores

que reportan valores que varían en el rango de 1.2 a 3.5  $\text{gO}_2/\text{l} \times \text{h}$ . (1,3,7,17,53,71).

Con referencia a las respuestas que ofrece la cepa de *B. thuringiensis* var. *aizawai* cepa GM-7, ante las condiciones de mezclado que prevalecen durante su propagación, en las Tablas 4, 5, 6 y 7 podemos observar que el microorganismo presenta diferentes comportamientos ante los parámetros de velocidad de agitación y aereación. Desde el punto de vista de las condiciones de mezclado se conoce que la agitación favorece más a la producción de células que la aereación, y así por ejemplo: al anexar los datos de la demanda de oxígeno y el coeficiente de respiración, se encontró que la demanda de Oxígeno se va incrementando en función al aumento de la velocidad de agitación, y lo mismo sucede con el coeficiente de respiración ( $QO_2$ ). Esta respuesta indica que conforme aumentamos la calidad de transferencia de masa, el microorganismo tiene una mayor disponibilidad de oxígeno, de tal manera que se beneficia y podemos obtener con ello un aumento en la cantidad de esporas/ml, lo cual se puede apreciar en las Tablas 5 y 7.

Por otro lado al analizar el coeficiente de rendimiento, observamos que este permanece constante prácticamente, lo que significa que independientemente de que el microorganismo disponga de una mayor cantidad de oxígeno para aspectos de respiración, su capacidad para transformar el sustrato permanece constante, sin embargo, se encontró que durante la fase estacionaria las esporas/ml sufren un cambio significativo, lo cual demuestra que parte de su biosíntesis es utilizada para la formación de nuevos cristales (Fig. 8).

Estos resultados, englobados en las cuatro tablas ya mencionadas, nos dan una imagen muy importante desde el punto de vista de diseño y construcción de reactores biológicos, ya que al analizar los valores de Demanda de Oxígeno, se puede observar que aún y cuando este microorganismo es poco exigente en cuanto a la cantidad de oxígeno por  $\text{gO}_2/\text{l}$  por hora, (Na), las condiciones de mezclado resultaron importantes para una buena esporulación y formación de cristales. Para esclarecer este punto, en la figura 7 se pretende establecer un criterio, que *B. thuringiensis* es un microorganismo dependiente de las condiciones de operación y de la formulación del medio de cultivo para elaborar un producto con cierto nivel de toxicidad, y de acuerdo con las experiencias que se han realizado hasta ahora en nuestro grupo de investigación, se puede concluir que todas las cepas que se han probado para Control Biológico se comportan de una manera muy similar, es decir, por reacciones un tanto distintos ante los cambios de formulación de medios de cultivo y de las condiciones de operación.

Al hacer un análisis de los parámetros de mezclado en el reactor biológico durante la propagación de la cepa de *B. thuringiensis* cepa GM-7 se puede establecer que las condiciones de la mecánica del fluido que prevalecen dentro del reactor son

las que están relacionadas, específicamente, a las de un fluido no newtoniano.

Por lo anterior, es conveniente establecer que toda la investigación que se pudiera realizar en un futuro tendría que ser con respecto a este tipo de fermentaciones que son muy similares a las de tipo micelial en las que los problemas de transferencia de masa y de calor son de bastante importancia, aún cuando se visualiza el escalonamiento de proceso. El diseño y construcción de cada una de las partes que componen al reactor es de gran interés, así como el hacer un análisis de la influencia que tiene cada una de las partes del reactor como pudieran ser las propelas; su tamaño, su diámetro, su altura, el número de baffles, ancho de éstos, tipo de difusor de aire, diámetro de los orificios en el difusor de aire, la relación que hay en el diámetro del tanque y el diámetro de las propelas, etc. Las condiciones de mezclado vienen a tener una influencia muy significativa sobre la respuesta del microorganismo, considerando aún más que es muy probable que a diferencia de la mayoría de los casos de procesos de fermentación, en que el criterio de escalonamiento se encierra alrededor de los coeficientes de transferencia de masa, velocidad de agitación, número de Reynolds, etc., para el caso de B. thuringiensis var. aizawai el criterio básico más importante de su escalonamiento será el de toxicidad que se obtenga al final del proceso.

Al hacer una comparación de los resultados encontrados, con los de otros autores se puede concluir que hay similitud de una manera general a las respuestas de cinética y fisiología microbiana bajo estas condiciones de operación y formulación de medios de cultivo (Fig. 8). Sin embargo, es necesario hacer notar que a pesar de estas respuestas, existen diferencias cuando se analizan desde el punto de vista de consumo de energía y demanda de oxígeno; con lo anterior podríamos decir que la suplementación de oxígeno para sufragar estas demandas, están muy relacionadas con las de transferencia de masa con respecto al transporte de nutrientes al interior de la célula; si en un momento determinado la célula no requiere de tanta cantidad de oxígeno en el medio de cultivo (Fig. 8), es muy probable, que las condiciones de mezclado tengan que prevalecer para poder satisfacer el transporte de nutrientes al interior de la célula. Lo anterior se puede constatar al analizar la concentración de células y del coeficiente de rendimiento en base a sustrato; en la tabla 6 se hace un análisis sobre el mismo se puede establecer que éste se incrementa, en función del cambio de los parámetros como la aereación, donde los valores van desde 0.5 VVM a 2.0 VVM. Lo anterior nos sirve de base para reafianzar el criterio de que las condiciones de mezclado son importantes para que el microorganismo tenga mayor eficiencia en la disponibilidad de los ingredientes que componen el medio de cultivo, sería apropiado hacer análisis más exhaustivos al estudio o al efecto que tienen cada una de las partes que componen al reactor.

En lo referente al diseño de reactores, la literatura es muy amplia en lo que respecta a la influencia de la aereación y la agitación sobre el crecimiento microbiano (35,36,44,45,50,53,71,73,90). Sin embargo en lo que respecta a B. thuringiensis es muy poco lo que se ha publicado hasta ahora (27,87) por lo anterior, es conveniente establecer que a partir de los resultados que se han mostrado aquí de la cepa de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 es necesario ahondar en la investigación con relación a la reología del medio de cultivo y analizar cada uno de los parámetros que lo componen, por ejemplo: el número de Reynolds ( $NRe = Di^2 \cdot N \cdot \rho / \mu$ ); este número podría encontrar una serie de factores que tiene una influencia muy significativa sobre la calidad del medio de cultivo, y este a su vez desempeña un papel importante en cuanto a la eficiencia con la que el microorganismo se está propagando. Los estudios reológicos por lo general están relacionados con: Demanda de Oxígeno, influencia del tamaño y la velocidad de las propelas, así como la viscosidad aparente del medio de cultivo; por lo anterior se sugiere que estos estudios se lleven a cabo con el fin de definir más claramente las condiciones que deben prevalecer en cuanto a aspectos de mezclado para que B. thuringiensis var. aizawai pueda propagarse adecuadamente y que, en función de ésto resulte una mejor propagación y toxicidad para la cepa.

Existe una gran controversia con respecto a B. thuringiensis y su toxicidad, ya que algunos autores consideran que las condiciones de operación durante el proceso de fermentación no presentan relevancia alguna en la capacidad tóxica de la toxina (27,87), sin embargo, los estudios realizados por Medrano 1987 y 1989, establecen que existe una relación muy estrecha entre el medio de cultivo, las condiciones de operación y la toxicidad del bioinsecticida, lo cual de alguna manera se manifiesta en nuestro caso también (60,62).

Para ello podemos observar que para B. thuringiensis var. aizawai el tiempo del proceso ( $T_p$ ) osciló alrededor de 30 h, mientras que el tiempo de esporulación ( $T_e$ ) fue aproximadamente de 8 h, conduciendo a una formación de esporas promedio de  $25 \times 10^9$  esporas/g de extracto. Estos resultados responden a valores de Mortalidad del 100 % con 500  $\mu$ g de extracto/ml de dieta, que comparados con los obtenidos por Medrano y col. 1987 (58) se concluye que son afines desde el punto de vista de condiciones de operación en el proceso de fermentación.

Los estudios realizados por Medrano y col. (1987,1989) con relación al diseño de equipo conducen a reforzar el concepto que se encuentra en la Fig. 7, la cual establece que para la producción de bioinsecticidas definitivamente se deberá considerar las condiciones del proceso, la formulación del medio de cultivo y la toxicidad, éstos tres conceptos están rodeados de trabajo experimental a nivel de aereación, agitación, Oxígeno Disuelto, trabajo de planta semipiloto, estudios nutricionales a nivel de matraz, así como estudios relacionados con la influencia de la concentración tanto de la fuente de carbono como de

nitrógeno, para finalizar con lo concerniente a la toxicidad del complejo espora-cristal que habrá de ser probado a nivel de campo experimental para ver su acción específica contra el insecto plaga que se desee combatir (60,62).

## CONCLUSIONES

### A) Experimentos a nivel de Laboratorio.-

- 1.- Los conteos de esporas de los extractos, son similares ya que son pequeñas las diferencias para cada uno de los aislados ( $\times 10^9$ ) que permitió la obtención del mayor número de cristales.
- 2.- La cepa de B. thuringiensis que presentó mayor actividad contra Spodoptera frugiperda, mediante bioensayo fué la GM-7 en el medio Dextrosa con 93% de muerte y en Melaza con un 89% de muerte, a una dosis de 500 $\mu$ g/ml. del extracto.
- 3.- B. thuringiensis GM-10 presentó su mayor toxicidad al cultivarse en el medio con Jugo de Agave con un valor de 84% de mortalidad, bajo la misma dosis.
- 4.- La mayor producción de extracto fué de 17g/l con la cepa GM-7 en el medio con melaza de caña de azúcar, a condiciones de laboratorio.

### B) Experimentos a nivel de Planta Semipiloto.-

- 1.- Los parámetros óptimas de fermentación de B. thuringiensis var. aizawai GM-7 son: velocidad de agitación 700 rpm, aereación 1 VVM y con un tiempo de proceso de 30 h.
- 2.- La producción de extracto se elevó a 19g/l con el medio de cultivo a base de melaza de caña de azúcar en B. thuringiensis var. aizawai GM-7.
- 3.- B. thuringiensis var. aizawai GM-7 mostró una Demanda de Oxígeno ( $N_a$ ) entre 0.109 y 0.141 gO<sub>2</sub>/l x h. y un Coeficiente de Respiración ( $RQ_2$ ) de 0.150 gO<sub>2</sub>/g cel. x h., los cuales son bajos y atractivos, desde el punto de vista industrial.
- 4.- Los bioensayos, utilizandose larvas neonatas de S. frugiperda, mostraron un 100% de muerte empleandose extractos de B. thuringiensis var. aizawai GM-7.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Bartholomew, W.H. and Karow, E.O. 1979. Economic of Fermentation Processes. Chapter 18 of Microbial Technology. Ed. by H.J. Pepler and D. Perlman, Academic Press. Vol II: 463-496.
- 2.- Beeple, C.C. 1979. Use of Entomogenous Bacteria in Agroecosystems. Chapter 8, in Development in Industrial Microbiology. 20: 97-104.
- 3.- Blanch, H.W. and Brierley, J.A. 1976. Non-Newtonian fermentation broths: Rheology and mass transfer. Biotech. and Bioeng. 18: 745.
- 4.- Burgeron, A. and Dulmage, H.T. 1977. Industrial and International Standardization of Microbial Pesticides 1 Bacillus thuringiensis. Entomophaga. 22: (2), 121-129.
- 5.- Burges, H.D. and Thompson, E.M. 1971. Standardization and Assay of Microbial Insecticides. In Microbial Control of Insects and Mites. H.D. Burges y N.W. Hussey, Eds. London, 591-622.
- 6.- Burges, H.D. 1969. Control of Insects of Bacillus thuringiensis Proc. 5th. Br. Insectic. Fungic Conf. 405-411.
- 7.- Calderbank, P.H. 1967. Mass transfer in fermentation equipment. Biochem and Biol. Eng. Sc. (N. Blakebrough, Ed.) Academic Press. New York, N.Y. 1: 101.
- 8.- Carrera, G.M., Medrano, R.H., Solís, S.A., Lerma, R.S., Hayakawa, M.A., Villarreal, M.A., Córdova, G.V., García, G.C., Pérez, M.E., Saucedo, M.L. y Galán, W.L.J. W. 1989. Producción de un bioinsecticida a partir de una cepa autóctona de B. thuringiensis var. aizawai L.P.-1, para combatir la palomilla del manzano (Cydia pomonella). Res. III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Monterrey, N.L.
- 9.- Castro A.J.H. 1982. Toxicidad de Bacillus thuringiensis GM-1 y GM-2 en Spodoptera frugiperda y Trichoplusia ni (Hemiptera: Noctuidae). Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey N.L., México (tesis inédita).
- 10.- Chance, B. 1957. Cellular oxygen requirements, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 16: 671-675.

- 11.- Cooney, C.L., Wang, D.I.C. and Mateles, R.I. 1968. Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. *Biotech. and Bioeng.* 11: 269.
- 12.- Cooper, C.M., Ferstron, G.A. and Miller, S.A., 1944. Performance of agitated Gas-Liquid Contractors. *Ind. Eng. Chem.* 36: 504.
- 13.- Cooper, R.G. and Wolf, D. 1968. Velocity profiles and pumping capacities for turbine type impellers. *Can. J. Chem. Eng.* 46: 94.
- 14.- Couch, T.L. and Ross, D.A. 1980. Production and utilization of Bacillus thuringiensis. *Biotech. and Bioeng.* 22: 1297-1304.
- 15.- De Barjac, H., Cosmao, D.V., Frachon, E. and Ripouteau, H. 1989. Collection of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus (Classified by H. serotypes) in Catalogue of strains. International Entomopathogenic Bacillus Centre. W.H.O. Collaborating Centre Institute Pasteur, Paris, Francia.
- 16.- De Barjac, H. and Frachon, E. 1990. Classification of Bacillus thuringiensis Strains. *Entomophaga* 35 (2): 233-240.
- 17.- Deindoerfer, F.H. and Gaden, E.L. 1960. Rheological examination of some fermentation broths. *J. Biochem. and Microbiol. Tech. and Eng.* 2: 165.
- 18.- Dharmstithi, S.C., Pantuwatana, S. and Bhumiratana, A. (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.
- 19.- Douglas, W.R. 1969. Automatic assesment of respiration during growth in stirred fermentors. *American Soc. for Microbiol.* Washington. 18: 438-443.
- 20.- Dubois, J.R. 1968. Laboratory batch production of Bacillus thuringiensis spores and crystals. *Appl. Microbiol.* 16: (7), 1098-1099.
- 21.- Dulmage, H.T. 1970. Production of the Spore  $\delta$ -endotoxin Complex by Variants of Bacillus thuringiensis in two Fermentation Media. *J. Invertebr. Pathol.* 16: 385-389.
- 22.- Dulmage, H.T. 1971. Production of  $\delta$ -endotoxin by Eighteen Isolates of Bacillus thuringiensis. Serotype 3, in 3 Fermentation Media. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 353-358.



- 23.- Dulmage, H.T. 1973. Assay and Standardization of Microbial Insecticides Ann. N. Y. Acad. Sc. 217. 187-199.
- 24.- Dulmage, H.T. 1973. Bacillus thuringiensis U.S. Assay Standard. Report on the Adoption of a Primary U.S. Reference Standard for Assay Formulations Containing the  $\delta$ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. Bull. Entomol. Am. 19 (4), 200-202.
- 25.- Dulmage, H.T. 1975. The Standardization of Formulation of the  $\delta$ -endotoxins Produced by Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 25: 279-281.
- 26.- Dulmage, H.T. 1981. Production of Bacteria for Biological Control of Insects. Published by U.S.D.A., Brownsville, Texas, U.S.A. No. 9.
- 27.- Dulmage, H.T. 1982. Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14. Vandekar, M. and Dulmage, H.T. Eds. UNDP/World Bank/WHO, Geneva.
- 28.- Dulmage, H.T. and Aizawa, K. 1980. Distribution of Bacillus thuringiensis in Nature. Published by U.S.D.A., Brownsville, Texas, U.S.A. No. 4., 209-236.
- 29.- Dulmage, H.T. and De Barjac, H. 1973. HD-187, a new Isolate of Bacillus thuringiensis that Produce High Yields of  $\delta$ -endotoxin. J. Invertebr. Pathol. 22: 273-277.
- 30.- Dulmage, H.T. and Orlin. 1977. A proposed standardized bioassay for formulation of Bacillus thuringiensis based on the international unit. J. Invertebr. Pathol. 18: 240-245.
- 31.- Dulmage, H.T., Boening, D.P., Rehnberg, C.S. and Hunsen, G.D. 1971. A Proposed Standardized Bioassay for Formulations of Bacillus thuringiensis Based on the International Unit. J. of Invertebr. Pathol. 18: 240-245.
- 32.- Dulmage, H.T., Correa, J.A. and Martinez A.J. 1970. Coprecipitation with lactose as a Means of recovering the Spore-Cristal Complex of Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 15: 15-20.
- 33.- Dulmage, H.T., Martinez, A.J. and Peffa, J. 1976. Bioassay of Bacillus thuringiensis (Berliner)  $\delta$ -endotoxin Using the Tobacco Budworm. Technical Bulletin Núm. 1528. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture in Cooperation with Texas Agricultural Experimental Station. 1-15.

- 34.- Faust, R.M. and Bulla, L.A. 1982. Bacterial and Their Toxins as Insecticides Microbial and Viral Pesticides. Ed. Edward Kurstak. Marcel Dekker. Inc. New York and Basel. 3: 75-206.
- 35.- Feren, C.J. and Brown, D.E. 1969. The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis. Biotech. and Bioeng. 11: 583.
- 36.- Fuchs, R.P. and Humphrey, A.E. 1971. Effect of surface aeration on Scale-Up Procedures for Fermentation Processes. Ind. and Eng. Chem. Des. Dev. 10: 190.
- 37.- Gabriel, C.J. and Cook, R.J. 1990. Biological Control the need for new scientific framework. Biofeedback Bioscience. Vol. 40 No. 3.
- 38.- Galán, W.L.J., Palacios, C.L.L., Arévalo, N.K., Morales, R.L.H., Medrano, R.H., Rodríguez, P.C. y Sandoval, C.C.F. 1990. Biosistemática y Biotecnología de B. thuringiensis. XIII Reunión Nacional de Control Biológico, Colima Colima, México.
- 39.- Galán, W.L.J., Rodríguez, P.C. and Medrano, R.H. 1989. Biotechnology of Bacillus thuringiensis for the control of insects of agricultural in México Eds. North American Plant Protection Organization in International Symposium on Biological Control Implementation, Proceedings and Abstracts. Mc Allen, Texas. Bulletin No 6: 145.
- 40.- Galowalia, M.M.S., Gibson, N.H.E. and Wolf, J. 1973. Comparative Potencies of the Crystalline Endotoxin of Eight Varieties of Bacillus thuringiensis to larvae of Pieris brassicae. J. Invertebr. Pathol. 21: (3), 301-308.
- 41.- Goldberg, I., Sneh, B., Battat, E. and Klein, D. 1980. Optimization of a Medium for a High Yield Production of Spore-Crystal Preparation of Bacillus thuringiensis. Effective Against the Egyptian Cotton Leaf Worm Spodoptera litoralis Bois. Biotechnol. Letters 2: (10), 419-426.
- 42.- Gómez, T.M. 1969. La delta-endotoxina de Bacillus thuringiensis GM-2. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L., México. (Tesis de Maestría Inédita).
- 43.- Hannay, C.L. 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore Forming Bacteria. Nature. 127: 1004.

- 44.- Harrison, D.E.F. 1972. Physiological effects of dissolved oxygen tension and redox potential on growing populations of microorganisms. *J. Appl. Chem. Biotech.* 22: 417.
- 45.- Harrison, D.E.F. and Gates, L.E. 1969. Responses of bacteria to dissolved oxygen tension. *Fermentation Advances* (Perlman, Ed.): 117.
- 46.- Heimpel, A.M. and Angus, T.A. 1959. The Site of Action of Crystalliferous Bacteria in Lepidoptera Larvae. *J. Insec. Pathol.* 1: 152-170.
- 47.- Heimpel, A.M. and Angus, T.A. 1963. Diseases Caused by Creating Spore-Forming Bacteria, In: Steinhaus E.A. (ed.) *Insect Pathology, and Advances Treatise*, New York, Vol 2 pp. 21-73.
- 48.- Hofte, H. and Whitley, H.R. 1989. Insecticidal crystal protein of Bacillus thuringiensis. *Microbial. Rev.* 53: 242-255.
- 49.- Ionoffo, C.M. 1963. A Successful Technique of Mass-Rearing Cabbage Loopers on a Smisynthetic Diet. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 56: 174-182.
- 50.- Jensen, A.L. and Oldshue J.Y. 1966. Scale-Up of antibiotic fermentations by control of oxygen utilization. *Biotech. and Bioeng.* 8: 525.
- 51.- Kempner, W. 1937. Effect of oxygen tension on cellular metabolism. *J. Cell. Comp. Physiol.* 10: 339.
- 52.- Lowden, M.J., Held, G.A. and Bulla, L.A. 1983. Toxicity of Bacillus thuringiensis subsp. isralensis to Adult. Aedes aegypty Mosquitoes. *App. Environ. Microbiol.* 46: (2). 312-315.
- 53.- Longmuir, I.S. 1954. Respiration rate of bacteria as a function of oxygen concentration. *J. Biochem.* 57: 81.
- 54.- Lüthy, P. 1980. Insecticidal toxins of Bacillus thuringiensis. *Federation of European Microbiological Societies. (FEEMS) Microbiol. Lett.* 8: 1-7.
- 55.- Lüthy, P. and Ebersold, H.R. 1981. The Entomocidal Toxins of Bacillus thuringiensis. *Pharmac Ther Pergamon Press.* Great Britain. 13: 257-283.
- 56.- Lüthy, P., Cordier, J.L. and Fisher, H.M. 19 . Bacillus thuringiensis. As a Bacterial Insecticide: Basic Considerations and Application. *Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.*

- 57.- Maldonado, B.M.G. 1981. Producción de Bioinsecticida de Bacillus thuringiensis GM-1 Utilizando tres Diferentes Medios de Cultivo. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, Nuevo León, México. (tesis inédita).
- 58.- Medrano, R.H., Casillas, A.C.L., Solís, S.A., Pérez, O.C. 1987. Producción de bioinsecticidas por tres cepas autóctonas de Bacillus thuringiensis y su uso contra insectos plaga del maíz. Res. XVIII Congr. Nal. de Microbiol. Acapulco, Gro.: 92.
- 59.- Medrano, R.H. 1987. Producción de bioinsecticidas por cepas autóctonas de Bacillus thuringiensis. I.- Perspectivas de aplicación a corto plazo. Res. II Congr. Nal. de Biotechnol y Bioing. Durango, Dgo. : 60.
- 60.- Medrano, R.H., Solís, S.A., Casillas, A.C.L., García, G.C., Granados, C.U.H., Rodríguez, P.C. and Galán, W.L.J. 1987. Production of bioinsecticides by Bacillus thuringiensis HD-1 at pilot plant level and its use on insect pest maize. 4th European Congress on Biotechnology. June 14-19, Amsterdam, The Netherlands.
- 61.- Medrano, R.H., Solís, S.A., Casillas, A.C.L., García, G.C., Granados, C.U.H., Rodríguez, P.C. y Galán, W.L.J. 1988. Aspectos tecnológicos en la propagaación de Bacillus thuringiensis para la producción de bioinsecticidas. res. XIX Congreso Nal. de Microbiología. Monterrey, N.L.: 75.
- 62.- Medrano, R.H., Solís, S.A., Perez, O.C., Hayakawa, M.A., Lerma, R.S., Cordova, G.V., García, G.C. and Galan, W.L.J. 1989. Some bioengineering aspects of bioinsecticides production and its application against insect pest maize at experimental field level. Res. Fifth Inter. Congr. on Engineering and Food. Cologne, Federal Rep. of Germany.: 141.
- 63.- Medrano, R.H., Solís, S.A., Casillas, A.C.L., García, G.C., Granados, C.U.H., Rodríguez, P.C. y Galan, W.L.J. 1989. Efecto de las condiciones y tipo de secado sobre las características toxicológicas de bioinsecticidas. Res. III Congr. Nal. de Biotechnol. y Bioing. Monterrey, N.L.
- 64.- Metcalf, C.L. 1962. Insectos Destructivos e Insectos Utiles. 4ta. Ed. CECOSA., México.
- 65.- Moraes, O. and Chaib, M.A. 1978. Bioassay for Microbial Insecticide. Process Biochemistry., 23-24.
- 66.- Murga, G.M.A. 1983. Toxicidad de Bacillus thuringiensis GM-2 en diferentes medios de cultivo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León, México. (Tesis Inédita).

- 67.- Nakamura, L.K. and Dulmage, H.T. 1988. Bacillus thuringiensis cultures available from the U.S. Department of Agriculture, U.S.D.A.. Technical Bulletin No. 1738., 1-38.
- 68.- Norris, J.R. 1987. Microbial Control of Pest Insects. In Alan T. Bull and Pauline M. Meadow (Eds.) Companion to Microbiology Longman. pp. 459-479.
- 69.- Ohba, M. and Aizawa, K. 1989. New Flagellar (H) Antigenic Subfactors in Bacillus thuringiensis H Serotype 3 with description of two New Subspecies, Bacillus thuringiensis subsp. sumiyoshiensis (H serotype 3a:3d) and Bacillus thuringiensis fukuokaensis (H serotype 3a:3d:3e). J. Invertebr. Pathol. 54: 208-212.
- 70.- Pendleton, I.R. 1969. Insecticides of Crystal Forming Bacteria. Process Biochemistry. pp. 29-32.
- 71.- Phillips, D.H. and Elrod, H. 1961. Aeration in fermentations. J. Biochem. and Microbiol. Tech. and Eng. 3, 3: 277.
- 72.- Prasad, S.S.S.V. and Shethna, Y.I. 1976. Biochemistry and Biological Activities of the Proteinaceous Crystal of Bacillus thuringiensis. Journal of Scientific Ind. res. 35: 626-632.
- 73.- Richards, J.W. 1961. Studies in aeration and agitation. Progr. in Ind. Microbiol. 3: 141-155.
- 74.- Rodríguez, P.C., Galán W.L.J., De Barjac, H., Roman, C.E., Tamez G.R.S. y Dulmage, H.T. 1990. Bacillus thuringiensis subsp. neolonensis serotype H-24; a New subspecies with produce triangular crystal. J. Invertebr. Pathol. 56: 280-282.
- 75.- Salama, H.S., Foda, M.S., Dulmage, H.T. and El Sharaby, A. 1983 Novel Fermentation Media for Production of  $\delta$ -endotoxins from Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 41: 8-19.
- 76.- Sanchez, N.A. 1985. Propagación y toxicidad de Bacillus thuringiensis (GM-1 a la GM-19) en un medio a base de Melazas contra Spodoptera frugiperda y Heliothis virescens. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey N.L. México. (tesis inédita).
- 77.- Scherrer, P., Lüthy, P. and Trumpf, B. 1973. Production of  $\delta$ -endotoxin by Bacillus thuringiensis. As a Function of Glucose Concentrations. App. Microbiol. 25: (4), 644-646.

- 78.- Schesser, J.H. 1977. Bioassay for Homogeneous Parasporal Crystal of Bacillus thuringiensis Using the Tobacco Homworm. Manduca sexta. App. Environ. Microbiol. 33: 878-880.
- 79.- Shieh, T.R., Bannekborn and Rogoff, H.M. 1973. 3,758,383 Production of Exotoxin of Bacillus thuringiensis. United States Patent Office.
- 80.- Sifuentes, J.A. 1978. Plagas del Maiz de México, algunas consideraciones sobre su control. Folleto de Divulgación No. 58. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas en México.
- 81.- Sifuentes, J.A. 1978b. Plagas del Algodonero en México. Folleto de Divulgación No. 67. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México.
- 82.- 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.
- 83.- Stanbury, P.F. and Witaker, A. 1984. Media for Industrial Fermentations. Chapter 4. in Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press., England, New York. 74-90.
- 84.- Summer, J.B. 1924. Method 3, 5 DNS Acid. Journal of Biology Chemistry 62: 287.
- 85.- Sutter, G.R. and Raun E.S. 1967. Histopathology of European-Corn Borer Larvae Treated with Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 9: 90-103.
- 86.- Tojo, A. and Aizawa, K. 1983. Dissolution and Degradation of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin by Gut Juice Protease of the Silkworm Bombix mori. App. Environ. Microbiol. 45: (2), 576-580.
- 87.- Valenzuela, L.E. 1987. Microorganismos Entomopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- 88.- Wang, D.I.C. 1968. Developments in agitation and aeration of fermentation systems. Progress in Ind. Microbiol. 8: 1-12.
- 89.- Wang, D.I.C.; Cooney, C.L.; Demian, A.L.; Dunnill; Humphery, A.E. and Lilly, M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, New York. 374.
- 90.- Yano, T. and Nagata, Y.M. 1961. Fundamentals studies on the aerobic fermentation VIII.- Oxygen transfer within a mold pellet. Agr. Biol. Chem. 25: 580.

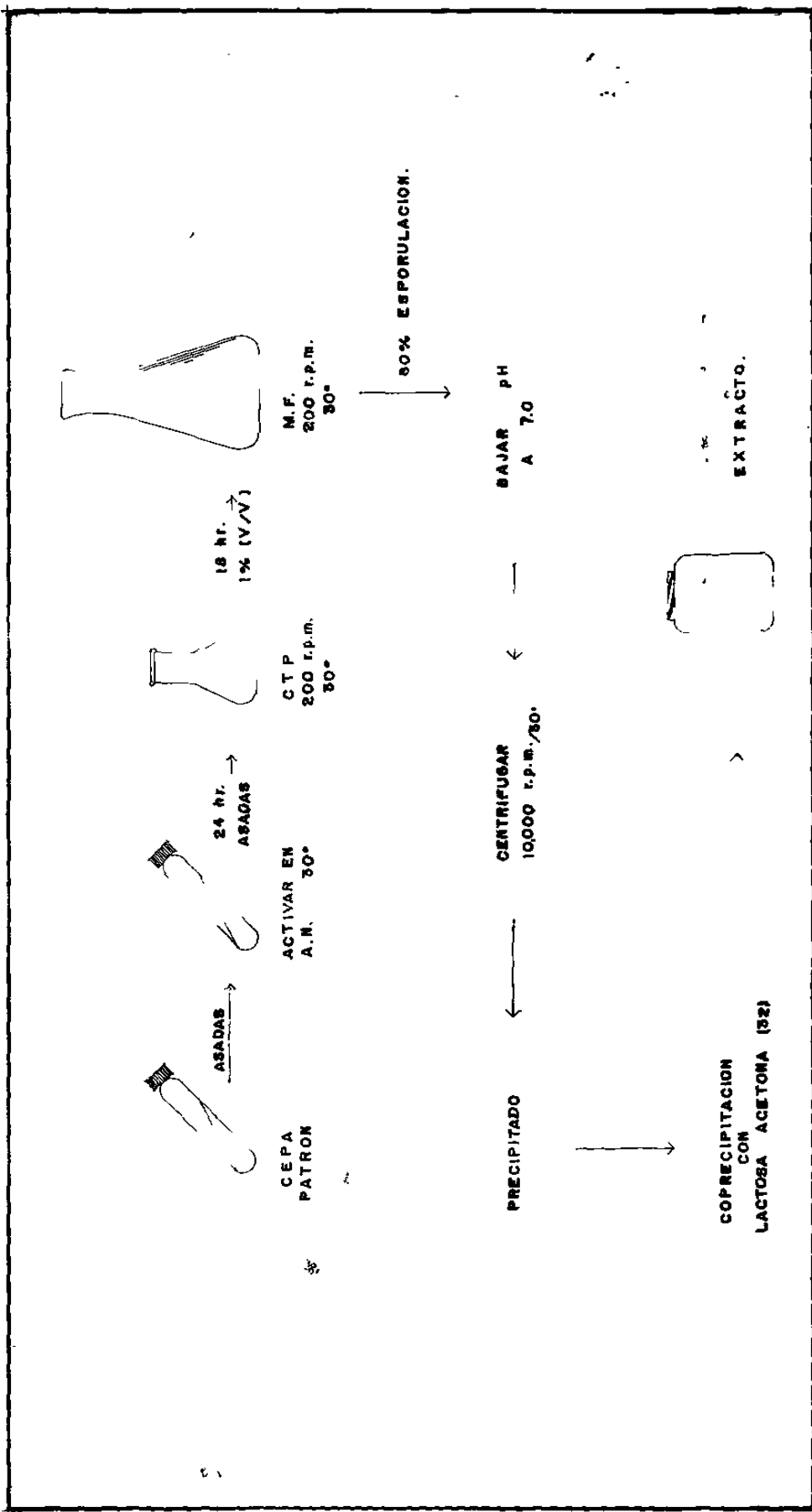


FIG. 1 CINETICA DE FERMENTACION  
 ( NIVEL DE LABORATORIO )

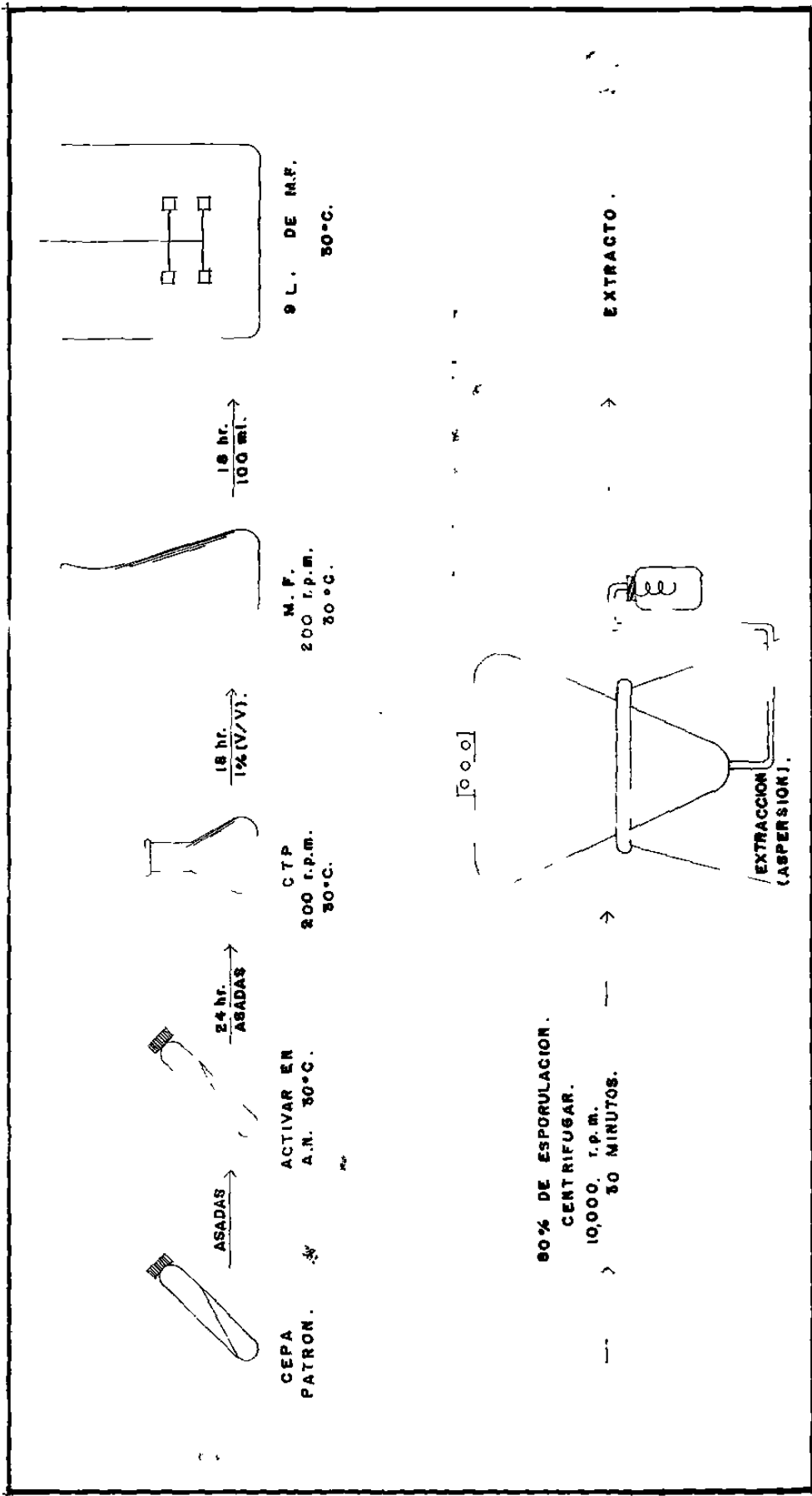


FIG. 2 CINETICA DE FERMENTACION ( PLANTA ).



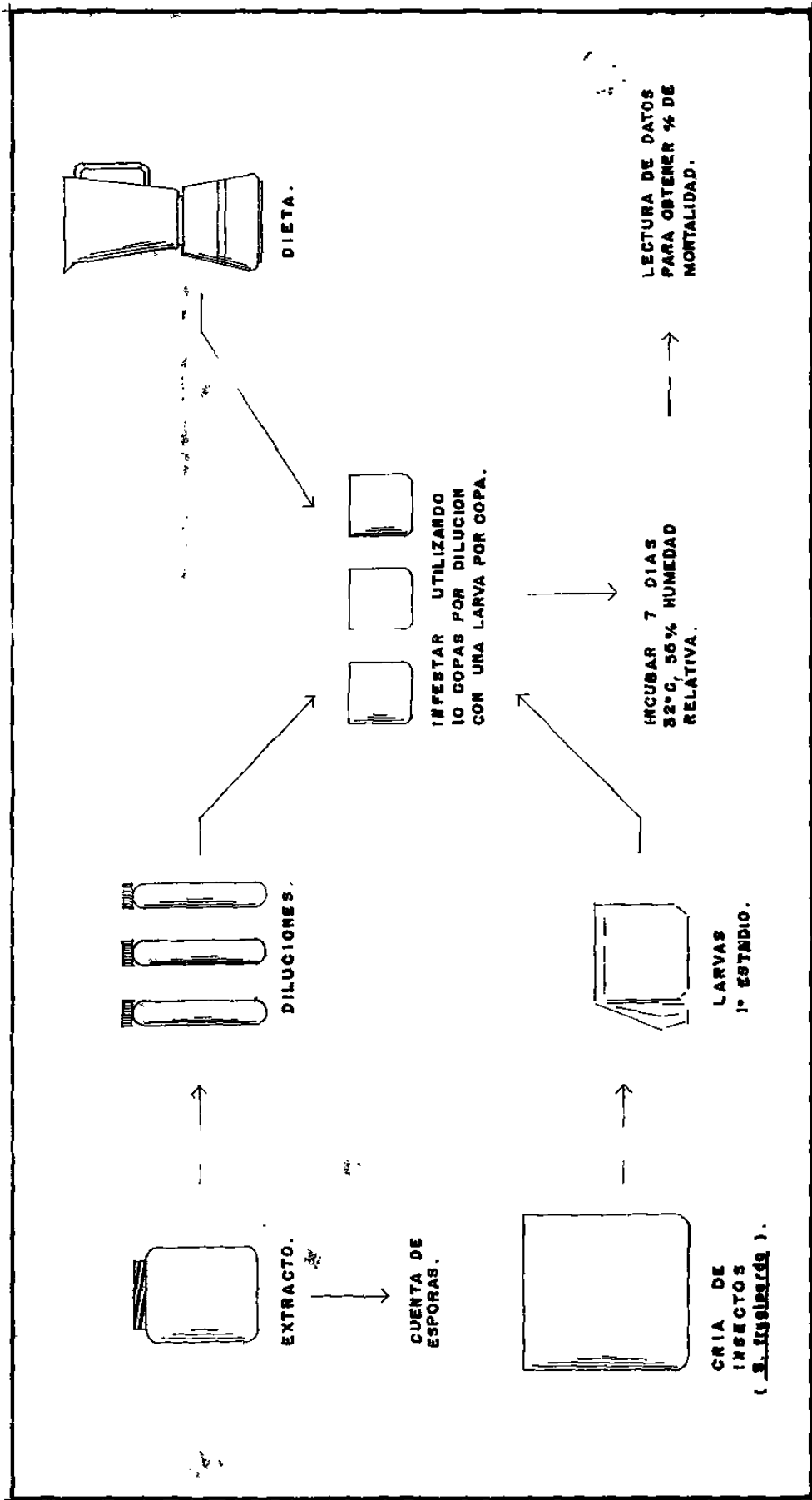


FIG. 3 BIOENSAYO CONTRA *Spodoptera frugiperda*.

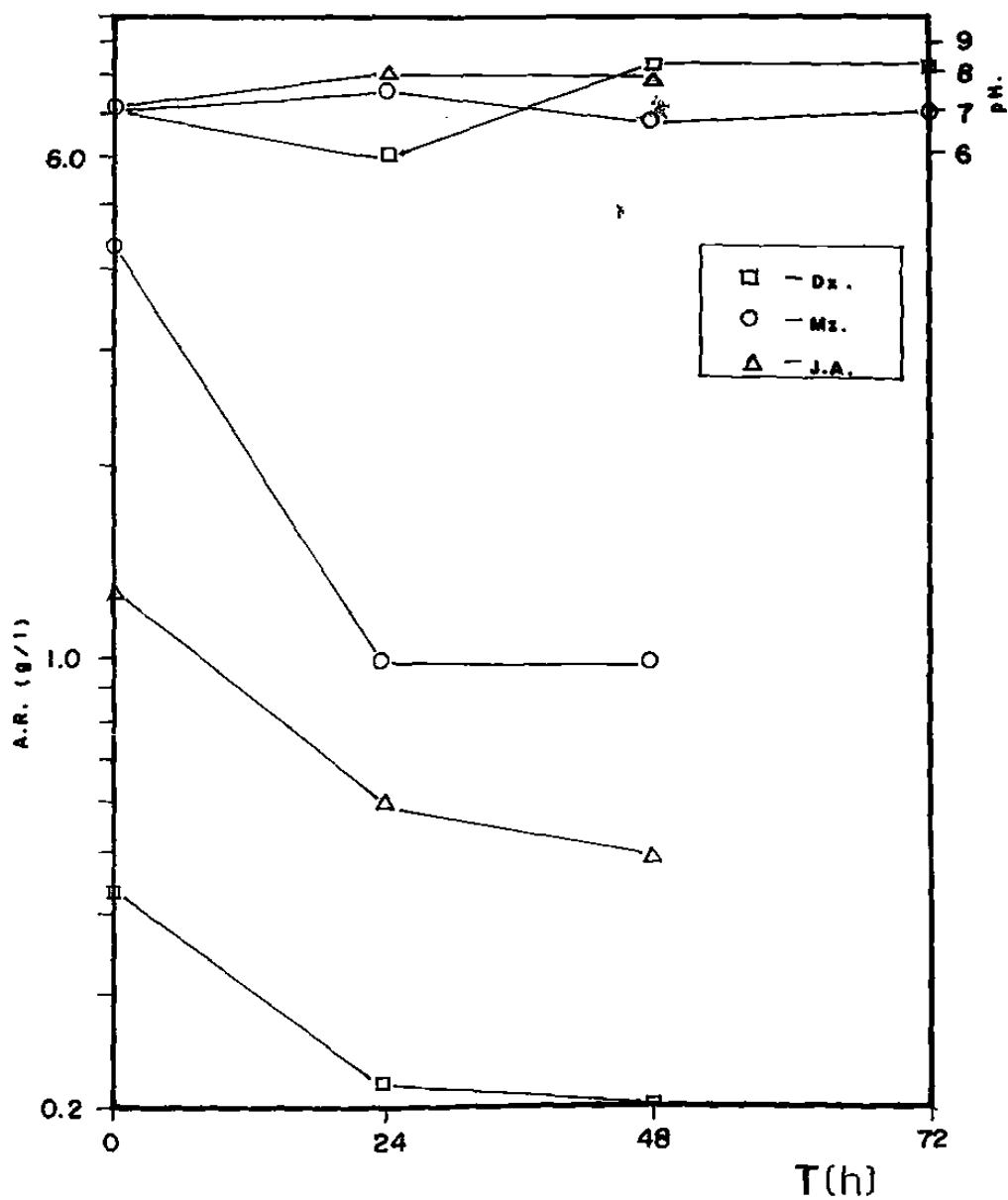


Fig. 4 Comportamiento del pH y Consumo de Azúcar Reductor (A.R. - - g/l) durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. -- *aizawai* cepa GM-7 en tres diferentes medio de cultivo a nivel de matraz. (O: Mz: Melaza, □: Dx: Dextrosa, Δ: J.A.: Jugo de Agave).

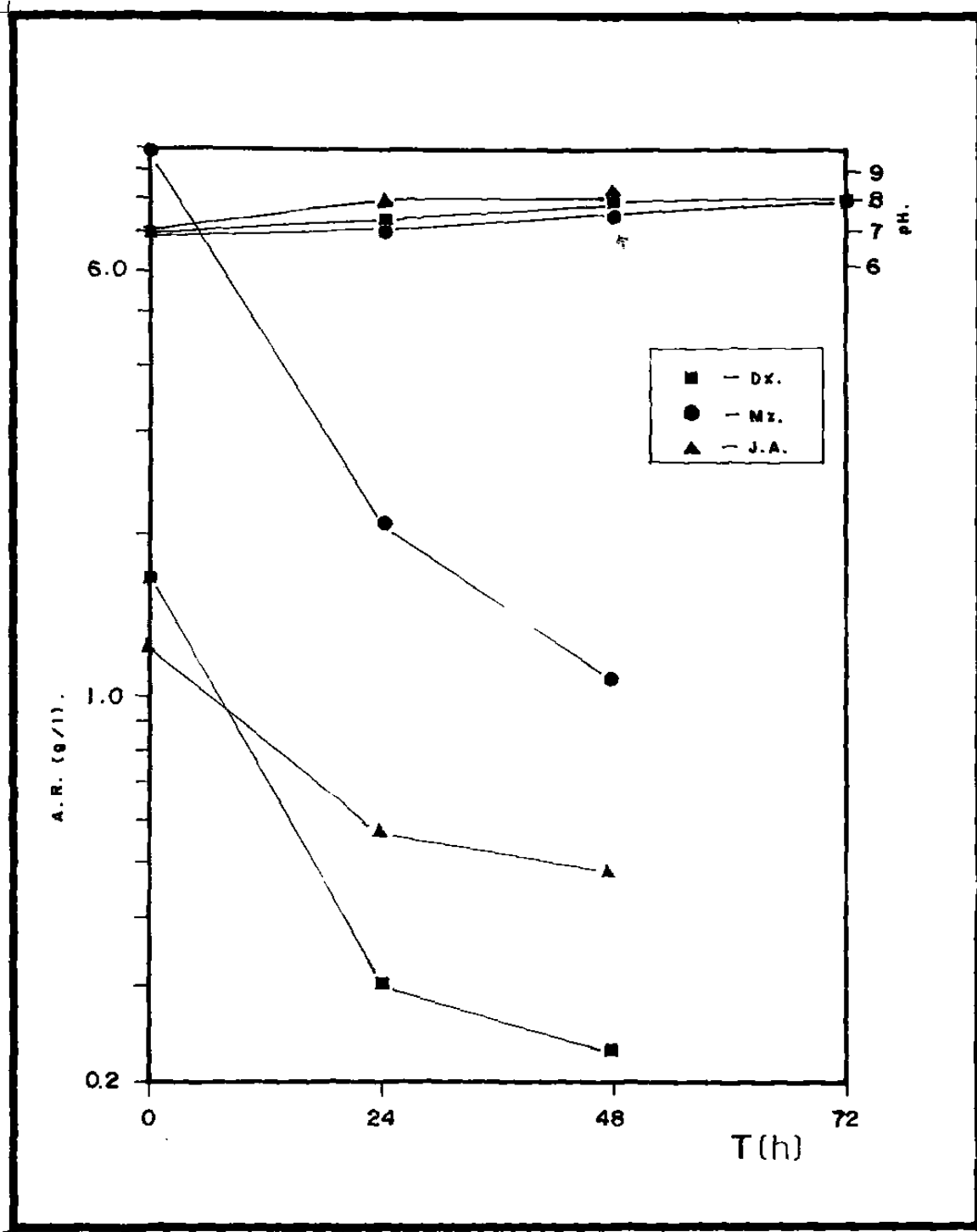


Fig. 5 Comportamiento del pH y Consumo de Azúcar Reductor (A.R. g/l) - durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* - cepa GM-10 en tres diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio. ( ● : Mz: Melaza, ■ : Dx: Dextrosa, ▲ : J.A.: Jugo de Agave).

1020091315

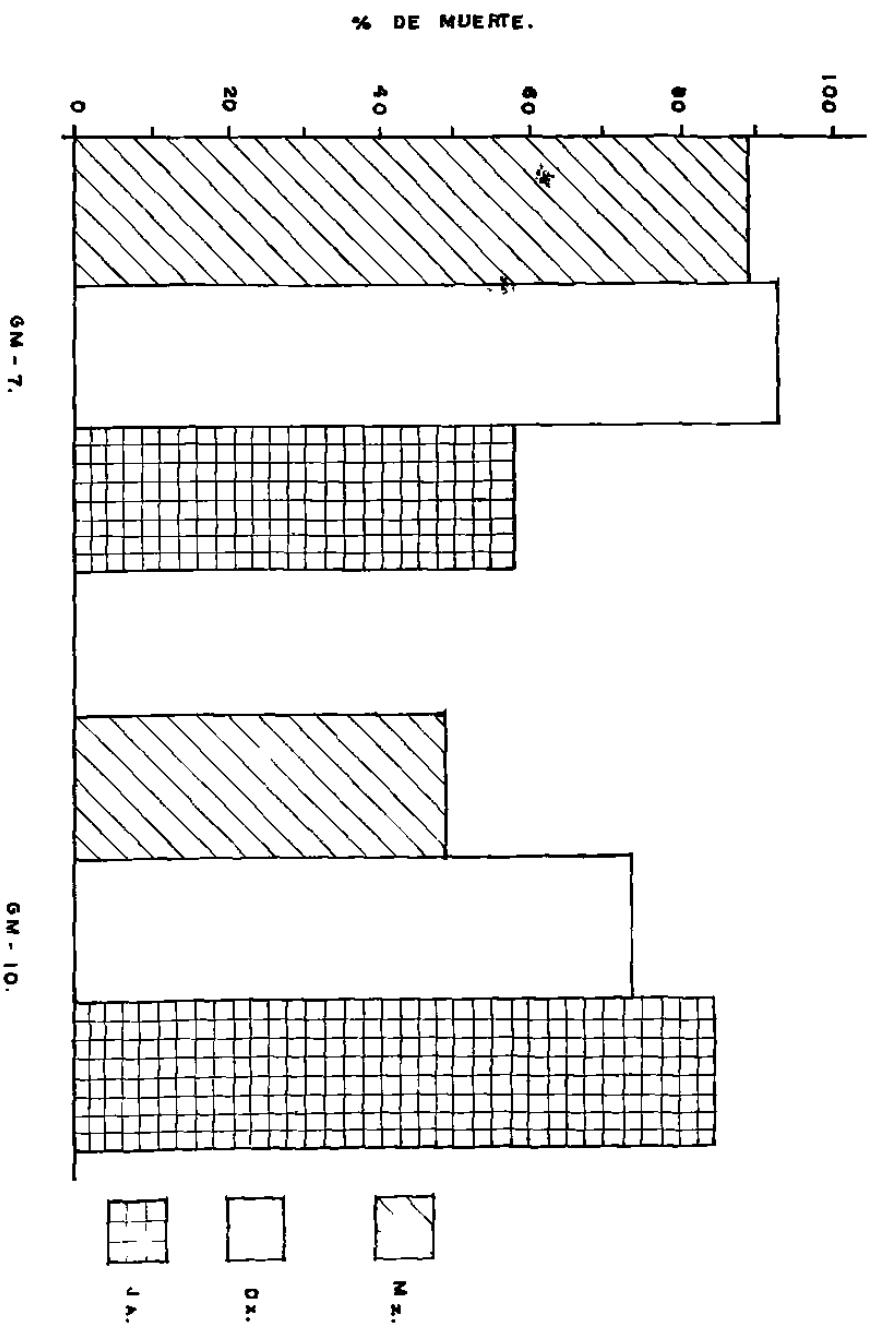


Fig. 6 Mortalidad obtenida a partir de extractos de B. thuringiensis var.  aizawai cepas GM-7 y GM-10 propagadas en tres diferentes medios de cultivo, propagadas contra larvas neonatas del 1er. estadio de Spodoptera frugiperda a 500 µg/ml. de extracto y expresado en % de muerte (Mz: Melaza. Ox: Pectrosa. J.A.: Jugo de Agave).

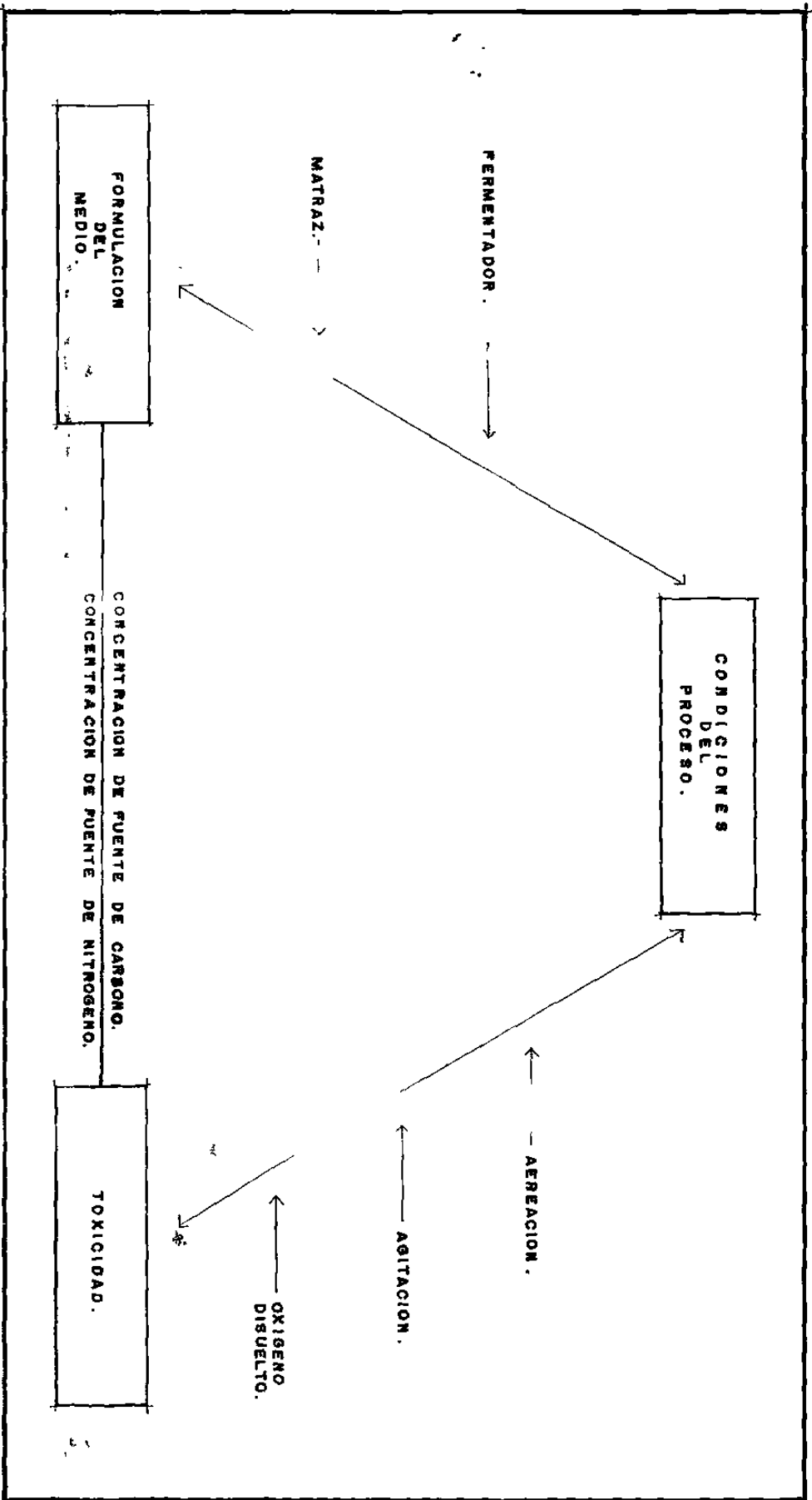


Fig. 7 Relación entre formulación del medio, condiciones de proceso y toxicidad de los bioinsecticidas producidos por B. thuringiensis.

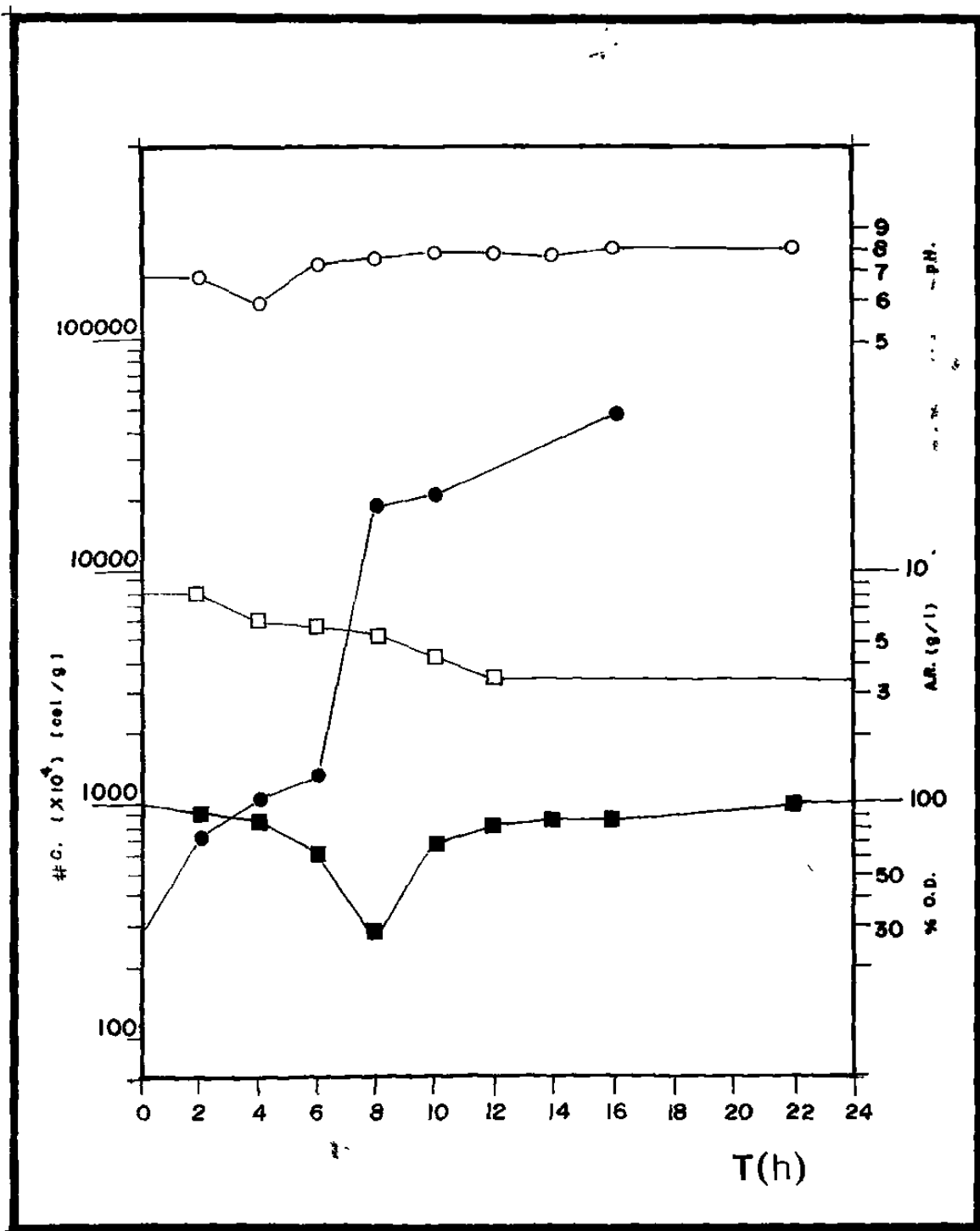


Fig. 8 Cinética de fermentación de *B. thuringiensis* var. *aizawai* cepa - GM-7 a nivel semipiloto en fermentadores de 14 l en medio melaza (Mz). pH (○). #C. (cel/g) número de células (●). A.R. (g/l) Azúcar Reductor (□) y % O. D., porcentaje de Oxígeno Disuelto (■).  
 Condiciones de operación (ver tabla 3).

Tabla 1. Distribución del contenido de tres diferentes medios de cultivo para la producción del complejo espora  $\delta$  endotoxina de Bacillus thuringiensis var. aizawai cepas GM-7 y GM-10

	Clave del Medio *		
	Mz	Dx	JA
Fuente de Carbono	20	1.5	15
HS	20	20	20
	1		10
CaCO <sub>3</sub>	1	1	1

\* Expresado en (g/l)

Mz = Melaza (45% de A.R.)

Dx = Dextrosa (73% de A.R.)

JA = Jugo de Agave (85% de A.R.)

pH = 7.0 - 7.2

HS = Harina de Soya

LAM = Líquido de remojo de maíz

CaCO<sub>3</sub> = Carbonato de Calcio

Tabla 1a.- ANALISIS PARCIAL DEL LIQUIDO DE REMOJO DE MAIZ

---



---

Solidos totales	51.0 % p/v
Ac. Láctico	15.0 % p/v
Azúcar Reductor	5.6 % p/v
Azúcar Reductor desp. de Hidrolisis	6.8 % p/v
Nitrógeno Total	4.0 % p/v
Aminoácidos como % de Nitrógeno	
Alanina	25
Arginina	8
Ac. Gluámico	8
Leucina	6
Prolina	5
Isoleucina	3.5
Threonina	3.5
Valina	3.5
Fenilalanina	2.0
Metionina	1.0
Cistina	1.0
Ceniza	1.25 % p/v
Potasio	20.0 %
Fósforo	1-5 %
Sodio	0.3-1 %
Magnecio	0.003-0.3 %
Hierro	0.01-0.3 %
Cobre }	
Calcio }	0.01-0.03 %
Zinc	0.003-0.08 %
Plomo }	
Plata }	
Cromo }	0.001-0.003 %
Vitaminas B	
Aneurina	41-49 µg g <sup>-1</sup>
Biotina	0.34-0.38 µg g <sup>-1</sup>
Pantotenato de Calcio	14.5-21.5 µg g <sup>-1</sup>
Ac. Fólico	0.26-0.6 µg g <sup>-1</sup>
Nicotinamida	30-40 µg g <sup>-1</sup>
Riboflavina	3.9-4.7 µg g <sup>-1</sup>

También Niacina y Primidina

---

ref. Stanbury y Whitaker. (83)



Tabla 1b.- COMPOSICION DE LA DIETA SHOREI MODIFICADA.

---

Harina de Sova	80.0	g/l
Gérmen de Trigo	36.0	g/l
Sal Wesson	12.0	g/l
Sacarosa	13.0	g/l
Ac. Sorbico	1.0	g/l
Metil-p-Hidroxibenzoato	2.2	g/l
Ac. Ascórbico	4.8	g/l
Acar Acar	15.0	ml/l
Cloruro de Colina (15%)	6.6	ml/l
Formaldehido (10%)	5.0	ml/l
Ac. Acético (25%)	13.3	ml/l
Solución Vitaminica *	4.0	ml/l
Aqua Destilada	1000.0	ml

Solución Vitaminica \*

Pantotenato de Calcio	12	g/l
Niacinamida	3	g/l
Riboflavina	3	g/l
Ac. Fólico	3	g/l
Tiamina (HCl)	1.5g/l	
Piridoxina (HCl)	1.5g/l	
Biotina	0.12ml	
Vitamina B-12	25	ml
Volumen Aforado a	1000.0	ml

---

ref. Ianofo. (49)

Tabla 2 Relación entre producción de B. thuringiensis. var. aizawai cepas GM-7 y GM-10, a nivel de matraz en tres diferentes medios de cultivo y mortalidad (%) contra el gusano cogollero del maíz, Spodoptera frugiperda.

	Clave del Medio					
	Mz		Dx		JA	
Cepas	GM-7	GM-10	GM-7	GM-10	GM-7	GM-10
# C* (cel/ml)	98 x 10 <sup>6</sup>	35 x 10 <sup>6</sup>	29 x 10 <sup>6</sup>	67 x 10 <sup>5</sup>	44 x 10 <sup>6</sup>	20 x 10 <sup>7</sup>
# E (esp/g)	12 x 10 <sup>9</sup>	25 x 10 <sup>9</sup>	56 x 10 <sup>10</sup>	22 x 10 <sup>9</sup>	26 x 10 <sup>9</sup>	28 x 10 <sup>9</sup>
Producción (g l)	17	14	7	13	12	11
Mortalidad (%) (500 µg/ml)	89	49	93	73	59	84

\* Preinoculo

CONDICIONES DE OPERACION:

Volumen de Operación 100 ml  
 Agitación 250 rpm  
 Temperatura 30°C  
 pH Inicial 7.0-7.2  
 pH Final 8.0-8.5  
 Inoculo 1% (v/v)  
 Tiempo de Operación 48-72 hrs

Tabla 3 Producción de B. thuringiensis var. aizawai cepa - GM-7 en un fermentador de 14 l en el medio de cultivo a base de melaza (Mz) y mortalidad (%) contra el gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda)

Clave del Medio	Mz
Cepa	GM-7
# C* (cel/ml)	20 x 10 <sup>7</sup>
# E (esp/g)	25 x 10 <sup>9</sup>
Producción (g)	19
Mortalidad (%) (500 µg/ml)	100

\* Inoculo en MF

CONDICIONES DE OPERACION:

Volumen de Operacion	9 lt
Aereación	1 VVM
Agitación	700 rpm
Temperatura	30°C
pH Inicial	7.0-7.2
pH Final	8.0-8.5
Inoculo	1% (v/v)
Edad del Inoculo	18 hrs
Tiempo de Operacion	30 hrs

Tabla 4 Efecto de la velocidad de agitación sobre la cinética microbiana de B. thuringiensis var. aizawai cepa G4-7 en un fermentador de 14 l.

	Agitación (rpm)						
	200	300	400	500	600	700	800
X (g cel/l)	0.848	0.848	0.848	0.880	0.880	0.943	0.943
Y <sub>x/s</sub> (g cel/g s)	0.187	0.187	0.187	0.199	0.199	0.208	0.208
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.090	0.090	0.112	0.112	0.135	0.135	0.135
Na (g D <sub>2</sub> /l x h)	0.109	0.113	0.121	0.131	0.131	0.141	0.141
G <sub>0</sub>	0.128	0.133	0.142	0.148	0.148	0.150	0.160
K <sub>la</sub> (Hr <sup>-1</sup> )	84	87	93	100	100	108	108
(Hp/1000 l)	0.015	0.015	0.016	0.017	0.019	0.019	0.019

CONDICIONES DE OPERACION:

Volumen de Operación 9 lt.  
Aereación 1 VVM  
Temperatura 30°C  
pH Inicial 7.0-7.2  
pH Final 8.0-8.5  
Inóculo 1% (v/v)  
tiempo de Inóculo 18 hrs

**Tabla 5 Efecto de la velocidad de agitación sobre la propagación y esporulación de *B. thuringiensis* var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l.**

	Agitación (rpm)						
	200	300	400	500	600	700	
X (g cel/l)	0.848	0.848	0.848	0.980	0.880	0.943	0
Na (g O <sub>2</sub> /lxh)	0.109	0.113	0.121	0.131	0.131	0.141	0
T <sub>h</sub>	12	12	12	10	8	8	
T <sub>p</sub> (h)	40	40	38	38	34	30	
# E (esp/g)	19 x 10 <sup>8</sup>	20 x 10 <sup>8</sup>	22 x 10 <sup>8</sup>	23 x 10 <sup>8</sup>	23 x 10 <sup>8</sup>	25 x 10 <sup>8</sup>	25 x 10 <sup>8</sup>

**CONDICIONES DE OPERACION:**

Volumen de Operación 9 lt  
Aereación 1 VVM  
Temperatura 30°C  
pH Inicial 7.0-7.2  
pH Final 8.0-8.5  
Inóculo 1% (v/v)  
Tiempo de incubación 1 hrs  
Tiempo de esporulación e  
Tiempo de Proceso T<sub>p</sub>

**Tabla 6 Efecto de la aereación sobre la cinética microbiana de B. thuringiensis var. aizawai cepa GM-7 en un fermentador de 14 l.**

	Aereación (VVM)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
X (g cel/l)	0.652	0.943	0.890	1.01
Y <sub>x/s</sub>	0.145	0.208	0.220	0.225
μ (Hr <sup>-1</sup> )	0.118	0.135	0.141	0.143
N <sub>m</sub> (gO <sub>2</sub> /l x h)	0.085	0.141	0.153	0.158
Q <sub>o<sub>2</sub></sub> (gO <sub>2</sub> /gcelxh)	0.130	0.150	0.154	0.158
K <sub>la</sub> (Hr <sup>-1</sup> )	85	108	118	121
1 1	0.021	.019	0.016	0.014

**CONDICIONES DE OPERACION:**

Volumen de Operación 9 lt  
 Agitación 700 rpm  
 Temperatura 30°C  
 pH Inicial 7.0-7.2  
 pH Final 8.0-8.5  
 Inóculo 1% (v/v)  
 Edad del Inóculo 18 hrs

Tabla 7 Efecto de la aereación sobre la propagación y esporulación de B. thuringiensis var. aizawai cepa G-7 en un fermentador de 14 l.

	Aereación (VVM)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
X (g cel/l)	0.652	0.943	0.990	1.01
Na	0.085	0.141	0.153	0.158
Te (h)	10	8	8	8
Tp (h)	36	30	32	32
# E (esp/g)	$17 \times 10^9$	$25 \times 10^9$	$26 \times 10^9$	$97 \times 10^9$

CONDICIONES DE OPERACION:

Volumen de Operación 9 lt  
 Agitación 700 rpm  
 Temperatura 30°C  
 H Inicial 7.0-7.2  
 t na: 8.  
 Inoculo 1% (v/v)  
 Edad del Inoculo 18 hrs  
 Tiempo de Esporulación Te  
 Tiempo de Proceso Tp

## ESTADISTICA

Analisis de Regresión de la variable Agitación en función de  $Yx/s$  ( g cel/ a s ).

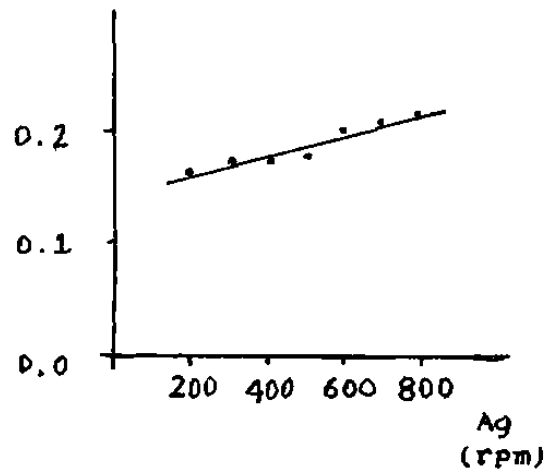
$$v = 0.176 + 0.00004 \text{ Agitación}$$

$$R^2 = 0.99$$

$$r = 0.99$$

$$EE = 6.25 \times 10^{-5}$$

Ag	Y calculada Yx/s
200	0.184
300	0.188
400	0.192
500	0.196
600	0.200
700	0.204
800	0.208



El dominio de la función fué más pequeño de lo que se esperaba, ya que nos muestra una gráfica de tipo lineal, posiblemente a valores mayores se encuentre curvatura que pueda darnos el óptimo para agitación. Es importante señalar que ésta función es muy confiable ya que los valores de  $R^2$  y  $r$  son de 0.99 y altamente significativos. Por otra parte el EE es despreciable ( $6.25 \times 10^{-5}$ ).

Analisis de Regresión de la Variable Aereación en función del  $Yx/s$  ( g cel/ a s ).

$$v = 0.06149 + 0.20420 \text{ Aereación} - 0.062 \text{ Aer.}^2$$

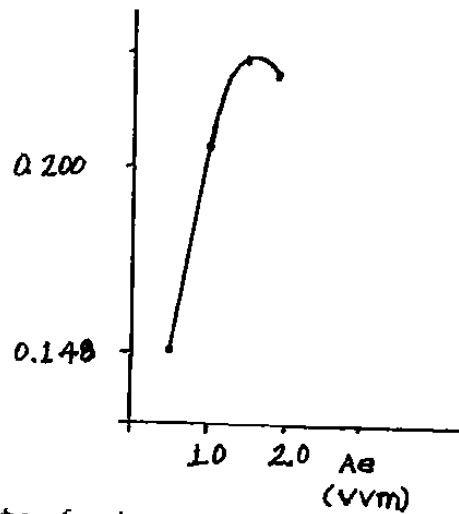
$$R^2 = 0.99$$

$$r = 0.99$$

$$EE = 4.105 \times 10^{-4}$$



Ae	Y calculada Yx/s
0.5	0.148
1.0	0.204
1.5	0.228
2.0	0.222



El dominio de la función fué satisfactorio ya que se observa una gráfica de tipo cuadrática y la curvatura puede darnos el valor óptimo para aereación (Ae). En este caso la función por ser cuadrática y con valores de  $R^2$  y  $r = 0.99$  muestra también ser confiable y predice el comportamiento que tiene el rendimiento (Yx/s) a causa de la aereación. El valor encontrado para el EE es de  $4.105 \times 10^{-4}$  el cual se considera despreciable.

#### Análisis de Regresión Múltiple

VARIABLES	Variable Dependiente
Aereación Agitación Agitación <sup>2</sup>	Yx/s.

#### Valores

	Yx/s (calculado)
1	0.184
2	0.188
3	0.192
4	0.196
5	0.200
6	0.204
7	0.208
8	0.148
9	0.204
10	0.228
11	0.222

Variable	Coefficiente de Regresión
Ae	$2.0472 \times 10^{-1}$
Aq	$3.8892 \times 10^{-5}$
Aq <sup>2</sup>	$-6.2051 \times 10^{-2}$

Error Estandar de Estimación = 0.005

R<sup>2</sup> = 0.964

Rmúltiple = 0.982

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada
modelo	3	0.005	0.002	62.218**
residual	7	0.000	0.0001	
total	10	0.005		

#### Suma de Cuadrados Secuenciales

Fuente	Probabilidad > F
Ae	0.00001
Aq	0.04275
Aq <sup>2</sup>	0.00013

Prueba de Durbin-Watson = 2.98

Con los parámetros empleados para éste trabajo, el Análisis de Regresión Múltiple nos muestra que la variable Aereación (Ae) es la que principalmente influye en nuestros resultados ya que el valor de la F para ésta variable fué altamente significativo al  $P > 0.01$  en tanto que la Agitación (Aq) fué significativo a  $P > 0.05$ . Es evidente que el valor explorado de la Agitación (Aq) por ser pequeño influye notablemente en los resultados encontrados por lo que en estudios posteriores será necesario aumentarlo para describir la curvatura y de ésta manera encontrar la función de respuesta que prediga el comportamiento de ambas variables estudiadas y el rendimiento potencial que se pueda obtener de ellas.

