

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



SELECCION Y EVALUACION DE CEPAS NATIVAS DE
Bacillus thuringiensis CONTRA Heliothis zea (Boddie)
y Spodoptera exigua (Hübner).

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

GUILLERMO JOSE GUTIERREZ CASTILLO

MONTERREY, N. L.,

MARZO DE 1993

TM

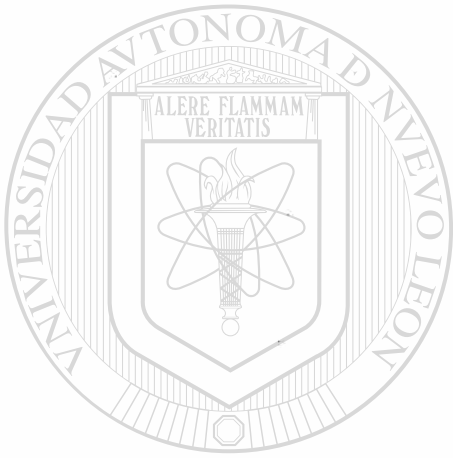
Z532

FCB

1993

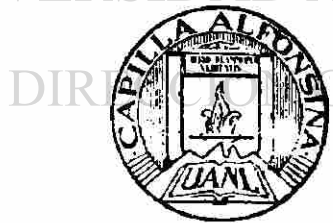
G81

TM
25320
FCB
1993
G81



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FONDO TESIS

24265



1020091320

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

SELECCION Y EVALUACION DE CEPAS NATIVAS DE
Bacillus thuringiensis CONTRA *Heliothis zea* (Boddie)
y *Spodoptera exigua* (Hübner).

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

GUILLERMO JOSE GUTIERREZ CASTILLO

COMISION DE TESIS

M.C. LUIS J. GALAN-WONG
PRESIDENTE

DRA. CRISTINA RODRIGUEZ-PADILLA
SECRETARIO

M.C. LILIA H. MORALES-RAMOS
VOCAL

MONTERREY, NUEVO LEON

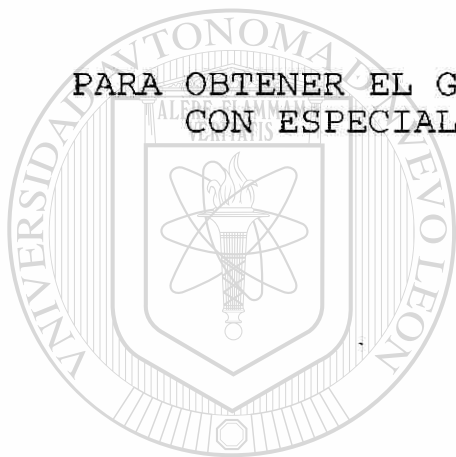
MARZO DE 1993.

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

SELECCION Y EVALUACION DE CEPAS NATIVAS DE
Bacillus thuringiensis CONTRA *Heliothis zea* (Boddie)
y *Spodoptera exigua* (Hübner).

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA



PRESENTA

UANL

GUILLERMO JOSE GUTIERREZ CASTILLO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. LUIS J. GALAN-WONG
DIRECTOR-TESIS

DRA. CRISTINA RODRIGUEZ-PADILLA
CODIRECTOR

MONTERREY, NUEVO LEON

MARZO DE 1993.

DEDICATORIA

A mis padres

**Guillermo Gutiérrez Gutiérrez
Ana Castillo Guardado**

**Por su comprensión y apoyo, permitiéndome alcanzar una
meta mas que me he trazado.**

A mis hermanas

**Yamilette
Maribel**

**Por compartir conmigo la felicidad de alcanzar una
meta.**

A mi sobrino

Victor Hugo

Por los momentos agradables que me ha brindado.

**A mi esposa Emperatriz Lugo Villalta
Con mucho amor**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas, por sus valiosas aportaciones necesarias para la culminación de este trabajo.

Al M.C. Luis J. Galán Wong, director de tesis, un profundo agradecimiento por su acertada dirección y su valiosa asesoría aportadas en la realización de este trabajo.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, co-directora de tesis, por su asesoría, revisión de este trabajo y por formar parte de la comisión de tesis.

A la M.C. Lilia H. Morales Ramos, por la revisión de este trabajo y por formar parte de la comisión de tesis.

Al Ing. Edgar Reyes Melo, compañero de maestría, con especial reconocimiento por su ayuda y apoyo en todo momento.

A mis compañeros de maestría Angeles, Guadalupe, Emma.

A todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible la realización del presente trabajo.

INDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	ii
RESUMEN	iii
I.- INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	4
II.- ANTECEDENTES	6
III.- MATERIALES Y METODOS	28
3.1 Aislamiento de cepas nativas	28
3.2 Identificación serológica de las cepas	29
3.3 Selección de cepas	34
3.4 Medios de cultivo	38
3.5 Experimentos a nivel planta piloto	41
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	45
V.- CONCLUSIONES	55
VI.- LITERATURA CITADA	57

ABREVIATURAS

KDa	Kilodaltones
mg	miligramos
l	litros
DL ₅₀	Dosis Letal Media
UIP	Unidades Internacionales de Potencia
EMP	Emden-Meyerhoff-Parnas
TCA	Tricarboxílico
β	Beta
α	Alfa
δ	Delta
ml	mililitro
U.F.C.	Unidades Formadoras de Colonia
g	gramo
r.p.m.	Revoluciones por minuto
°C	Grados centígrado
col.	Colaboradores
μg	Microgramo
K _{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno
VVM	Volumen-Volumen-Masa
V/V	Volumen-volumen
ppm	Partes por millón
atm.	Atmósfera
^R	Marca registrada
Kg	Kilogramos
SSF	Solución salina formalinizada
LRM	Líquido de remojo de maíz
DNS	Dinitrosalicílico
nm	nanómetros
nA	nanoamperios
CL	Concentración de Oxígeno Disuelto
ln	Logaritmo natural
%	por ciento

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- FIGURA 1. Tiempo de fermentación y esporas viables, cepa CNPVBt-12, en cinco medios de cultivo.
- FIGURA 2. Comparación del % de mortalidad de *Spodoptera exigua* y *Heliothis zea* cepa CNPVBt-12, en 5 medios de cultivo.
- FIGURA 3. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares de *Bacillus thuringiensis*, cepa CNPVBt-12, medio I.
- FIGURA 4. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares de *Bacillus thuringiensis*, cepa CNPVBt-12, medio II.
- FIGURA 5. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares de *Bacillus thuringiensis*, cepa CNPVBt-12, medio III.
- FIGURA 6. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares de *Bacillus thuringiensis*, cepa CNPVBt-12, medio IV.
- FIGURA 7. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares de *Bacillus thuringiensis*, cepa CNPVBt-12, medio V.
- FIGURA 8. Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* agitación 300 r.p.m., aereación 0.5 VVM.
- FIGURA 9. Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* agitación 400 r.p.m., aereación 0.5 VVM.
- FIGURA 10. Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* agitación 500 r.p.m., aereación 0.5 VVM.
- FIGURA 11. Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* agitación 400 r.p.m., aereación 1 VVM.
- FIGURA 12. Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* agitación 500 r.p.m., aereación 1 VVM.
- FIGURA 13. Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* agitación 600 r.p.m., aereación 1 VVM.
- FIGURA 14. $K_L a$ en función de la agitación a nivel planta piloto a 0.5 VVM y 1 VVM.
- CUADRO 1. Origen de los doce aislamientos de *Bacillus thuringiensis*.
- CUADRO 2. Identificación serológica de 12 cepas de *Bacillus thuringiensis*.

- CUADRO 3. Saturación del antisuero 3a3b (HD-1) con el antígeno 3a(HD-4) cruzado con las 12 cepas nativas.
- CUADRO 4. Producción del complejo espora-cristal para los bioensayos de selección de cepas.
- CUADRO 5. Bioensayos preliminares de las doce cepas nativas contra *Heliothis zea*.
- CUADRO 6. Bioensayos preliminares de las doce cepas nativas contra *Spodoptera exigua*.
- CUADRO 7. Dosis Letal Media en $\mu\text{g/ml}$ de la cepa seleccionada CNPVBt-12 contra *Heliothis zea*.
- CUADRO 8. Dosis Letal Media en $\mu\text{g/ml}$ del estándar(HD-1) contra *Heliothis zea*.
- CUADRO 9. Dosis Letal Media en $\mu\text{g/ml}$ de la cepa seleccionada CNPVBt-12 contra *Spodoptera exigua*.
- CUADRO 10. Dosis Letal Media en $\mu\text{g/ml}$ del estándar(HD-1) contra *Spodoptera exigua*.
- CUADRO 11. Análisis de varianza para el % de Mortalidad de *Heliothis zea* en 5 medios de cultivo.
- CUADRO 12. % de mortalidad del insecto-blanco *Heliothis zea* con la δ -endotoxina de la cepa CNPVBt-12, medio II, bajo diferentes tratamientos.
- CUADRO 13. Evaluación de los tratamientos (aereación/agitación) através de diferentes parámetros de fermentación.

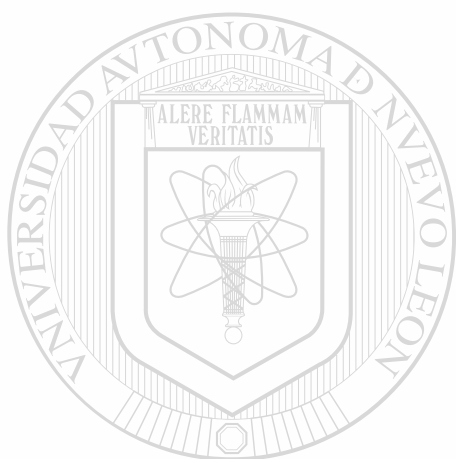
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Se aislaron 12 cepas de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo recolectadas en diferentes regiones de Nicaragua. De acuerdo a la identificación serológica, las cepas se identificaron como *B.thuringiensis* var. *kurstaki*, serotipo 3a3b. La selección de cepas se efectuó con el criterio de toxicidad. La mejor cepa resultó ser CNPVbt-12 contra los insectos blancos *Heliothis zea* y *Spodoptera exigua*. Contra *H.zea* presentó una DL₅₀ de 119.05 µg/ml.; las Unidades Internacionales de Potencia (UIP) por mg de muestra fueron 18,373. Contra *S.exigua* presentó una DL₅₀ de 179.85. Las UIP fueron 14,577. En este trabajo se evaluaron 5 medios de cultivo con melaza como única fuente de carbono, utilizando la cepa seleccionada CNPVbt-12. El medio II elaborado con melaza de caña, harina de pescado, harina de soya, líquido de remojo de maíz y levadura, resultó ser el mejor de acuerdo a los parámetros: tiempo de fermentación, cantidad de esporas viables y toxicidad. Al analizar la toxicidad de los extractos finales obtenidos de *B.thuringiensis* CNPVbt-12 del medio II se encontró una toxicidad para *H.zea* (93.16%) y para *S.exigua* (84.24%). De los tratamientos de combinaciones aereación/agitación que se evaluaron en fermentadores de 40 litros de capacidad total, con el medio y cepa seleccionados, la mejor combinación fue de 600 r.p.m./1 VVM, en la cual la

fermentación duró 26 horas, un rendimiento de 18 g/l de esporas-cristales, determinando un K_La de 237 H^{-1} resultó el óptimo para la reproducibilidad de la toxicidad en los extractos recuperados en esta escala, la cual fue de 80% contra *H.zea* a $500 \mu\text{g/ml}$.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

I. INTRODUCCION

La lucha química contra los insectos resulta cada vez más complicada y en ocasiones hasta decepcionante, principalmente a causa de los fenómenos de resistencia a los plaguicidas químicos, por lo que el hombre ha buscado alternativas al uso de estos. En efecto, en 1948, 14 especies nocivas eran resistentes a un insecticida, en 1969 eran 229 y en 1984, se contaba con más de 447. La comprensión de este fenómeno de consecuencias graves sobre los costos de producción agrícola y sobre la salud ha llevado a la implementación del control biológico. (44).

Jean Deacon (1984), define el Control Biológico como la práctica o el proceso en el cual los efectos no deseables de un organismo son reducidos por medio de otro organismo que no es la plaga, la planta hospedera o el hombre". (12). El Control Microbiano representa una rama del control biológico de insectos-plaga. (4).

Los agentes microbianos de control biológico son organismos que se encuentran en la naturaleza e incluyen: virus, bacterias, hongos, protozoarios y nematodos. (12).

Actualmente de alrededor de 300 bacterias entomopatógenas, la más importante desde el punto de vista comercial es el género *Bacillus* de los cuales sólo cuatro han sido estudiados como insecticidas: *Bacillus popilliae*, *Bacillus moritai*,

Bacillus sphericus y *Bacillus thuringiensis*, ésta última representa el microorganismo entomopatógeno de mayor producción y distribución en el mundo(12). Hoy día se utilizan aproximadamente 2.3 millones de Kg. de bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis* anualmente, para el control de plagas agrícolas y forestales principalmente.(37).

Es importante señalar los daños que causa el "gusano soldado de la remolacha" *Spodoptera exigua* (Hübner) en los diferentes cultivos, principalmente en el maíz, sorgo, algodón, tabaco, evitando el desarrollo de las plantas y algunas veces las destruye totalmente (46). Por otro lado, el "gusano elotero" *Heliothis zea* (Boddie), es seriamente dañino al jitomate, tabaco y maíz, en las plantas del algodón, sólo un gusano puede consumir el interior de las bellotas de toda una rama.(46).

B.thuringiensis es una bacteria grampositiva, formadora de esporas, saprófita del suelo y facultativa parásita de insectos, la cual se caracteriza por la formación de un cuerpo parasporal protéico durante la esporulación. Estos cristales son liberados al exterior después de la lisis de la pared celular.(32,35).

Hay tres factores que significarán un aumento de su uso en el futuro, éstos son:

- La mayor parte de las plagas-insectos han desarrollado resistencia a varias clases de insecticidas químicos.
- El costo social asociado con el uso de estos agentes, los

efectos negativos en la salud y el daño al medio ambiente se han incrementado.

- El costo directo para desarrollar y producir un insecticida químico derivado de petroquímicos también han aumentado rápidamente. (55).

Muchos reportes de investigación han cubierto diferentes aspectos relacionados a *B.thuringiensis*, tales como genética, metabolismo, toxinas, etc., sin embargo muy poco se ha enfocado a los procesos de fermentación y desarrollo de tecnología, para su producción. (30).

Consideramos de importancia estudiar el comportamiento y selección de cepas nativas de *B.thuringiensis*, propagadas en diferentes medios de fermentación, así como el efecto que ejercen dichos medios sobre la toxicidad de la δ -endotoxina producida hacia insectos Lepidopteros de importancia agrícola.

En base a lo anteriormente expuesto en el Centro Nacional de Protección Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería en Managua, Nicaragua se implementó un proyecto de investigación para el desarrollo de una tecnología propia para la producción de bioinsecticida a partir de *B.thuringiensis*.

HIPOTESIS

Se pueden recuperar y seleccionar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de suelos de Nicaragua con una buena actividad tóxica contra *Heliothis zea* y *Spodoptera exigua*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para la realización de este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Identificación serológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelos de Nicaragua.

2- Seleccionar la cepa mas tóxica contra los insectos blancos *Heliothis zea* y *Spodoptera exigua*.

3- Optimizar las condiciones para la producción de δ -endotoxina con la cepa seleccionada en diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio y planta piloto.

ORIGINALIDAD

Identificación y selección de las primeras cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelo de Nicaragua, como parte de un desarrollo biotecnológico que resuelva problemas básicos y aplicados para Nicaragua en el campo de Bioinsecticidas. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II. ANTECEDENTES

2.1 . ASPECTOS GENERALES DE *Bacillus thuringiensis*.

2.1.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CLASIFICACION.

El primer aislamiento de *B.thuringiensis* fue de larvas enfermas del gusano de la seda *Bombyx mori* en 1902. En 1915 investigadores japoneses demostraron que solamente cultivos esporulados eran tóxicos a las larvas de éste insecto por eso sugirieron que la rápida toxicidad observada era debido a alguna toxina. En el mismo año Berliner aisló una cepa asignándole el nombre **thuringiensis** por la provincia de thuringia de las larvas de la palomita de la harina del mediterráneo *Anagasta kuhniella*. (40,49).

A partir de 1950 otros investigadores aislaron de varios insectos otras bacterias cristalíferas. *Bacillus anduzae* fue aislada por Vago en 1952 a partir de *Bombyx mori*, *Bacillus dendrolimus* fue aislado de *Dendrolimus sibericus* por Találaev en 1956. *Bacillus cereus* var. *galleriae* fue aislada de la palomilla de la cera, descrita y aislada por Isakova en 1958. *Bacillus entomocidus* var. *subtoxicus* y *Bacillus entomocidus* var. *entomocidus* fueron aisladas a partir de *Plodia interpunctella* y *Aphonia gularis* respectivamente por Steinhaus en 1951. (54).

Aunque el descubrimiento de *B.thuringiensis* tomó lugar en la primera parte del siglo veinte, su desarrollo como control biológico de insectos-plagas fue lenta, particularmente debido a una larga y permanente confusión entre las diferentes variedades. El primer intento importante para diferenciar y

clasificar las primeras cepas aisladas fue hecho por Heimpel y Angus, 1958, usando caracteres morfológicos y bioquímicos.(55). La introducción de serovariedades basadas en flagelos y H-antígenos (De Barjac y Bonnefoi 1962) y estudios extra de bioquímica facilitaron que éstas cepas aisladas fueran más claramente distinguidas. Todas las cepas aisladas fueron identificadas como H-serotipos de una especie *B.thuringiensis*. El método de aglutinación flagelar ha probado ser hasta la fecha el más sensible, específico y rápido.(De Barjac 1981). En 1968 se creó el Centro Internacional de Control Biológico en París, Francia.(13,15,16).

Un mayor avance ocurrió cuando Dulmage aisló la cepa de----- *B.thuringiensis* clave HD-1 var. *kurstaki*. Esta cepa presentó 16 veces más potencia que la var. *thuringiensis* contra *Heliotis virescens* una de las mayores plagas en algunos cultivos de los E.U.A.. Así en un período de pocos años todo E.U.A. utilizaba la cepa HD-1.(19).

El siguiente gran avance ocurrió en 1976 con el descubrimiento de la variedad *israelensis*, que tiene gran toxicidad para los mosquitos (Diptera) y mosca negra (Simulidae) (14). También es de importancia el aislamiento de las variedades llamadas **tenebrionis** y **san diego**, que tienen el mismo H-antígeno de la serovariedad *morrisoni* (H8a8b) de la cual difieren por su patogenicidad a las larvas de Coleoptera.(16,33,39).

Krywienczyk, Dulmage y Fast 1978, demostraron que un mismo serotipo puede tener diferente toxicidad contra varias especies de insectos. Ellos probaron que *B.thuringiensis* var. *kurstaki*

(serotipo 3ab), tiene diferente toxicidad contra los insectos plagas *T.ni* y *H.virescens*. Ellos sugieren que el serotipo 3ab puede ser separado en dos subgrupos (patovariedades) designados como k-1 y k-73.(41).

Rodríguez y col. 1990, descubrieron una nueva subespecie, con una única forma triangular del cuerpo parasporal cristalino, la cual fue nombrada subesp. *neoleonensis*. Esta cepa fue aislada del suelo colectado en Guanajuato, un estado del centro de México e identificada en la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, también Rodríguez y Galán en 1988, aislaron e identificaron una nueva cepa de *B.thuringiensis* la cual fue designada como subespecie *mexicanensis*.(16,53).

La actual colección internacional de cepas de *B.thuringiensis* aisladas de diferentes países asciende a 1600 las cuales pertenecen a 34 serovariedades incluidos 27 subgrupos antigénicos y 7 subgrupos.(16). En la tabla 1 se muestra la clasificación de *B.thuringiensis*.

2.1.2. HABITAT DE *B.thuringiensis*.

Esta bacteria es un parásito facultativo de insectos, así como un saprófito en el suelo. En condiciones adversas sus endosporas pueden permanecer en vida latente por años, al encontrarse en un medio ambiente propicio como el cuerpo de un insecto, medios de cultivo, etc., ocurre la germinación de las esporas que da lugar a una multiplicación activa de células vegetativas que presentan exigencias nutricionales. Como el cuerpo de un insecto es un sistema cerrado, con el paso del tiempo se suscitan una serie de

2.1.3 MORFOLOGIA CELULAR

El organismo es un miembro del grupo I del género *Bacillus*, el cual también incluye *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.megaterium*, *B.cereus* y *B.anthraxis*. Está muy relacionado a *B.cereus*, distinguible solamente por la presencia de un cuerpo parasporal y por los antígenos flagelares.(55).

Las células vegetativas son bacilos gram-positivos, 2 a 5 x 1 µm, con flagelos peritricos, se divide por fisión binaria y frecuentemente forma cadenas. Un cristal bipiramidal parasporal es formado durante la esporulación.(55).

2.1.4 TOXINAS PRODUCIDAS POR *B.thuringiensis*.

Hay 7 diferentes toxinas descritas en cepas de *B.thuringiensis*, las de mayor producción con actividad insecticida son:

- α - exotoxina, llamada también lecitinasa o fosfolipasa C.
- β - exotoxina, conocida como factor mosca.
- δ - endotoxina, el cristal parasporal protéico.(49).

α -EXOTOXINA.

Esta toxina es también formada por *B.cereus*. Es una enzima termolábil, la cual se acumula durante el crecimiento exponencial, es capaz de lisar muchos tipos de células. Parece que aumenta la acción de las otras toxinas. Fue la primer toxina aislada. Tiene 23 Kilodaltones (KDa).(34,55).

Debido a que el fosfolípido lecitina de la membrana celular es usado a menudo como sustrato, este tipo de enzimas se denominan lecitinasas o fosfolipasas.(7).

β-EXOTOXINA

También conocida como "factor mosca" es una toxina termoestable secretada por algunas variedades durante el crecimiento exponencial, *B.thuringiensis* produce cerca de 50 mg/l.(55). Es derivada de Adenosina, soluble en agua, la cual actúa como un inhibidor de nucleotidasa. Es altamente tóxica para moscas y otros insectos, bloqueando la mitosis celular. Es un potente inhibidor de ADN-dependiente de ARN-polimerasa en células bacterianas y de mamíferos. En células sanguíneas de humanos, ha sido demostrado que incrementa las aberraciones cromosomales. Descubierta por Burgerjon, Heimpel y Angus.(31,34).

δ-ENDOTOXINA

Es una protoxina formada durante los estadios III y V de la esporulación. El cristal parasporal está compuesto de subunidades glicoprotéicas (5 % de carbohidratos y el resto proteína). El azúcar está compuesto de hexosas neutrales (glucosa y manosa, 38% y 1.8% respectivamente del peso seco del cristal). Los azúcares están unidos a la serina y treonina. Cada subunidad tiene un peso molecular de cerca de 134,000 daltones. El porcentaje aproximado de aminoácidos presentes en la δ-endotoxina (hay que señalar que estos varían entre subespecies): Aspártico 11%; Glutámico 12%; Leucina 9%; Arginina 8%; Fenilalanina 6%; Tirosina 6%; Treonina 5%; Serina 5%; Prolina 5%; Valina 5%. La formación de enlaces cruzados S-S, hacen más insoluble el cristal.(32).

La protoxina es moderadamente termoestable. La toxina cristalina es soluble e hidrolizada a pH mayor a 9. Todas las especies de

insectos poseen un jugo intestinal alcalino, el cual disuelve la protoxina. Las proteasas alcalinas del insecto entonces hidrolizan la protoxina a fragmentos tóxicos.(31,55).

Todos los cristales de *B.thuringiensis* específicos para Lepidopteros contienen proteínas de 130 a 140 KDa, las cuáles pueden ser agrupadas en tres tipos según el peso molecular de la protoxina.(34).

Tipo A: El cristal está constituido de protoxinas de 130 a 133 KDa, los cuáles son procesados por tripsina a toxinas de 60 KDa.

Tipo B: La protoxina de 140 KDa genera un fragmento tóxico de 55 KDa.

Tipo C: La protoxina de 135 KDa genera un fragmento tóxico de 63 KDa. El fragmento tóxico está localizado en la unidad N-terminal de la protoxina. La toxina reacciona con la membrana de las células epiteliales del intestino, las cuales consecuentemente se hinchan y lisan causando eventualmente la muerte del insecto.
(34).

B.thuringiensis subespecie *israelensis* tiene 3 proteínas, las cuáles tienen un peso molecular de 28, 70 y 135 KDa, cada una es inmunológicamente diferente. Las proteínas son desdobladas por tripsina de la siguiente forma: La proteína de 28 KDa genera fragmentos tóxicos de 26, 25, 23 y 22 KDa. La proteína de 70 KDa genera un fragmento tóxico de 38 KDa. La proteína de 135 KDa genera fragmentos tóxicos de 94, 72, y 65 KDa. La toxina solubilizada posee dos actividades biológicas; larvicida y citolítica general(hemolítica). La actividad hemolítica reside en la proteína de 28 KDa.(34).

El cristal de *B.thuringiensis* variedad *israelensis* contiene una amplia variedad de proteínas, mientras el cristal de la mayoría de las otras cepas consiste de una proteína de 130 a 140 KDa exclusivamente.(2).

Han sido propuestas varias hipótesis en los eventos toxicológicos relacionados a la acción de la toxina del cristal parasporal. Ninguno ha sido probado. Estos incluyen: Separación de las células del intestino y su desunión de la membrana; el incremento en la actividad de secreción de las células epiteliales del intestino; incremento en la permeabilidad de la pared del intestino a iones de sodio, con una lenta velocidad de entrada de la glucosa en la hemolinfa; parálisis del intestino y alguna parálisis general del cuerpo.(2).

El modo de acción de la toxina en general es que produce parálisis intestinal, lo cual provoca una falta de alimentación y lesiones que favorecen el crecimiento y la proliferación del bacilo, con ello resulta una septicemia como la principal causa

de muerte de la larva que ocurre entre las 24 y 96 horas después de haber ingerido la mezcla de esporas y cristales.(10). ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.1.5. ACTIVIDAD INSECTICIDA Y BIOENSAYOS CON *B.thuringiensis*

Antes de 1970, los productos de *B.thuringiensis* eran estandarizados en base al conteo de esporas y su potencia medida en términos de DL_{50} , esto es, que dosis mataba el 50% de las larvas de una especie dada de insectos. Luego se demostró que no había correlación entre la DL_{50} y el número de esporas. La Estandarización Industrial fue originalmente un estricto problema

regional y cada fábrica registraba su producto en su país. Así en diferentes países se desarrollaron métodos de bioensayos utilizando diferentes estándares y diferentes insectos blancos. Obviamente cada fabricante teóricamente podía usar su propia preparación estándar y producir un producto de constante calidad. (23,26).

Muchos patólogos de insectos sugirieron bioensayos alternativos, pero no fue hasta 1971 que Dulmage y col. desarrollaron un método de bioensayo que permitía estandarizar las formulaciones de compañías de diferentes países. (25,55).

En los Estados Unidos, el valor de 16,000 Unidades Internacionales de Potencia (UIP)/mg de extracto, para el estándar HD-1-S-1971 se determinó experimentalmente, comparándolo con el E-61 (Francia) en bioensayo contra el insecto-blanco *T.ni* Hb.. El valor 16,000 UIP fue sin embargo, arbitrario y se estableció experimentalmente lo siguiente: que HD-1-S-1971 (serotipo 3a,3b) fue 18 veces más activo que E-61 (serotipo 1) contra *T.ni*. La comparación que se hizo entre las dos unidades es válida solamente para este insecto. (9,23).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2. PARAMETROS DE FERMENTACION.

2.2.1 METABOLISMO

B.thuringiensis es una bacteria quimioheterótrofa, la cual oxida aeróbicamente los carbohidratos para convertirlos en ácidos orgánicos, al ser oxidados forman dióxido de carbono. Este organismo exhibe un complejo metabolismo, el cual inicialmente emplea la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), convirtiéndose a

un modificado del ciclo del Acido Tricarboxílico (TCA) al comienzo de la esporulación. (55).

El modelo metabólico puede ser descrito como trifásico: crecimiento exponencial, transición y esporulación.

2.2.1.1 FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL (TROPOFASE).

El catabolismo de azúcares simples ocurre en un 93 a un 100 % por la ruta **EMP** y de 0 a 7 % por la ruta fosfato-pentosa. Los metabolitos intermediarios formados son piruvato, acetato y poli- β -OH-butirato, principalmentelos los dos últimos. (55).

Bajos niveles de amilasa son formados durante la parte media y alta de la fase logarítmica de crecimiento. La cantidad formada depende marcadamente de la variedad bacteriana, pero es independiente de la concentración de almidón y glucosa. Para el aislado HD-1 de la var. *kurstaki*, la enzima tiene un pH óptimo de 6 y se requiere calcio y manganeso para una máxima actividad. (63).

El nitrógeno es asimilado como amonio o aminoácidos, los cuáles son transaminados o desaminados para producir los aminoácidos requeridos por la célula. Durante el crecimiento exponencial, la formación de exoproteasa es normalmente reprimida por la presencia de iones amonio. Una mezcla de aminoácidos suprime la formación de exoproteasa. (28).

Las α -amilasas hidrolizan enlaces alfa-1,4 del almidón. Parece probable que su única función es para degradar los polímeros en el medio y así suplir a la bacteria con una fuente asimilable de nutrientes. (50).

La máxima síntesis de enzimas extracelulares normalmente ocurre antes de la esporulación en la parte tardía de la fase exponencial y la parte temprana de la fase de crecimiento. (50).

2.2.1.2 FASE DE TRANSICION

Cerca de la mitad de la fase logarítmica, cuando los azúcares simples han sido consumidos aproximadamente a la mitad, enzimas del ciclo **TCA** son formados.

Durante la fase de transición, el acetato, piruvato y poli- β -OH-butirato son catabolizados vía el ciclo modificado **TCA**, por otro lado la actividad de la ruta **EMP** decrece lentamente. La proporción del catabolismo de estos ácidos orgánicos es marcadamente baja, sin embargo cantidades significativas de aminoácidos están presentes en el medio. En este caso, aminoácidos tales como glutamato, aspartato y alanina son también catabolizados, sirviendo como fuente de carbón y nitrógeno. (8, 65).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.2.1.3. FASE DE ESPORULACION

Aproximadamente 3 horas después de comenzada la fase estacionaria (entre los estadios II y III de la esporulación), comienza la formación del cristal parasporal. Al mismo tiempo, la membrana parasporal es completada y la producción de exoproteasas decrece marcadamente. La síntesis completa de la endotoxina precede la maduración de la espora por cerca de 2 horas. (55).

Durante la formación de la espora y el cristal, el metabolismo

del rompimiento de las proteínas de la célula y el medio. Estos son usados para la síntesis de proteínas y son fuente de energía y carbón. Las proteínas de la espora tienden a derivarse de la hidrólisis de las proteínas de la célula vegetativa, mientras que las proteínas del cristal tienden a incorporarse más aminoácidos derivados del medio. (47,65).

La masa de las esporas es por lo menos 15% de la masa previa de la célula vegetativa y el cristal es cerca de 12.5 a 17% de la misma. Una buena producción de esporas es de $5 \text{ a } 10 \times 10^9 / \text{ml}$. (55).

2.2.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

El rango de temperatura de crecimiento de *B.thuringiensis* es de 20 a 42°C, pero el crecimiento en los límites de este rango, generalmente resulta en pérdida de la producción de endotoxina.

La producción óptima de endotoxina ocurre de 28 a 30°C; sin embargo el crecimiento es lento a 28°C. La temperatura normal de

fermentación es así 30°C. (55).

El crecimiento ocurre en el rango de pH 5.6 a 8.5. El pH inicial es 6.8 a 7.2, típicamente decrece a 5.8, ya que es liberado acetato, cuando éste es consumido aumenta a 7.5 a 8.0 (55).

Muchas variedades son capaces de utilizar las siguientes fuentes de carbón: glucosa, fructosa, almidón, maltosa, ribosa, glicerol, ácidos orgánicos, glutamato y otros posibles aminoácidos. sin embargo, la ausencia de carbohidratos metabolizables se reporta que resulta en una defectuosa esporulación. (47).

El oxígeno es requerido para el crecimiento, el nitrato es

también capaz de actuar como aceptor de electrones. (55).

Los medios comerciales han usado fuentes de nitrógeno complejas como: harina de maíz, licor de maíz, harina de pescado, harina de semilla de algodón, caseína, etc.. Los medios son algunas veces suplementados con extracto de levadura y/o peptona. La omisión de estos suplementos influye en la esporulación y reduce la producción de δ -endotoxina. (55).

2.2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Para la producción de cristales se han desarrollado una gran variedad de medios de fermentación, sintéticos, semisintéticos, hasta medios de cultivo a base de productos completamente naturales. Un medio mínimo que soporta un abundante crecimiento, esporulación y formación de cristal es descrito por Nickerson y Bulla como sigue (todas las cantidades son gramos por litro en agua destilada): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.05; $CaCl_2$, 0.08; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.005; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0005; K_2HPO_4 , 0.5; $(NH_4)_2SO_4$, 2; Glucosa, 1; y glutamato, aspartato o citrato,

2. El trabajo de Rajalakshmi y Shethna demostró que el medio glucosa-sales minerales y alguna cantidad de aspartato, arginina, glicina, prolina, asparagina, metionina, glutamina o cistina soporta el crecimiento. (48,52).

Dubois 1968, describe un procedimiento lote de laboratorio para la producción de *B.thuringiensis* usando un medio base de:

Glucosa, 2; Bacto peptona(Difco), 2; $(NH_4)_2SO_4$, 3; K_2HPO_4 , 17.4; $MgSO_4$, 0.03; $CaCl \cdot H_2O$, 0.018; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0075; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.075; $ZnSO_4 \cdot 7 H O$, 0.075; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.04. (18).

En 1969, Pendleton, describe un exitoso medio a base de: harina de pescado 2%, harina de almidón 1%, CaCO_3 0.1%, Niacina 0.001%, y una mezcla de sales.(49).

Para 1970, Dulmage reportó el aislamiento de *B.thuringiensis* HD-1 var. *kurstaki*, la cual produce en fermentaciones altos niveles de δ -endotoxina, utilizando un medio que contiene: triptona, 10.0; dextrosa, 5.0; almidón, 5.0; extracto de levadura, 2.0; K_2HPO_4 , 1.0; y KH_2PO_4 , 1.0, recomendando el uso de substratos baratos como son: harina de semilla de algodón, 10.0; y harina de soya, 15%(19). En el mismo año reportó también la producción del complejo espora δ -endotoxina para doce variedades de *B.thuringiensis* en dos medios de fermentación basándose uno en: triptona, 10.0; dextrosa, 5.0; almidón de maíz, 5.0; extracto de levadura, 2.0; K_2HPO_4 , 1.0; KH_2PO_4 , 1.0; y el otro en harina de semilla de algodón, 10.0; bacto peptoná, 2.0; dextrosa, 15.0; extracto de levadura, 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; y CaCO_3 , 1.0; obteniéndose resultados de una gran variabilidad en la actividad tóxica de las preparaciones derivados de los medios y al medir la actividad por bioensayos, ésta no correspondía con la cuenta de esporas, ni con el rango de crecimiento del organismo, concluyendo que la toxicidad de éstas preparaciones varía no sólo con la cepa aislada, sino también con el medio de fermentación usado.(21).

Más tarde, en 1971 Dulmage, recuperó complejos espora- δ -endotoxina de 16 aislados de *B.thuringiensis* var. *alesti* (serotipo 3a) y de dos aislados de *B.thuringiensis* var. *kurstaki* (serotipo 3a3b) cultivados en tres medios de fermentación a base

de sales minerales y variabilidad en la fuente de carbono y nitrógeno tal como: triptona, proflo, harina nutrisoya, almidón de maíz, extracto de levadura y bactopectona. Demostró que la cantidad de δ -endotoxina producida por los aislados varía ampliamente dependiendo del aislado y medio sobre el cual crece, así la actividad insecticida de preparaciones de *B.thuringiensis* no puede ser estimada por serotipos, ya que algunos aislados del mismo serotipo produjeron diferentes actividades insecticidas, cuando se cultivaron en medios diferentes. (22).

Así mismo en 1973, Dulmage y de Barjac desarrollaron la fermentación de un nuevo aislado de *B.thuringiensis* HD-187 e identificado como serotipo 5 (5a,5b) el cual produce altos rendimientos de δ -endotoxina, muy superiores a los aislados anteriormente ensayados, cultivándolo en tres medios de fermentación 1ro.: el B-4 el cual contiene harina de semilla de algodón al 1%, el 2do.: el B-4b al 2% y el 3ro.: el B-8 al 2% mas líquido de remojo de maíz al 1.0%, todos con peptona al 0.2%; glucosa 1.5%; extracto de levadura 0.2% y sales minerales obtuvieron una actividad de $2,000 \times 10^6$ UIP por litro de caldo cosechado y el producto tenía una potencia de 200×10^3 /mg. (24).

Scherrer y col. 1973, observaron que un incremento en la concentración de glucosa aumenta las inclusiones cristalinas con un alto contenido proteico y actividad insecticida. La máxima producción de delta-endotoxina fué obtenida en un medio semisintético con una concentración de glucosa de 6 a 8 g/l. (57). Goldberg, Sueh, Battat y Klein 1980, optimizaron un medio para la producción del complejo espóra- δ -endotoxina de *B.thuringiensis*

a escala piloto (con dos fermentadores de 500 l. cada uno) con: glucosa, 30; peptona de soya, 2.0; extracto de levadura, 4.5; líquido de remojo de maíz, 5.0 ml (76 % de sólidos); KCl, 3.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0; H_3PO_4 , 7.0; MgSO_4 , 2.0; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.036; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0135; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.075; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.04; por cada 1000 ml de agua destilada a 32°C con aireación de 0.3 VVM, agitación de 120 a 160 r.p.m., pH 6.2 a 7.4 con producción de 4×10^9 U.F.C./ml. en 60 horas aproximadamente. (30)

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, las cuáles son adecuadas para disminuir costos de mercado. (10).

En 1981. Luthy y Ebersold, desarrollaron un medio complejo basado en ingredientes baratos, con la siguiente composición (g/l):

harina de soya, 35; almidón de maiz, 12.5; 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. (42).

Solama y col. 1981, proponen el uso de varios subproductos industriales y agrícolas, incluyendo algunos de los ya mencionados y otros como: levadura de forraje, sangre de res, subproductos secos de aves, suero de queso, así como semillas de leguminosas incluyendo: habas, garbanos, judías, cacahuates y lentejas, todos incorporados a un medio base conteniendo (g/l): glucosa, 6.0; extracto de levadura, 2.0; K_2HPO_4 , 4.3; CaCO_3 , 2.0;

y sales minerales en una concentración de 2%, para investigar su potenciales en mantener la producción de los complejos espora- δ -endotoxina de dos variedades *kurstaki* y *entomocidus* de *B.thuringiensis*, encontrando que la producción de esporas en estos subproductos, fueron diferentes de acuerdo a la variedad de *B.thuringiensis* probada, haciendo notar que en las mezclas de estos productos con levadura de forraje, siempre resultaron más altas las cuentas de esporas y productos finales para ambas variedades, cuando se agregaba sangre de res, indicando que estos subproductos fueron también eficientes en mantener la biosíntesis de δ -endotoxina con apreciable actividad insecticida contra *H.armigera*. Además los resultados indican que las leguminosas, soportan altas producciones de esporas , para cada variedad probada.(59).

Wakisaka y col. 1982, reportaron altos rendimientos de δ -endotoxina en un medio que contenía 330 μ g de potasio por ml., en cambio un medio deficiente de potasio, condujo a la formación de gránulos de ácido poli- β -hidroxibutírico, que son inactivos al gusano de seda. Al suplementar un medio deficiente de potasio con 0.1 % de KH_2PO_4 , KCl , KNO_3 y acetato de potasio, condujo a la formación de δ -endotoxina. Esto sugiere que el potasio juega un papel importante en aislados de *B.thuringiensis* subesp. *kurstaki* y *aizawi* para la esporulación y formación del cristal.(65).

Medrano y col. 1990, obtuvieron un bioinsecticida utilizando 3 fermentadores (planta piloto), con 9 litros de capacidad de trabajo, utilizaron el siguiente medio: melaza de caña de azúcar(45 % de azúcares reductores), 0.1 %; harina de soya, 2.0

%; líquido de remojo de maíz, 3.0 %; CaCO_3 , 0.10 %. Durante el proceso fueron medidos diferentes parámetros de fermentación, tales como: demanda de oxígeno, coeficiente de transferencia de oxígeno, $K_L a$, número de esporas, consumo de azúcares reductores, y otros, variando la proporción de aireación (VVM), agitación (r.p.m.), tamaño del inóculo (% V/V), etc.(45).

Podemos señalar en base a lo anterior que existe la factibilidad de utilizar una amplia variedad de subproductos agroindustriales de fácil disponibilidad y bajo costo en los medios de fermentación de este microorganismo, para economizar los costos del producto sin que disminuya la toxicidad de la cepa seleccionada. Por lo tanto se requiere de una selección adecuada de la concentración y tipo de fuente de carbono y nitrógeno que nos asegure un buen proceso de esporulación con la producción respectiva de la δ -endotoxina en el producto final.

Para el crecimiento de *B.thuringiensis* se requiere además de los nutrientes, el oxígeno. En los procesos de fermentación aeróbicos uno de los aspectos más críticos es la transferencia de oxígeno al caldo de fermentación, debido principalmente a la baja solubilidad del oxígeno en el agua (aproximadamente 7 ppm a 1 atm.). La demanda de oxígeno de un proceso de fermentación es satisfecha normalmente mediante aereación y agitación del caldo de fermentación, sin embargo la productividad de la mayoría de las fermentaciones está limitada por la disponibilidad del oxígeno. (60). En la literatura existe publicada una cantidad mínima de ejemplos prácticos para el escalamiento de reactores a nivel planta piloto e industrial. La medición del coeficiente

de transferencia de oxígeno (K_La) es conocido como uno de los criterios mas adecuados para el paso de una escala a otra (escalamiento), ademas permite evaluar la capacidad de transferencia de oxígeno de un bioreactor determinado. El K_La varía durante la fermentación por varias razones, entre ellas por el aumento de la viscosidad, los problemas de espuma y el aumento de la concentración celular.(51).

2.3 PRODUCCION COMERCIAL DE *B.thuringiensis*

B.thuringiensis var. *thuringiensis* fue el organismo utilizado para toda la producción comercial de bioinsecticidas a nivel mundial hasta 1970.(55).

La primer producción comercial de *B.thuringiensis* comenzó en Francia por 1938, bajo el nombre comercial de "Sporeine[®]", la cuál utilizaba una fermentación semisólida.(55).

También en Estados Unidos en 1957, la compañía Pacific Yeast Products creó las primeras preparaciones comerciales de *B.thuringiensis* con el nombre de "thuricide[®]". En 1959, la compañía Nutrile Products Inc. ingresó al mercado con su producto "Biotrol[®]". No obstante los usos de éstos productos fueron limitados por ser de baja actividad y por no contar con cepas de alta potencia y la estandarización adecuada.(5).

Un considerable trabajo técnico se desarrolló en ésta área de 1960 a 1969, durante el cual se registraron 8 patentes. De estos procesos, siete fueron en fermentación sumergida.(55).

La producción comercial de *B.thuringiensis* var. *israelensis* comenzó en 1980 a 1981 por éstas compañías y una fábrica

francesa. En los años 1981-1982, la producción mundial fue 1.6 a 2.3 millones de kg por año, con una producción en Estados Unidos de cerca de 680 mil kg por año y una producción en la URSS de cerca de 910 mil kg. por año.(55). En China se produjeron 732 mil Kg. de bioinsecticidas de *B.thuringiensis* en 1989, para el control de insectos transmisores de enfermedades y plagas agrícolas.(62). En la actualidad los productos comerciales de *B.thuringiensis* son producidos en varios países, principalmente Francia, E.U.A., y Rusia. El uso de esporas y cristales de *B.thuringiensis* para el control de plagas se ha incrementado gracias al desarrollo de nuevas y potentes formulaciones.(5). En la tabla 2 se muestran algunos bioinsecticidas de *B.thuringiensis*.

El mercado actual de los agentes de control biológico representa el 2 % del mercado total de insecticidas que asciende a 4 billones de dólares.(11).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 1. Clasificación de cepas de *Bacillus thuringiensis*.

H-antg.	Serovar.	Abrev.	Primera descripción
1	thuringiensis	THU	Berliner, 1915; Heimpel y Angus, 1958;
2	finitimus	FIN	Heimpel y Angus, 1958;
3	alesti	ALE	Toumanoff y Vago, 1951; Heimpel y Angus, 1958.
3a3b	kurstaki	KUR	de Barjac y Lemille, 1970;
4a4b	sotto	SOT	Ishiwata, 1905; Heimpel y Angus, 1958;
4a4c	kenyae	KEN	Bonnefoi y de Barjac, 1963;
5a5b	galleriae	GAL	Shvetsova, 1959; de Barjac y Bonnefoi, 1962;
5a5c	canadensis	CAN	de Barjac y Bonnefoi, 1972;
6	entomocidus	ENT	Heimpel y Angus, 1958;
7	aizawai	AIZ	Bonnefoi y de Barjac, 1963;
8a8b	morrisoni	MOR	Bonnefoi y de Barjac
8a8c	ostrinae	OST	Gaixin, Ketian, Minghus y Wingmin, 1975;
8b8d	nigeriensis	NIG	de Barjac, Frachon, Rajagopalan y Cosmao, no publicado.
9	tolworthi	TOL	Norris, 1964; de Barjac y Bonnefoi, 1968;
10	darmstadiensis	DAR	Krieg, de Barjac y Bonnefoi, 1968;
11a11b	toumanoffi	TOU	Krieg, 1969;.
11a11c	kyushuensis	KYU	Obba y Aizawa, 1979;
12	thomosoni	THO	de Barjac y Thopson, 1970;
13	pakistani	PAK	de Barjac, Cosmao, Shalk y Viviani, 1977;
14	israelensis	ISR	de Barjac, 1978;
15	dakota	DAK	De Lucca, Simonson y Larson, 1979;
16	indiana	IND	De Lucca, Simonson y Larson, 1979;
17	tohokuensis	TOH	Ohba, Aizawa y Shimizu, 1981;
18	kumamotoensis	KUM	Ohba, Ono, Aizawa y Iwanami, 1981;
19	tochigiensis	TOC	Ohba, Ono, Aizawa y Iwanami, 1981;
20a20b	yunnanensis	YUN	Wan-Yu, Qi-fang, Xue-Ping y You-Wei, 1979;
20a20c	pondicheriensis	PON	de Barjac, Frachon, Rajagopalan y Cosmao, no publicado.
21	colmeri	COL	De Lucca, Palmgren y de Barjac, 1984;
22	shandongiensis	SHA	Ying, Jie y Xichang, 1986;
23	japonensis	JAP	Ohba y Aizawa, 1986;
24	neoleonensis	NEO	Rodríguez-Padilla, Galan-Wong, de Barjac, Dulmage, Taméz-Guerra y Román-Calderón, 1988;
25	coreanensis	COR	de Barjac y Lee, no publicado.
26	silo	SILO	de Barjac y Lecated, no publicado.
27	mexicanensis	MEX	Rodríguez-Padilla y Galán-Wong, 1988;

N.B. tipo no móvil: wuhanensis WUH Hubei Inst. Microbiol. 1976.

Tomado de: de Barjac y Franchon 1990. (15).

TABLA 2. BIOINSECTICIDAS DE *Bacillus thuringiensis*.

BACTERIA	NOMBRE COMERCIAL	PRODUCTOR O COMPANIA	PAIS
<i>Bacillus thuringiensis</i> Endotoxina	Dipel	Abbott labs.	U.S.A.
	Thuricide	Sandoz, Inc.	U.S.A.
	Biotrol	Nutrilit Prods.Inc.	U.S.A.
	Agritrol	Merk & Co.	U.S.A.
	Bakthane	Rohm & Haas	U.S.A.
	Parasporin	Grain Proc.lab.	U.S.A.
	Certan	Sandoz, Inc.	U.S.A.
	Bactospeine	Biochem.Prod. S.A.	Francia
	Leptox	Biochem.Prod. S.A.	Francia
	Bug-Time	Biochem.Prod. S.A.	Francia
	Plantibac	Procida	Francia
	Sporeine	L.I.B.E.C.	Francia
	Entobacterin 3	Glavmikrobioprom	Rusia
	Dendrobacilline	Glavmikrobioprom	Rusia
	Biospor	Farbwerke-Hoechst	Alemania
Exotoxina <i>var. israelensis</i>	Bathurin	Chemapol-Biokma	Checoslo.
	Baktukal	Serm Zavod Kalanov.	Yugoeslav.
	Dipel	Bajo Lic. de Abbott	Bulgaria
	Insektin	Glavmikrobioprom	Rusia
	Toxobakterin	Glavmikrobioprom	Rusia
	Eksotoksin	Glavmikrobioprom	Rusia
	Vectobac	Abbott labs.	U.S.A.
	Teknar	Sandoz, Inc.	U.S.A.
	Bactimos	Biochem.Prod.S.A.	Francia

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS

3.1.1 AISLAMIENTO DE MUESTRAS DE SUELO.

Las cepas de *B.thuringiensis* se obtuvieron con el siguiente método: Se recolectaron muestras de suelo aproximadamente de 200 g.de diferentes regiones del país.Un gramo representativo de cada muestra de suelo, fue puesto en tubos de ensayo con 9 ml.de agua estéril, estos se pasteurizaron a temperatura 60-80 °C. durante 20 minutos, luego se realizó una dilución en serie para obtener $10^5 - 10^7$ tomando del tubo anterior un ml el cual se agregó al siguiente tubo con 9 ml. de agua estéril y agitando el tubo en el vortex cada vez antes de tomar el ml. con la pipeta. Del último tubo se tomó siempre con la pipeta y se colocó por 0.1 ml. en 4 platos Petri con agar nutritivo. Los platos Petri inoculados se mantuvieron 24 horas en incubación a 30°C. Después del tiempo de incubación se hicieron frotis de cada una de las colonias que crecieron en la caja, seleccionando a las que mostraban esporulación. A las 24 horas se repitió el procedimiento del inciso anterior, hasta seleccionar solamente colonias típicas con producción de esporas y cristales. Las colonias esporuladas y productoras de cristales fueron sembradas rayando cajas Petri con agar nutritivo por triplicado y se incubaron a 30°C, se repitió la tinción, cada 24 horas, hasta observar la esporulación y producción de cristales. Las colonias productoras de esporas y cristales obtenidas fueron sembradas por duplicado en tubos de ensayo con tapón de rosca,

conteniendo agar nutritivo y se pusieron en incubación a 30°C. Cada 24 horas se tomó una muestra con una asa de cada tubo y se realizó tinción simple. Los tubos con cultivos puros fueron guardados en refrigeración a una temperatura de 2-4°C, realizándose resiembras trimestrales de reactivación bajo las mismas condiciones.(38).

3.1.2 OBSERVACION MORFOLOGICA DE LAS CEPAS.

Las características morfológicas observadas fueron las siguientes: forma, elevación, margen, superficie, consistencia y color.

3.2 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LAS CEPAS.

La metodología que se utilizó para la identificación serológica de las cepas fue propuesta por H. de Barjac 1962.(13).

3.2.1 PRODUCCION DEL ANTIGENO.

Preparación del antígeno "H" flagelar de las doce cepas de estudio, el cual se realizó de la siguiente manera: Primero se activaron las cepas en tubos de ensayo 13 x 100 con tapón de rosca con 5 ml. de **Caldo Nutritivo**, el cual se inoculó con una asada de las bacterias que estaban en los tubos de ensayo con agar inclinado, se dejó 24 horas hasta que se formó en la superficie una capita de *B.thuringiensis* de la cual, se tomó una asada para inocular los matraces de 500 ml. con 100 ml. de **Caldo Nutritivo**. Se incubó en agitación rotatoria a 300 r.p.m., 30°C. por 15-18 horas. Con un 2 % de este cultivo se inoculó un segundo

matraz, manteniéndose a 30°C., 300 r.p.m. por 5-8 horas, luego durante el desarrollo exponencial, con dos asadas se inoculó un tubo **Craige** con **Caldo Nutritivo**, con 0.2 % de agar y se incubaron a 30°C. por 15-18 horas. El procedimiento se repitió transfiriendo dos asadas del tubo anterior a un segundo tubo **Craige**, por 12-14 horas, a 30°C. Se inocularon por duplicado matraces de 500 ml. con 100 ml de **Caldo Nutritivo** con dos asadas de las células que están en el segundo tubo **Craige**, incubándolo en agitación a 300 r.p.m. por 5-8 horas. En ésta fase se detuvo el crecimiento vegetativo con **Solución Salina Formalinizada (SSF)**, añadiendo aproximadamente 100 ml. a cada matraz y refrigerándose un mínimo de 12 horas, a una temperatura de 4°C. Se concentró el paquete celular centrifugando a 300 r.p.m. por 15 minutos a una temperatura de 5-10°C, se decantó el sobrenadante, se lavó con 100 ml de **SSF**, resuspendiendo suavemente el paquete celular. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se cosechó el paquete celular con 10 ml. de **SSF**. (15).

Concluida la preparación del antígeno "H" flagelar, a partir de este se prepararon los antígenos diluidos a una concentración semejante al tubo No.3 del Nefelómetro de McFarland. Este método se basa en la comparación visual de la turbidez de una suspensión de bacterias, con una escala preestablecida obteniéndose una indicación probable de la concentración de células bacterianas existentes en la suspensión. Es un método comparativo que está basado en la relación de diferentes concentraciones de BaCl₂ 1% en H₂SO₄ 1 % a una concentración de bacterias por cm³. (4)

3.2.2. PRODUCCION DE ANTISUEROS.

Los antisueros se prepararon en conejos a partir del antígeno "H" flagelar. El antígeno "H" se diluyó con **SSF** hasta una concentración correspondiente al tubo No.3 del Nefelómetro de McFarland. Se procedió a la inmunización de los conejos, bajo el siguiente protocolo. (15).

INYECCION	TIEMPO	DOSIS	VIA
1	día 0	0.5 ml	intravenosa
2	día 4	1.0 ml	intravenosa
3	día 8	2.0 ml	intravenosa
4	día 12	3.0 ml	intravenosa
sangrado	día 19	-----	vena central de la oreja punción cardíaca

El título de aglutinación se revisó 7 días después de la última inyección (día 19). Se tomó una muestra de sangre de conejo (4-5 ml) después de la última inyección. Esta se dejó coagular 37°C. por 30-60 minutos, centrifugándose posteriormente a 2000 r.p.m. por 15 minutos, se separó el suero para su titulación. Si el título de anticuerpos era superior a 5120 se procedía a sangrar al conejo; en caso de ser menor; el conejo se sometía a una reinmunización a partir de la inyección No.3. Se revisó el título de anticuerpos hasta que éste se había elevado. El antisuero colectado se distribuyó asépticamente en ampulas de 1 ml. selladas y guardadas a -20°C. Merthiolate de sodio se agregó al suero para mejorar el almacenamiento. (15).

3.2.3 TITULACION DE ANTISUEROS.

El título de aglutinación se define como la mayor dilución del suero que dá lugar a una aglutinación como regla general, este título se evalúa con margen de una dilución y sólo dá una idea semicuantitativa de la cantidad de anticuerpos presentes. El procedimiento fué el siguiente: Se enumeró una serie de tubos de 13 x 100 del 1 al 10 colocando en ellos 0.5 ml. de **SSF**, excepto en el primero, al que se le agregó 0.9 ml. de **SSF**. Se realizaron las diluciones al doble del antisuero de la siguiente manera: 0.1 ml. de antisuero se añadió al primer tubo para obtener una dilución 1:10 y se tomó de ella 0.5 ml. que se pasó al segundo tubo, obteniéndose la dilución 1:20 y así sucesivamente hasta el tubo 10 correspondiente a la dilución 1:5120. De cada dilución se tomó 0.1 ml. que se colocó en otra serie de tubos, se agregó después 0.9 ml. de antígeno homólogo el cual estaba a una concentración similar al tubo No.3 del Nefelómetro de McFarland. Se colocó un testigo negativo del antígeno con 0.9 ml. de éste y 0.1 ml. de **SSF**, procediendo de la misma manera para el testigo negativo del antisuero. Se incubaron los tubos en baño de agua a 37°C. por espacio de 2 horas. Se realizó la lectura del título, siendo éste el último tubo donde se presentó aglutinación. (15).

3.2.4 IDENTIFICACION SEROLOGICA.

El método de identificación serológica por reacciones de aglutinación consta de dos partes consecutivas: determinación de positividad y determinación del título (15). Esto se llevó a cabo

haciendo reaccionar cada uno de los antisueros de las cepas de referencia internacional con los doce antígenos de las cepas a identificar.

3.2.4.1 PRUEBAS PARA REACCIONES POSITIVAS.

A partir del antisuero de la cepa de referencia internacional se prepararon diluciones de 1:10, 1:20 y 1:40. De cada una de las diluciones se tomó 0.1 ml. colocándose en otra serie de tubos y agregando 0.9 ml. del antígeno de la cepa a identificar que fue diluido simultáneamente al tubo No.3 del Nefelómetro de McFarland. Se colocó un testigo para el antígeno (0.1 ml. de **SSF** + 0.9 ml. de antígeno). Se incubaron los tubos en baño de agua a 37°C por 24 horas, una reacción positiva fue cuando se presentó un contenido claro de un tubo en el fondo del cual había un sedimento flocular, que fácilmente se podía dispersar agitándolo. (15).

3.2.4.2 MEDICION DEL TITULO.

El H-antisuero que reaccionó positivamente se preparó en diluciones al doble hasta la dilución 1:5120. Luego 0.1 ml. de cada dilución se colocó en tubos con pipetas de precisión y se agregó 0.9 ml. de la suspensión de células diluidas del antígeno. Se incluyó un control con **SSF**. Se colocó también un testigo positivo con el antígeno homólogo al antisuero, que tuvo como finalidad servir de patrón para comparar la reacción de los antígenos heterólogos ya que en caso de tratarse de la misma cepa el título sería idéntico al que se presentaría con el antígeno homólogo. (15).

3.2.4.3 TECNICA DE SATURACION CRUZADA, PARA DETERMINAR EL SUBFACTOR ANTIGENICO.

Se produjo bastante antígeno (a) para poder saturar el antisuero (ab) y dejar libre los subfactores (b) en el suero. El antígeno se colocó a una concentración 1:10 con el antisuero. Se dejaron incubar por 2 horas a 37°C.. Se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 minutos para que se precipitaran los aglutinados y con una pipeta Pasteur se recuperó el sobrenadante. Al antisuero saturado (sobrenadante) se le determinó el título con el antígeno de los subfactores (ab) y con el antígeno del subfactor (a). Luego se procedió a cruzarlos con las cepas a identificar.(15).

3.3 SELECCION DE CEPAS.

Se realizó en base a la toxicidad por medio de bioensayos utilizando los insectos blancos: *H.zea* y *S.exigua*. La metodología consistió en activar las cepas, cultivarlas y extraer el complejo espora-cristal con el cual se realizaron los bioensayos.

3.3.1 ACTIVACION DE LAS CEPAS.

Todas las cepas se produjeron en el mismo medio de cultivo y con iguales condiciones. Se sembró en tubos con agar nutritivo y se incubaron por 24 horas a 37°C.. Posteriormente se tomaron dos asadas para inocular un matraz de 250 ml. con el medio de cultivo: Melaza 20g., Harina de soya 20g., Líquido de Remojo de Maíz 10g., CaCO₃ 0.1g., Agua Destilada 1000 ml.. Los matraces se colocaron en un agitador giratorio a 300 r.p.m., a 37°C. por 14-18 horas.

Después se tomó 0.5 ml. para inocular un segundo matraz con el mismo medio y con los mismos parámetros de fermentación por 24-36 horas, hasta que el cultivo formó un 90 % de esporas y cristales. Al término de la fermentación se realizó la extracción del complejo espora-cristal.(64,27).

3.4.2 EXTRACCION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.

Para obtener el complejo espora-cristal se utilizó el método de coprecipitación acetona-lactosa propuesto por Dulmage 1970.

Después de comprobar que el 80% de los cristales estaban libres se procedió a centrifugar, se ajustó el pH a 7 y se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente el sedimento se resuspendió en solución de lactosa al 5% en un volumen correspondiente al 10% del volumen original de la fermentación, agitándose por 30 minutos hasta homogenizar completamente, se le agregó posteriormente cinco volúmenes de acetona, se agitó nuevamente por 30 minutos, se reposó 15 minutos y se filtró al vacío en papel filtro Watman # 1. Se dejó secar durante toda la noche y se molió en un mortero hasta obtener un polvo muy fino, el cual se utilizó en los bioensayos.(20).

3.3.3 BIOENSAYOS.

Para realizar los bioensayos se siguió el procedimiento de bioensayos reportado por Dulmage 1976, para determinar la DL_{50} se realizó lo siguiente: Se preparó una dilución madre al 1% (10,000 ppm), para hacer las diluciones de cada muestra, en una solución amortiguadora fosfato-salina pH 7.0, así como las de una

preparación estandar HD-1-S-1971, de potencia marcada como 16000 **Unidades Internacionales de Potencia (UIP)/mg**. Cada dilución se homogenizó en una licuadora y esto se introdujo en la dieta artificial de Harina de Soya, para completar 100 ml y se distribuyó en 20 recipientes de plástico; después de lo cual, se infestaron con una larva del primer estadio utilizando un pincel. Se utilizaron 20 larvas por dilución, dejándose igual cantidad de larvas como control en las cuales se agregó solamente regulador de la dieta. El total de recipientes fueron incubados a 30°C y una humedad relativa de 50 %; después de 7 días de incubación, los recipientes se removieron del incubador y entonces se observó el porcentaje de muerte para cada dilución. (25).

3.3.4 BIOENSAYOS DE PRUEBA.

Los bioensayos preliminares para determinar el margen de toxicidad aproximada, se realizaron con las siguientes características: Dos dosis iniciales de 50 µg/ml y 500 µg/ml del complejo espora-cristal en la dieta, con cada una de las cepas. Se utilizaron 20 larvas del primer estadio, se hicieron 3 repeticiones y se colocó un testigo para cada repetición y cada dosis. (25).

3.3.5 DETERMINACION DE LA DL₅₀.

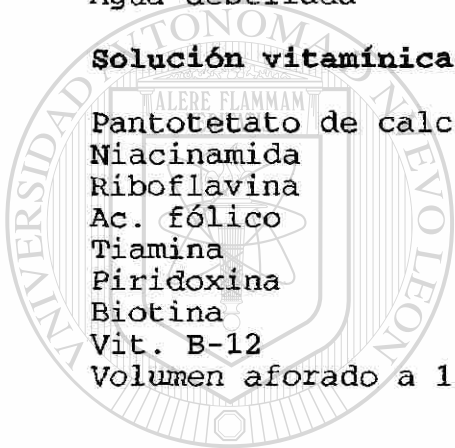
Después que se realizaron los bioensayos preliminares se seleccionó la cepa de *B.thuringiensis* que resultó con una mortalidad mayor al 50%, se utilizaron siete concentraciones,

DIETA DE HARINA DE SOYA.

Harina de soya	- 80	g/l.
Germen de trigo	- 36	g/l.
Sal Wetsson	- 12	g/l.
Sacarosa	- 13	g/l.
Ac. Sórbico	- 1	g/l.
Metil-p-hidroxibenzoato	- 2.2	g/l.
Ac. ascórbico	- 4.8	g/l.
Agar-agar	- 15	g/l.
Cloruro de colina(15%)	- 6.6	ml/l.
Formaldehido(10%)	- 5	ml/l.
Ac. acético(25%)	- 13.3	ml/l.
Solución vitamínica	- 4	ml/l.
Agua destilada	- 1000	ml.

Solución vitamínica.

Pantotetato de calcio	- 12	g/l.
Niacinamida	- 3	g/l.
Riboflavina	- 3	g/l.
Ac. fólico	- 3	g/l.
Tiamina	- 1.5	g/l.
Piridoxina	- 1.5	g/l.
Biotina	- 0.12	g/l.
Vit. B-12	- 25	ml.
Volumen aforado a 1000 ml.		



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

para calcular la DL_{50} . (25). La DL_{50} y las **UIP** de la cepa seleccionada se calculó de la siguiente manera: Se obtuvo el porcentaje de mortalidad corregido para cada repetición en cada dosis. Se utilizó la fórmula de Abbott (1925).

$$Mc = \frac{Mo - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

Mc- % de Mortalidad corregido.

Mt- % de Mortalidad del testigo.

Mo- % de Mortalidad observada.

Se calculó la media de estos porcentajes corregidos y la DL_{50} por medio del análisis estadístico Probit (Finley D.J. 1971), determinando los límites de confianza superior e inferior calculados teóricamente a través de una línea de regresión (29). Por medio de la siguiente fórmula se calculó las **UIP**. (25).

$$\text{Potencia de la muestra (UI/mg)} = \frac{DL_{50} \text{ del } STD \text{ de la muestra}}{DL_{50} \text{ de la muestra}} \times \text{Potencia del STD (UI/mg.)}$$

UI - Unidades Internacionales.

DL_{50} - Dosis Letal Media.

STD - Estándar con una Potencia de 16000

UI/mg.muestra.

3.4 MEDIOS DE CULTIVO.

3.4.1 SELECCION DE MEDIOS DE CULTIVO.

Luego que se seleccionó la cepa más tóxica, esta se dejó crecer en 5 diferentes medios de cultivo, cuya composición en gramos por litro se muestra en la siguiente tabla.

TABLA 3.- Composición de varios medios de cultivo con melaza como única fuente de carbono, que se probaron para la producción del complejo insecticida espora-cristal por *B.thuringiensis*.

INGREDIENTES	CANTIDAD EN GRAMOS/LITRO				
	MEDIOS				
	I	II	III	IV	V
Melaza	20	20	20	20	20
Harina de Pescado	0	10	20	20	10
Harina de Soya	20	10	20	20	10
L.R.M.	10	10	--	10	10
Levadura	--	6	--	6	--
CaCO ₃	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Agua destilada a un litro.					

L.R.M.- Líquido de Remojo de Maíz.

3.4.2 CONDICIONES DE FERMENTACION.

Todas las fermentaciones para seleccionar el medio de cultivo se efectuaron a nivel de matraz Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio de cultivo que se esterilizaron a 15 libras de presión por 15 minutos. Los matraces se inocularon con una asada de un cultivo puro de bacterias crecidas en agar nutritivo inclinado de 24 horas. Se colocaron en un agitador a 300 r.p.m. por 24 horas a 30°C. Una segunda serie de matraces se inocularon con el 0.5 % (V/V) del volumen total de fermentación y se mantuvieron bajo las mismas condiciones.(64).

3.4.3 CINÉTICA DE FERMENTACION.

Durante el transcurso de la fermentación se tomaron muestras de 2 ml. cada 6 horas y se realizaron los siguientes métodos directos e indirectos, para el monitoreo de la cinética:

- **Consumo de azúcares.**- Las muestras tomadas se centrifugaron a 3000 r.p.m./15 min. y del sobrenadante se determinaron los azúcares reductores. Para la determinación de azúcares se utilizó el método DNS, el cual está basado en la intensidad del color formado por la reacción de 3,5 dinitrosalicílico con el azúcar, el cual presenta un máximo de absorvancia que es determinado colorimétricamente a 540 nm.(61).

- **Conteo del número de células viables.**- El método que se utilizó para determinar el número total de células viables se realizó en placas con agar nutritivo.(6).

- **Determinación del pH.**- Se tomó un ml de muestra del cultivo al cual se le agregó 15 ml. de agua destilada ajustada a pH 7.0 y se midió el pH en un potenciómetro.(6).

- **Cuenta de esporas viables.**- De los extractos finales se tomó 50 mg y se distribuyeron homogéneamente en 50 ml de agua destilada estéril, esta solución se pasteurizó a 65°C., durante 10 min. y se procedió a efectuar diluciones desde 10^{-7} hasta 10^{-9} , de las cuales se deposita 1 ml.en una caja estéril la que se le añadió 15 ml de agar nutritivo estéril a pH 7.0 incubándose posteriormente durante 24 horas a 37°C..(6).

- **Actividad tóxica.**- Las esporas y cristales producidos en la fermentación fueron recuperados por el método de Coprecipitación Acetona-Lactosa, descrito por Dulmage(1970), se pesó el extracto

obtenido. Con los extractos se realizaron los bioensayos con la metodología antes descrita.(25).

3.5 EXPERIMENTOS A NIVEL PLANTA PILOTO.

Los resultados que se obtuvieron a nivel de matraces Erlenmeyer se extrapolaron a nivel de fermentador de 40 litros de volumen total. En estos experimentos se utilizó la cepa seleccionada y el medio óptimo con 15 litros de volumen de trabajo. El Fermentador que se utilizó fue **Giovanola P40**, con circulación interna. Este fermentador está diseñado para mejorar la transferencia de oxígeno, para esto se dispone de un cilindro (tubo de circulación). El medio de fermentación es arrastrado de abajo hacia arriba de la cuba y cae en el cilindro. La masa del fluido en movimiento arrastra las burbujas de gas, esto permite aumentar el tiempo de permanencia de la masa líquida y por lo tanto mejora la transferencia de oxígeno. Algunas características técnicas del Fermentador **Giovanola P40**: Es controlado por computadora; está diseñado para llevar un óptimo control del proceso, ya que cuenta con mediciones estándares de: r.p.m., T, pH, aereación, nivel de espuma. Tiene unas dimensiones de diámetro-altura = 1:2.1, una velocidad máxima de 1500 r.p.m. y una aereación máxima de 2 VVM. La regulación automática del pH está entre 2-12.

3.5.1 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION.

A nivel de fermentador se optimizaron las condiciones de fermentación con la cepa seleccionada y el medio seleccionado.

El diseño experimental fué completamente al azar, con un diseño de tratamiento factorial 2x2 con prolongación a F2, lo cual da los siguientes tratamientos:

TABLA 4. Diferentes combinaciones de la aereación y agitación para observar su efecto en la cinética microbiana de *Bacillus thuringiensis*.

PARAMETROS	TRATAMIENTOS					
	I	II	III	IV	V	VI
AGITACION	300	400	500	400	500	600
AEREACION	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.

En todas las fermentaciones se mantuvieron constantes las siguientes condiciones: temperatura 30°C., pH- 7.0, inóculo 1 % (V/V), volumen de trabajo 15 litros

3.5.2 CINETICA DE CRECIMIENTO.

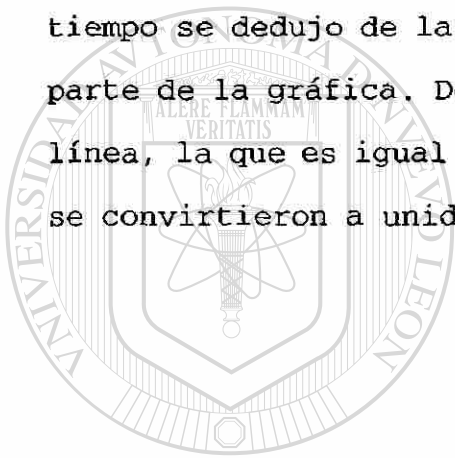
Del fermentador se tomaron muestras de 20 ml cada 4 horas para determinar: consumo de azúcares, conteo de células viables (UFC/ml), cuenta viable de esporas, la toxicidad se determinó por medio de bioensayos con la metodología antes descrita. La producción se determinó por el peso en gramos del complejo espora-cristal por litro de fermento. Los criterios para definir, que condiciones de fermentación son las mejores fueron: Tiempo de duración de la fermentación, Toxicidad, y cantidad de espora-cristal (peso). (64).

3.5.3 MEDICION DEL COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO (K_La).

Para cada tratamiento de agitación y aereación se calculó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno antes de inocular el medio de cultivo en el fermentador. Para la medición del K_La se utilizó el método por sondas polarográficas (Scriban 1985) (56). Con la señal que proporcionan fue posible medir y registrar en forma continua la concentración de oxígeno disuelto o más exactamente la tensión de oxígeno. El electrodo de oxígeno suministra (con una tensión de polarización aplicada) una pequeña corriente eléctrica (de 1 a 100 nA) con intensidad proporcional a la presión parcial del oxígeno en solución. La cabeza del electrodo cuenta con un anodo de Plata, un catodo de Platino y un electrolito entre ambos. Para separar este electrolito del medio en que se quiere medir, este está separado por una membrana delgada de teflón, permeable para gases en solución. La punta del electrodo está compuesta por un cuerpo de vidrio, al cual se plega la membrana. Antes de comenzar con la medición del K_La , se calibró el electrodo de oxígeno bajo condiciones de fermentación (temperatura, agitación, medio de cultivo) dentro del bioreactor y se acomodó el electrodo durante 24 horas en el bioreactor cargado antes de la calibración. (56). Con la ayuda de esta sonda (electrodo de oxígeno) se llevó a cabo la medición del K_La por el método estático (Scriban 1985). El método se condujo en el medio de cultivo en ausencia de células. Nos permitió determinar el valor del K_La en las condiciones en las que se efectuarían las fermentaciones. (56).

Después que se saturó el medio de cultivo con oxígeno disuelto, se detuvo la aereación y se inyectó nitrógeno en el medio. La concentración de oxígeno disuelto disminuyó y su tendencia fue hacia cero. Luego se reemprendió la inyección de aire en las condiciones de producción en que se probaron. La concentración de oxígeno disuelto (CL) aumentó y la forma en que aumentaba dependía la capacidad de transferencia del dispositivo en las condiciones (aereación-agitación) que se experimentaron.(52).

El valor de $K_L a$ de la curva de variación de CL en función del tiempo se dedujo de la gráfica. Se obtuvo una línea recta en una parte de la gráfica. De esta parte se calculó la pendiente de la línea, la que es igual al $K_L a$ con unidades de $S^{-1}(1/s)$, las cuales se convirtieron a unidades Hr^{-1} , multiplicándolas por 3600.(56).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS.

A partir de muestras de suelo, recolectadas en diferentes regiones de Nicaragua se aislaron 12 cepas formadoras de espora y cristal, de acuerdo al criterio de Heimpel 1963, estas cepas pertenecen a *B.thuringiensis*, se les asignó la clave CNPV-Bt del 1 al 12. El lugar de recolección o procedencia y el cultivo del cual fueron aisladas se muestra en el cuadro 1. En la observación microscópica, las cepas en general presentaron características similares: células de forma bacilar con flagelos peritricos en cadenas cortas, cristal en forma bipiramidal y espora ovalada en posición terminal. En su morfología macroscópica las características fueron similares, presentándose colonias de forma irregular, con excepción de las cepas CNPVBt-2 y CNPVBt-12 con forma circular, elevación plana con borde lobulado con filamentos, color crema, consistencia blanda, sin pigmentación, en agar nutritivo, 37°C., por 24 horas.

4.2. IDENTIFICACION SEROLOGICA.

Siguiendo la metodología propuesta por de H. de Barjac 1981, al poner a reaccionar cada uno de los antisueros de las cepas de referencia internacional con los doce antígenos de las cepas a identificar, éstos últimos dieron reacción positiva con los antisueros de las cepas HD-4, correspondientes a la serovariedad *alesti* y HD-21 correspondiente a la serovariedad *kurstaki*. Los resultados se muestran en el cuadro 2. Por lo tanto, se procedió a

determinar el subfactor antigénico con la técnica de saturación cruzada, lo que dió, que todas las cepas fueran identificadas como pertenecientes al serotipo 3a3b var. *kurstaki*. En nuestro trabajo el 100% de las cepas nativas identificadas pertenecen a la var. *kurstaki*, mientras que De Lucca y col. 1981 reportan un 37% del total de cepas recuperadas del suelo en Estados Unidos pertenecientes a esta variedad (17). En el cuadro 3 se presentan los resultados de la saturación del antisuero 3a3b (HD-21) con el antígeno 3a (HD-4) cruzado con las doce cepas nativas.

4.3. SELECCION DE CEPAS.

En el cuadro 4, se muestran las cantidades en g./l. del complejo espora-cristal para cada una de las cepas recuperadas del medio de cultivo por el método acetona-lactosa. Las fermentaciones duraron 48 horas, a éste tiempo se observó al microscopio y habían sido liberadas más del 90 % de las esporas y cristales.

4.3.2. BIOENSAYOS.

Con los extractos obtenidos se montaron los bioensayos preliminares contra los insectos blancos *H.zea* y *S.exigua*. Se encontró que la cepa CNPVBt-12 fue la mejor con una media de los porcentajes de mortalidad corregidos de 46.41 % para 50 µg/ml y 96.49% para 500 µg/ml con una desviación estándar de 7.44 y 6.08 respectivamente, contra el insecto blanco *H.zea*. El resto de las cepas presentaron un porcentaje de mortalidad menor al 30 % con

ambas concentraciones. Los resultados se muestran en el cuadro 5. En el cuadro 6, se presentan los porcentajes de mortalidad, donde se observa que la cepa con una mejor actividad fue también la cepa CNPVbt-12 contra *S.exigua*, con un 39.73 % y 71.93 % de mortalidad en las dosis 50 µg/ml y 500 µg/ml respectivamente. La toxicidad en porcentaje de mortalidad contra los dos insectos-blancos fue muy baja en la mayoría de las cepas. La cepa CNPVbt-12 presentó mayor toxicidad contra el insecto blanco *H.zea* que contra *S.exigua*. Por esta razón en base a los resultados obtenidos en los bioensayos preliminares se seleccionó la cepa CNPVbt-12, que demostró una superior toxicidad al resto de las cepas para los dos insectos blancos. Una vez seleccionada la cepa por su toxicidad contra *H.zea* y *S.exigua* se procedió con el mismo extracto a determinar la DL₅₀ y las Unidades Internacionales de Potencia (UIP/mg). Para los bioensayos con *H.zea* se escogió como dosis menor 30 µg/ml y dosis mayor 500 µg/ml. Contra *S.exigua* quedaron las dosis menor 40 µg/ml y dosis mayor 700 µg/ml. El criterio que se utilizó para determinar éstas dosis es el % de mortalidad en los ensayos preliminares. En el cuadro 7 se muestran los datos para determinar la DL₅₀ de la cepa seleccionada CNPVbt-12 contra el insecto blanco *H.zea*, la cual resultó de 119.05 µg/ml, los límites de confianza para una probabilidad fija de 5 % fueron: límite inferior 102.28; límite superior 138.56. La DL₉₀ fue de 415.17 µg/ml.

En el cuadro 8 se presentan los resultados para determinar la DL₅₀ del estándar HD-1 contra el insecto blanco *H.zea*. La DL₅₀ fue de

136.70 $\mu\text{g/ml}$, los límites de confianza para una probabilidad fija de 5 % fueron: límite inferior 118.45 y límite superior de 157.77. La DL_{90} fue 475.29 $\mu\text{g/ml}$.

En el cuadro 9 se registran los datos de los bioensayos de la cepa CNPVBt-12 contra el insecto blanco *S.exigua*, para determinar que la DL_{50} fue de 179.85 $\mu\text{g/ml}$ con un límite de confianza inferior (probabilidad 5 %) de 151.53 y el superior de 213.46375 y una DL_{90} de 869.43 $\mu\text{g/ml}$.

En el cuadro 10 se aprecian los datos de los bioensayos del estándar (HD-1) contra el insecto blanco *S.exigua*, resultando una DL_{50} de 163.86 $\mu\text{g/ml}$ con límites de confianza al 5% de probabilidad de 140.85 y 190.63 para el inferior y superior respectivamente, con una DL_{90} de 596.03 $\mu\text{g/ml}$.

Utilizando la fórmula previamente citada se determinaron las Unidades Internacionales de Potencia. Para la cepa CNPVBt-12 contra *H.zea* resultó ser de 18,373 UIP/mg. Contra *S.exigua* fue de 14,577 UIP/mg. Al igual que los bioensayos preliminares la cepa seleccionada CNPVBt-12, presentó mayor toxicidad contra *H.zea* que contra *S.exigua*. La cepa presentó 2373 UIP/mg de extracto mas que el estándar HD-1 contra el insecto blanco *H.zea*, con respecto al insecto blanco *S.exigua* presentó 1823 UIP/mg de extracto menos que el estándar HD-1. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Krywienczyk et al 1978, los cuales demostraron que un mismo serotipo puede tener diferente toxicidad contra varias especies de insectos. Ellos sugieren que el serotipo 3a3b puede ser separado en

dos subgrupos (patovariedades) designados como K-1 y K-73, contra *T.ni* y *H.virescens* respectivamente.(41). Esto también se confirmó por lo publicado por Jaquet en 1987 en donde encuentra deferente actividad específica del cristal protéico entre cepas de *B.thuringiensis* de la misma subespecie *kurstaki*.(36). Es importante señalar que las cepas al ser evaluadas deben ser del mayor número posible para poder encontrar y seleccionar al menos una cepa con capacidad entomopatógena hacia los insectos blancos de importancia agrícola.

4.4 MEDIOS DE CULTIVO.

Después que se seleccionó la cepa más tóxica contra los insectos blanco *H.zea* y *S.exigua* se procedió a la selección del medio de cultivo.

En la figura 1 se observa que el tiempo de fermentación (liberación del 90 % de las esporas) en los medios II y IV fue de 36 horas, en el resto fue de 48 horas. En la misma figura se observa el ln del número de esporas viables, el cual fue mayor en los medios II, IV y V.

En la figura 2 se muestra el % de mortalidad de *S.exigua* y *H.zea* con la cepa seleccionada CNPVBt-12 en los 5 medios de cultivo. La mayor mortalidad contra los dos insectos blancos se presentó en el medio II. Para determinar el % de mortalidad se escogió la dosis 500 µg/ml.

En el cuadro 11 se muestra el Análisis de Varianza y la prueba de

rango múltiple de Duncan, para los bioensayos con *H.zea* la cual dió los siguientes resultados: el mejor medio para cultivar la cepa CNPVBt-12 con respecto al % de mortalidad fue el medio II, aunque no hay diferencia significativa con los medios IV y V, siendo significativamente diferente de los medios I y III. El Análisis de Varianza con respecto al insecto blanco *S.exigua*, no detectó diferencia.

En las condiciones de fermentación descritas anteriormente se graficaron las cinéticas de crecimiento con los datos que se obtuvieron de las fermentaciones de la cepa seleccionada CNPVBt-12 en los 5 medios de cultivo. Los ingredientes de los medios de cultivo se muestran en la tabla 3.

En la figura 3 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa CNPVBt-12 en el medio I. La fase de crecimiento logarítmico comienza a las 12 horas de iniciada la fermentación, la cual concluye a las 24 horas. El punto máximo en la curva esta entre las 24 horas y 30 horas con una cantidad de células UFC/ml. de 6.68

$\times 10^8$. El consumo de azúcares comienza con el crecimiento de la cepa, continuando hasta casi agotarse a las 36 horas, la liberación del 90 % de las esporas se dió a las 48 horas.

Figura 4, se presenta la cinética de crecimiento de la cepa CNPVBt-12 en el medio II. La cepa comienza su fase de crecimiento logarítmico a las 6 horas, concluyendo ésta fase a las 18 horas, con un punto máximo a ésta hora, con 8.84×10^8 células-UFC, el consumo de azúcares comienza con el crecimiento de la cepa,

concluyendo a las 30 horas, la liberación casi total de esporas se da a las 36 horas.

Figura 5, en la cinética de crecimiento de la cepa CNPVbt-12 en el medio III se observa lo siguiente: la cepa comienza a crecer logarítmicamente a las 6 horas concluyendo ésta fase a las 18 horas con 5.36×10^8 células-UFC, aunque la fase estacionaria se alarga desde ésta hora hasta las 48 horas, que fue cuando hubo un 90 % de liberación de esporas. En la línea que muestra el consumo de azúcares se aprecia que el consumo baja marcadamente hasta que finaliza la fase logarítmica, manteniéndose luego estable, hasta casi agotarse después de las 42 horas.

La figura 6 nos muestra la cinética de crecimiento y el consumo de azúcares en el medio IV. El crecimiento exponencial comienza a las 6 horas, concluyendo a las 18 horas con una cantidad de células-UFC de 5.5×10^8 , las cuales liberaron sus esporas en un 90 % a las 36 horas. En la figura 7 se muestra un comportamiento similar de la cepa CNPVbt-12 en el medio V al del medio IV. El punto máximo en la curva de crecimiento fue de 5.4×10^8 células-UFC.

En base a los resultados obtenidos con los parámetros; tiempo de fermentación, cantidad de esporas viables y % de mortalidad, el medio de cultivo que mejor se comportó fue el medio II.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Dulmage 1971, quién demostró que la cantidad de δ -endotoxina producida por los aislados, varía ampliamente dependiendo del aislado y medio de

cultivo sobre el cual crece, algunos aislados del mismo serotipo producen diferentes actividades insecticidas, cuando se cultivan en medios diferentes.(22).

4.5 EXPERIMENTOS A NIVEL PLANTA PILOTO. BIOREACTOR GIOVANOLA P40.

Con la cepa seleccionada CNPVBt-12 y el medio de cultivo seleccionado se realizaron los experimentos a nivel planta semipiloto.

En la figura 8 se presenta la cinética de crecimiento de la cepa seleccionada CNPVBt-12, con agitación 300 r.p.m. y aereación 0.5 VVM. La fermentación duró 48 horas, comenzando el crecimiento logarítmico a las 12 horas, con un punto máximo en la curva de crecimiento de 15×10^8 células-UFC. El consumo de azúcares comenzó a decrecer antes de las 16 horas y llega casi a cero a las 40 horas.

El tratamiento de agitación/aereación 400 r.p.m./0.5 VVM, figura 9, presentó un mejor comportamiento. La fermentación duró 42 horas y el crecimiento exponencial comenzó a las 8 horas, con un punto máximo de 15×10^8 células-UFC. La curva de consumo de azúcares decrece marcadamente a partir de las 12 horas y se mantiene muy baja hasta el final de la fermentación.

En la figura 10, se observa el crecimiento de la cepa CNPVBt-12, en el tratamiento 500 r.p.m./0.5 VVM, comenzando a las 8 horas y concluyendo la fermentación a las 36 horas. El punto máximo en la curva de crecimiento fue 1.9×10^8 células-UFC.

En la figura 11, se muestra la cinética que se obtuvo en el tratamiento 400 r.p.m. y 1 VVM. La fase logarítmica comienza a las 8 horas. La fermentación duró 38 horas. Con un punto máximo de 17×10^8 células-UFC. En el tratamiento 500 r.p.m./1 VVM, figura 12, el crecimiento exponencial comienza a las 4 horas, durando la fermentación 4 horas menos que la anterior.

En la figura 13, se observa el mejor crecimiento de la cepa CNPVBt-12, comenzando la fase exponencial a las 4 horas y concluyendo la fermentación a las 26 horas. El punto máximo de la curva fue de 45×10^8 células-UFC.

La medición del $K_L a$ (Hr^{-1}), para las diferentes tratamientos de agitación-aereación, se muestran en la fig.14. Se observa que en general el coeficiente de transferencia de oxígeno fue mayor a 1 VVM. La tendencia a los dos niveles de aereación es a ser mayor el $K_L a$ a medida que aumenta la agitación.

En el cuadro 12, se observa que la toxicidad de la cepa CNPVBt-12 se ve afectada por el nivel de transferencia de oxígeno. La mayor toxicidad se presentó en el tratamiento VI, que corresponde a la combinación 600 r.p.m./1 VVM.

A medida que se aumenta la transferencia de oxígeno se aumenta la toxicidad. Tomando en cuenta los datos de la tabla 13 se puede decir que al haber una mayor disponibilidad de oxígeno la producción del complejo espora-cristal es mayor, infiriendo esto también en la toxicidad. En el mismo cuadro se presentan también los datos obtenidos de la medición de diferentes parámetros de

fermentación, los que tuvieron una relación directa con los tratamientos que se experimentaron. En general el mejor tratamiento (aereación/agitación) fue 600 r.p.m./1.0 VVM, en el cual el tiempo de fermentación fue 26 horas, con un rendimiento de 18 g. de esporas cristales por litro de medio de cultivo, un K_La de 237.98Hr^{-1} y una toxicidad de 80 % contra *H.zea* a $500\ \mu\text{g/ml}$.

De los datos presentados en esta investigación, observamos que conforme aumentan la r.p.m. y la aereación (por ende la velocidad de transferencia de oxígeno) aumentan: el K_La , esporas-cristales, UFC/ml y la cuenta de esporas viables/ml total. Esto concuerda con lo reportado con la literatura por Luthy et al (38), quienes sugieren que el crecimiento y esporulación del organismo son maximizados por altos niveles de aereación a temperaturas de 28 a 32°C . Así mismo el tiempo de fermentación es reducido de 48 horas a 26 horas en la combinación 600 r.p.m./1.0 VVM, esto es debido principalmente a el aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno, lo cual nos indica que el sistema tiene limitación por oxígeno. De lo observado en nuestros datos vemos que hay una relación directa entre K_La y los diferentes parámetros evaluados.®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V. CONCLUSIONES.

1.- Se aislaron 12 cepas de *B.thuringiensis*, a partir de muestras de suelo recolectadas en diferentes regiones de Nicaragua, a las que se les asignó la clave CNPVBt del 1 al 12.

2.- De acuerdo a las observaciones macroscópicas, microscópicas y la identificación serológica, las doce cepas nativas, se identificaron como *B.thuringiensis* var. *kurstaki*, serotipo 3a3b.

3.- La cepa CNPVBt-12, fue la mejor con una media de los porcentajes de mortalidad corregido de 46.41% para 50 µg/ml y 96.49% para 500 µg/ml, contra el insecto blanco *H.zea*.

4.- La cepa CNPVBt-12, también fue la mejor con una media de los porcentajes de mortalidad corregidos de 39.73 para 50 µg/ml y 71.93% de mortalidad para 500 µg/ml contra el insecto blanco *S.exigua*.

5.- La cepa CNPVBt-12 presentó mejor toxicidad contra el insecto blanco *H.zea* que contra *S.exigua*.

6.- La DL_{50} de la cepa CNPVBt-12 contra el insecto blanco *H.zea*, resultó ser de 119.04838 ppm. Las Unidades Internacionales de Potencia utilizando el standard (HD-1), fueron: 18373 UIP/mg.

7.- La DL_{50} de la cepa CNPVBt-12 contra el insecto blanco *S.exigua* resultó ser de: 179.85091 ppm. Las Unidades Internacionales de Potencia en este caso fueron: 14577 UIP/mg.

8.- En base a los resultados obtenidos con los parámetros: tiempo de fermentación, cantidad de esporas viables y % de mortalidad, el medio de cultivo que mejor se comportó fue el medio II el cual contiene los siguientes ingredientes: Melaza 20 g.; Harina de pescado 10 g.; Harina de soya 10 g.; Líquido de remojo de maíz 10 g.; levadura 6 g.; $CaCO_3$ 0.1 g., todos en gramos por litro de medio de cultivo.

9.- El mejor tratamiento fue la combinación aereación/agitación 600 r.p.m./1 VVM, en la cual la fermentación duró 26 horas, se obtuvo un alto rendimiento de 18 gramos de esporas-cristales por litro de medio de cultivo, un K_La de 237.98 Hr^{-1} y una toxicidad de 80 % contra *H.zea* a 500 $\mu\text{g/ml}$.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

10.- El rendimiento de la cepa seleccionada CNPVBt-12 en gramos de esporas y cristales por litro de medio de cultivo aumentan conforme la transferencia de oxígeno (K_La) es mayor.

LITERATURA CITADA

1.- Andrew, W. y Burges, H.D., 1979. Ecology of *B.thuringiensis* in soil. J. Invertebr. Pathol. 4:319-324.

2.- Andrew, R.E., Bulla, L.E. 1981. Toxins of sporeforming bacteria. Amer. Soc. Microbiol. Spores 8:57-63.

3.- Ang, B.J., Nickerson, K.W. 1978. Purification of the protein crystal from *B.thuringiensis* by zonal gradient centrifugation, Appl. Environ. Microbiol. 36:625-628.

4.- Batista, S.A. 1986. Control Microbiano de Insectos. Edit. Manole Ltda. San Paulo, Brazil. pp.407.

5.- Beegle, C.C. 1979. Use of entomogeneous Bacteria in Agroecosistemas. Symposium: Control of Insects, Mites and Weeds with microorganisms, 20:97-104.

6.- Benson, J.H. 1980. Microbiological applications; a laboratory manual in general microbiology. W.C. Brown Company Publ. Dubuque, Iowa. USA. 3rd Ed. pp.297.

7.- Brock, T.D. 1978. Biología de los microorganismos. Relaciones huésped-parásito. Exotoxinas. Ed. Omega S.A. Barcelona. España 2da. Ed. pp.774.

8.- Bulla, L.A.Jr., Julian, G., y Rhodes, R.A. 1971. Physiology of spore-forming bacteria associated with insects. III. Radiorespirometry of pyruvate, acetate, succinate, and glutamate oxidation, Can. J. Microbiol. 17:1073.

9.- Burgerjon, A., y Dulmage, H.T. 1977. Industrial and International standardization of Microbial Pesticides- I. *B.thuringiensis*. Entomophaga 22:121-129.

10.- Couch, T.L., y Ross, D.A. 1980. Production and utilization of *B.thuringiensis*. Biotechnology and Bioengineering. 22:1297-1304.

11.- Daoust, R.A. 1990. Comercialization of Bacterial Insecticides. Vth. International Colloquim on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Society for Invertebrate Pathology. Adelaide, Australia. pp.37.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

12.- Deacon, J.W. 1983. Microbial Control of Plant Pest and Diseases. Aspect of Microbiology. Amer. Soc. for Microbiology, Washinton D.C., U.S.A. 7:1-42.

13.- De Barjac, H., y Bonnefoi, A. 1962. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *B.thuringiensis*. Entomophaga, 1:5-31.

14.- De Barjac, H., André, M., y Prévot, R. 1978. Una nouvelle

variedad de *B.thuringiensis*, tres toxique puor les mostiques:
B.thuringiensis var. *israelensis*, serotype 14.C.R. Acad.
Sc.Paris, t. 286.

15.- De Barjac, H. 1981. Identification of H-serotypes of
B.thuringiensis. En: Microbial Control of pest and plant
diseases, 1970-1980, Burges, H.D., (ed.) Academic Press, London,
35.

16.- De Barjac, H., y Franchon, E. 1990. Classification of
B.thuringiensis strain. Entomophaga 35:233-240.

17.- De Lucca, A.J., Simonson, J.G. y Larson, A.D. 1981
B.thuringiensis distribution in soil of the United State.
Can.J.Microbiol. 27:865-870.

18.- Dubois, N.R. 1968. Laboratory batch Production of
B.thuringiensis spores and crystals. Appl. Microbiol.. 16:1098-
1099.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

19.- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new
isolate of *B.thuringiensis* var. *alesti*. J.Invertebr. Pathol.,
15:232.

20.- Dulmage, H.T., Corea, J.A., y Martínez, A.J. 1970.
Coprecipitation with lactose a means of recovering the spore
crystal complex of *B.thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 15:15-
20.

21.- Dulmage, H.T. 1970. Production of the spore δ -endotoxin complex by variants of *B.thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol.16: 385-389.

22.- Dulmage, H.T. 1971. Production of δ -endotoxin isolates of *B.thuringiensis* setotip 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. 217:187-199.

24.- Dulmage, H.T., y de Barjac, H. 1973. HD-187, a New Isolate of *B.thuringiensis* that produce High Yields of δ -endotoxin. J. Invertebr. Pathol. 22:273-277.

25.- Dulmage, H.T. 1976. Bioassay of *B.thuringiensis* δ -endotoxin using the tobacco budworm. Tecn. Bulletin No. 1528. US Dept. of Agricult. Brownsville, Texas. U.S.A. 1-15.

26.- Dulmage, H.T. y Burgerjon, A. 1977. Industrial and International standardization of Microbial Pesticides. I. *B.thuringiensis*. Entomophaga, 22:121- 129.

27.- Dulmage, H.T. 1989. Production and use of *B.thuringiensis* perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 84:113-122.

28.- Egorov, N.S., Loriya, Zh. K., y Yudina, T.G. 1984. Influence of amino acids of the synthesis of exoprotease by *B.thuringiensis*, Appl. Biochem. Microbiol., 19:481.

29.- Finley, D.J. 1971. Probit analysis. 3 rd. ed. Cambridge University. Press. Cambridge, England.

30.- Goldberg, J., Sneh, B., Battat, E., y Klein, D. 1980. Optimization of a Medium for High Yield Production of spore-crystal preparation of *B.thuringiensis* against the egyptian cotton leaf worm. *Spodoptera littoralis* Boisd. Biotechnology letters. 2:419-426.

31.- Heimpel, A.M., y Angus, T.A. 1959. The site of Action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larval J. of Insect. Path. 1:152-170.

32.- Heimpel, A.M. 1963. A critical review of *B.thuringiensis* var. *thuringiensis* berliner and other crystalliferous bacteria® ann. Rev. Entomol. 12:287-321.

33.- Herrnstadt, C., Soares, G.G., Wilcox, E.R., y Edward, D. 1986. A new strain of *B.thuringiensis* with activity against Coleopteran Insects Biotechnology 4:305-308.

34.- Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houstven, A., Vanderbruggen, H., y Vaeck, M. 1988. Monoclonal antibody analysis

o

and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticide crystal proteins of *B.thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2010-2017.

35.- Huang, H.T., Shapiro, M. 1971. Insecticidal activity of Microbial Metabolites. En: Progress in Industrial Microbiology. J. and A. Churchill (eds). London. 9:79-112.

36.- Jaquet, F., Hutter, R. y Luthy P. 1987. Specificity of *B.thuringiensis* δ -endotoxin. Appl.Environ.Microbiol. 53:500-504.

37.- Khachatourians, G.G. 1986. Production and use of biological pest control agents. Tibtech. 4:120-126.

38.- Krieg, A. 1980. The prokaryotes. Springer-Verlag. 2:1743-1755.

39.- Krieg, A., Huger, A.M, Langenbruch, G.A. y Schnetter, W. 1984. Neue ergebniss uber *B.thuringiensis* var. *tenebrionis* inter besonderer Berncksichtigny seiner wirkung anf den kartofel kafer (*Leptinotarsa decemlineata*) ang. Schadhingskde, Pflanzenschutz, Umwestschutz 57:145-150.

40.- Krieg, a., y Miltenburger, H.G. 1984. Bioinsecticides: *B.thuringiensis* adv. in Biotechnological Processes 3:273-290.

41.- Krywiencyk, J. Dulmage, H.T., y Fast, P.G. 1978.

Occurrence of two serologically distinct groups within *B.thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. 31:372-375.

42.- Luthy, P. y Ebersold, H.R. 1981. The entomocidal toxins of *B.thuringiensis*. Pharmac ther Pergamon Press. Great Britain. 13:257-2883.

43.- Luthy, P. Cordier, J.L., y Fischer, H.N. 1982. *B.thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application in Microbial and Viral Pesticides, Kurstak, E. Ed. Marcel. Dekker, New York, New York, 2:35-74.

44.- McGregor, R. y Gutiérrez, O. 1983. Guía de insectos nocivos para la agricultura en México. Edit. Alhambra Mexicana, México, 17-42.

45.- Medrano, R.H., Solís, S.A., Pérez, O.C., Hayakawa, M.A., Lerma, R.S., Córdova, A.V. García, G.C., y Galán, W.L. 1990. Some bioengineering aspects on the bioinsecticides production and its application against insect pest maize at experimental field level. Food and Engin. Els. Pub. 3:1-8.

46.- Metcalf, C.L. y Flint, W.P. 1984. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control. 16a Ed. C.E.C.S.A. México. pp.1208.

47. Munro, R.E. 1961. Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of *B.thuringiensis*, *Biochem. J.*, 81:225.

48.- Nickerson, K.W. y Bulla, L.A. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *B.thuringiensis*. *Appl. Microbiol.*, 28:124.

49.- Pendleton, J.A. 1969. Insecticides of crystal forming bacteria process biochemistry. pp. 29-32.

50.- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, Sept. pp.711-753.

51.- Quintero, R.R. 1981. Ingeniería Bioquímica. Escalamiento de fermentaciones. 1ra Ed., Ed. Alhambra. México D.F., México.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

52.- Rajalakshmi, S., y Shethna, Y.I. 1977. The effect of aminoacids on growth, sporulation and crystal formation in *B.thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Indian Inst. Sci.*, 59:169.

53.- Rodríguez, P.C., Galán, W.L., de Barjac, H., Román, C.E., Taméz, G.R., Dulmage, H.T. 1990. *B.thuringiensis* subspecies *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *J.Invertebr.Pathol.* 56:280-282.

54.- Rogoff, M.H. 1966. Crystal forming bacteria as insect pathogens Adv. Appl. Microbiol. 8:291.

55.- Rowe, G.E., y Margaritis, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *B.thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 6:87-127.

56.- Scriban, R. 1985. Bioingeniería. Biotecnología. El Manual Moderno. 2da.(ed). México,D.F..pp. 651.

57.- Sherrer, P., Luthy, P., y Trumpy, B. 1973. Production of delta-endotoxin by *B.thuringiensis* as a Appl. Microbiol. 25:644-646.

58.- Smith, R.A., y Couche, G.A. 1991. The phylloplane as a source of *B.thuringiensis* variants. Appl. Envir. Microbiol. Jan. pp. 311-315.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
59.- Solama, H.S., Foda, M.S., Dulmage, H.T. y El Sharaby, A.®
1981. Novel fermentation media for production of δ -endotoxin from *B.thuringiensis*. J.Inv.Path. 1:26.

60.- Stamburry, P.F. y Whitaker, A. 1984. Principles of fermentation technology, Pergamon Press, Oxford v.k. 169-192.

61.- Summer, J.B. 1924. Method 3,5 DNS Acid; J.Biol.Chem. 62:287.

62.- Tianjian, X., Biugao, H. Liansen, Z., Gixin, W. 1990. Comercial production and application of *B.thuringiensis* insecticide in China. Vth. International colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Soc. for Inv. Pathology. Adelaide, Australia. pp.37.

63.- Tobey, J.F., y Yousten, A.A. 1976. Factors affecting the production of amylasa by *B.thuringiensis*. Dev. Ind. Microbiol. 18:499.

64.- Vandekar, M. y Dulmage, H.T. 1982. Guidelains for production of *B.thuringiensis* H-14; Public by UNDP/World Banck/WHO Genova, Switzerland.

65.- Wakisaka, Y., Masaki, E., y Nishimoto, Y. 1982. Formation of crystalline δ -endotoxina or poly-beta-hidroxibutiric acid granules by asporogenous mutants of *B.thuringiensis*. Appl. Microbiol. 43:1473-1480.

66.- Young, I.E., y Fitz-James, P.C. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal proteín formation in *B.thuringiensis* var. *alesti*, J. Biophys. Biochem. Cytol. 6:4823.

Fig.1. TIEMPO DE FERMENTACION Y ESPORAS VIABLES, CEPA CNPVBt-12, EN 5 MEDIOS DE CULTIVO

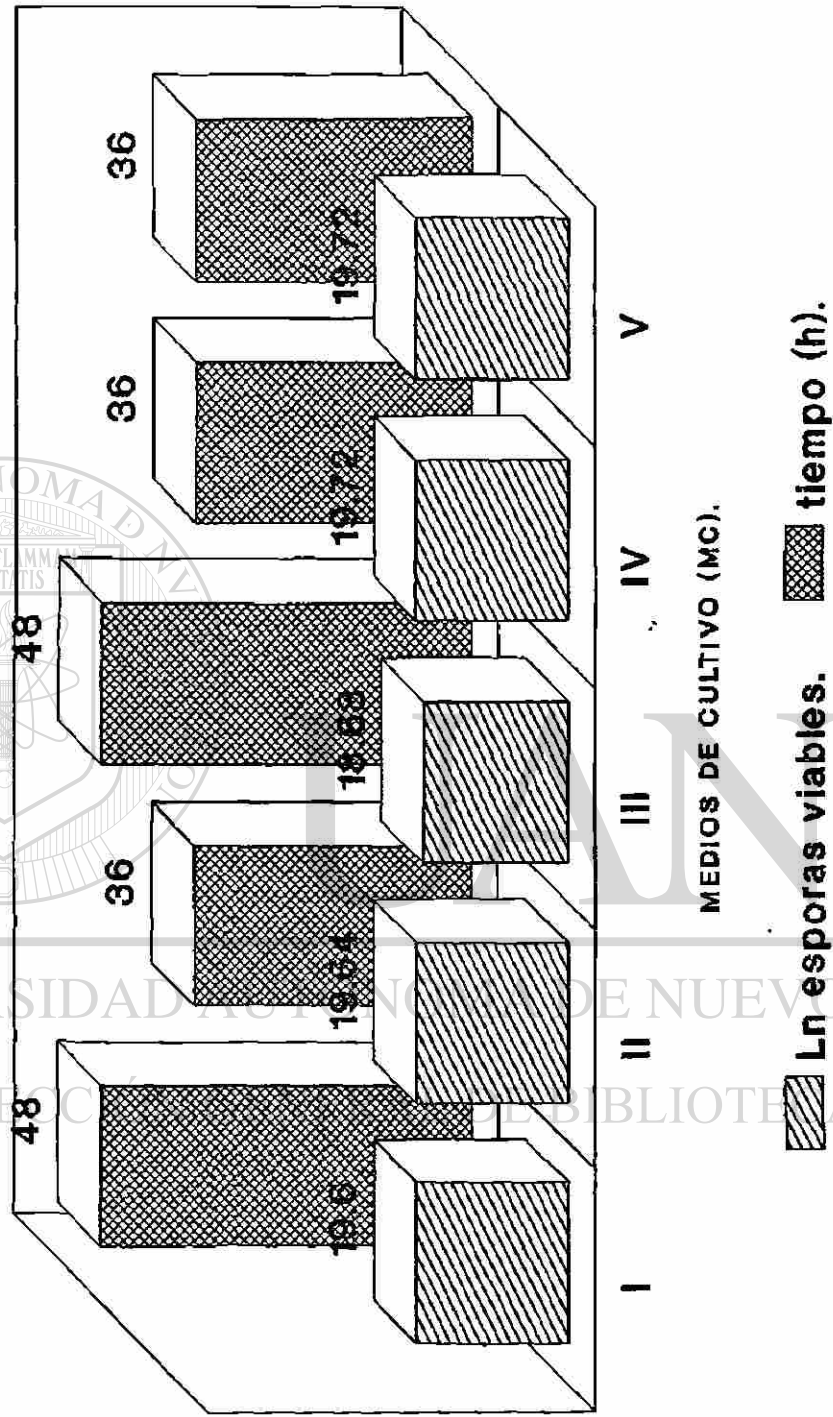
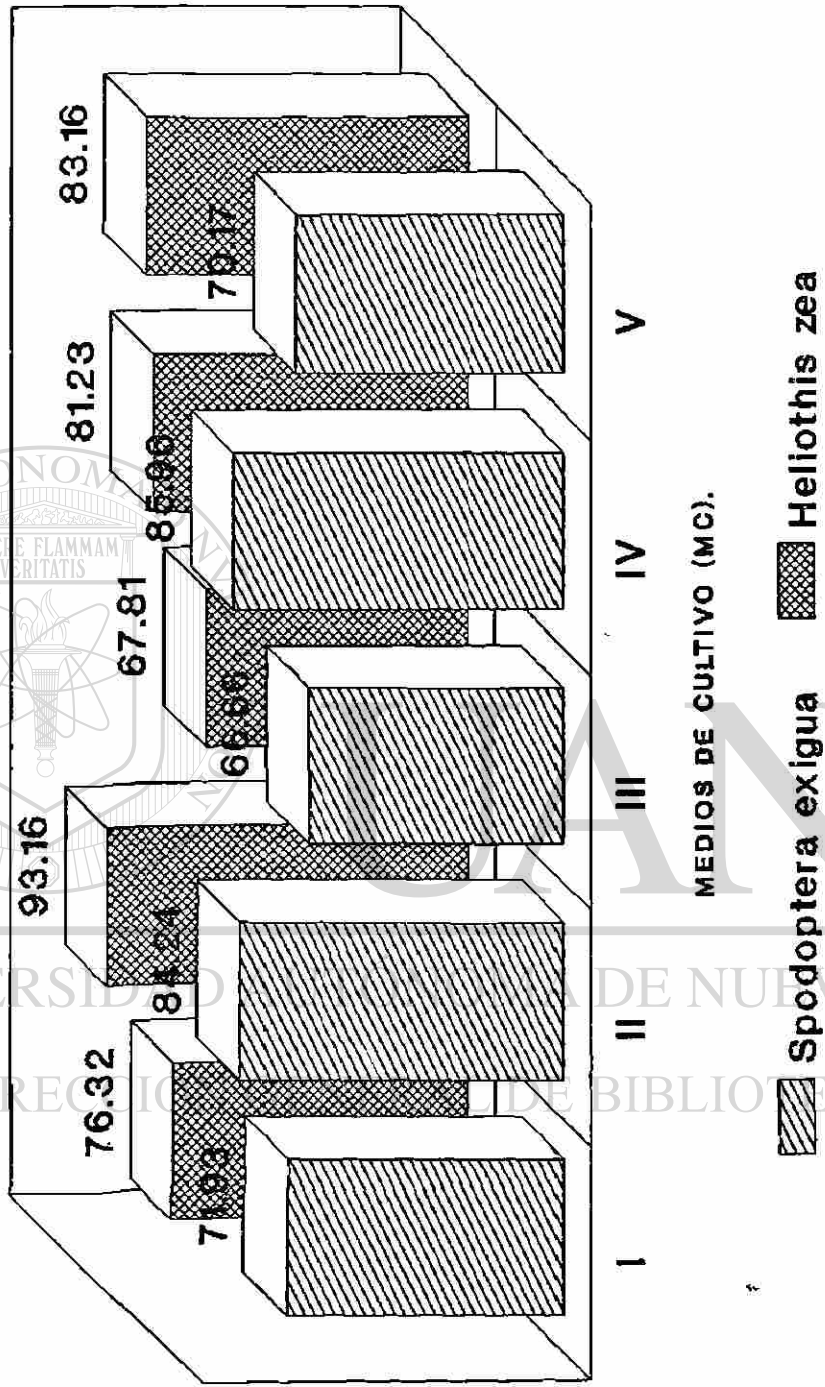


Fig.2. COMPARACION DEL % DE MORTALIDAD DE *Spodoptera exigua* y *Heliothis zea* CEPA CNPVβt-12, EN 5 MEDIOS DE CULTIVO



UNIVERSIDAD DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS

**Fig.3. CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO
DE AZUCARES DE *Bacillus thuringiensis*
CEPA CNPVBt-12, MEDIO I.**

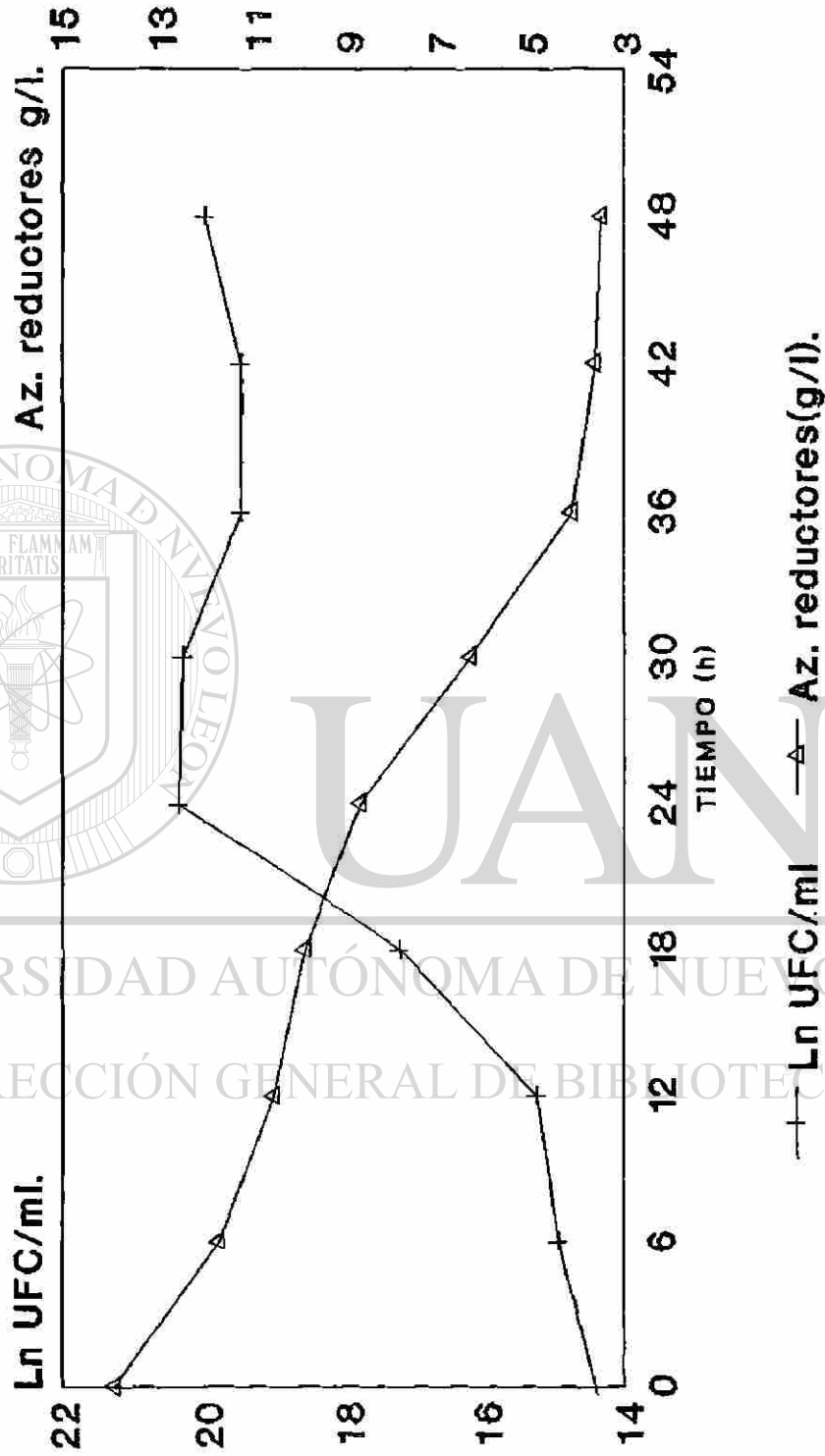


Fig.4. CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES DE *Bacillus thuringiensis* CEPA CNPVBt-12, MEDIO II.

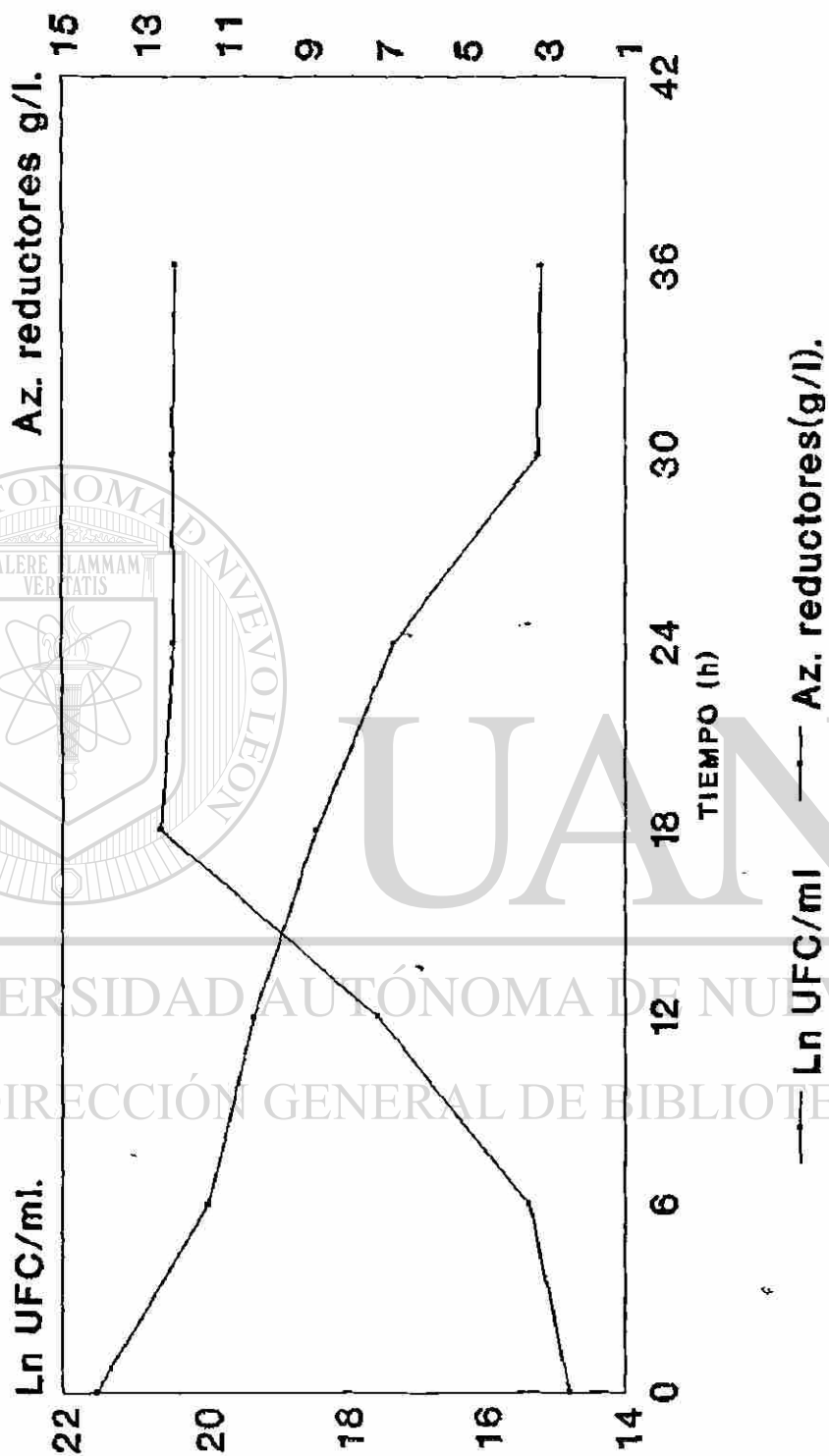
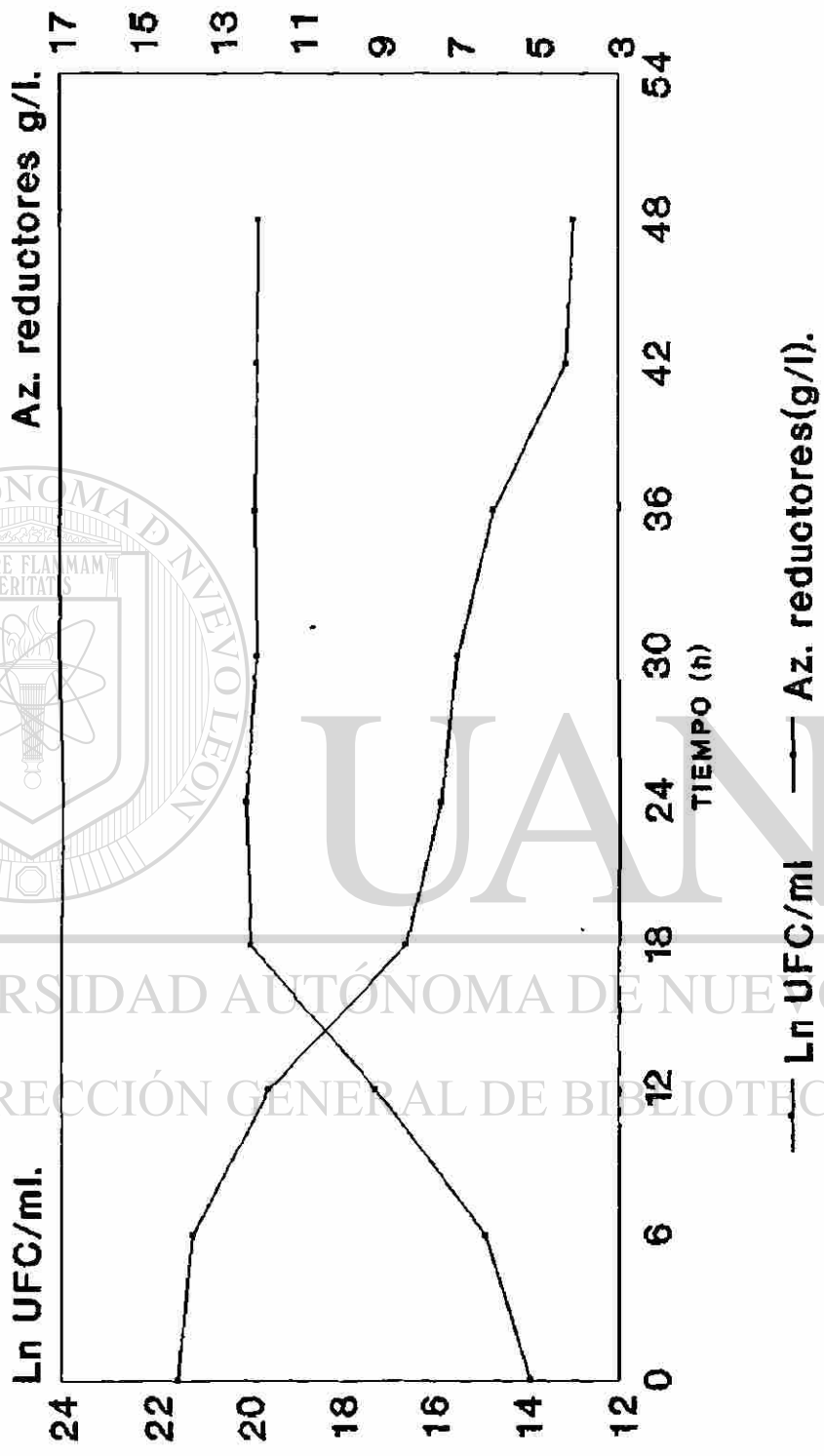


Fig.5. CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES DE *Bacillus thuringiensis* CEPA CNPVBt-12, MEDIO III.



**Fig.6. CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO
DE AZUCARES DE *Bacillus thuringiensis*
CEPA CNPVBt-12, MEDIO IV.**

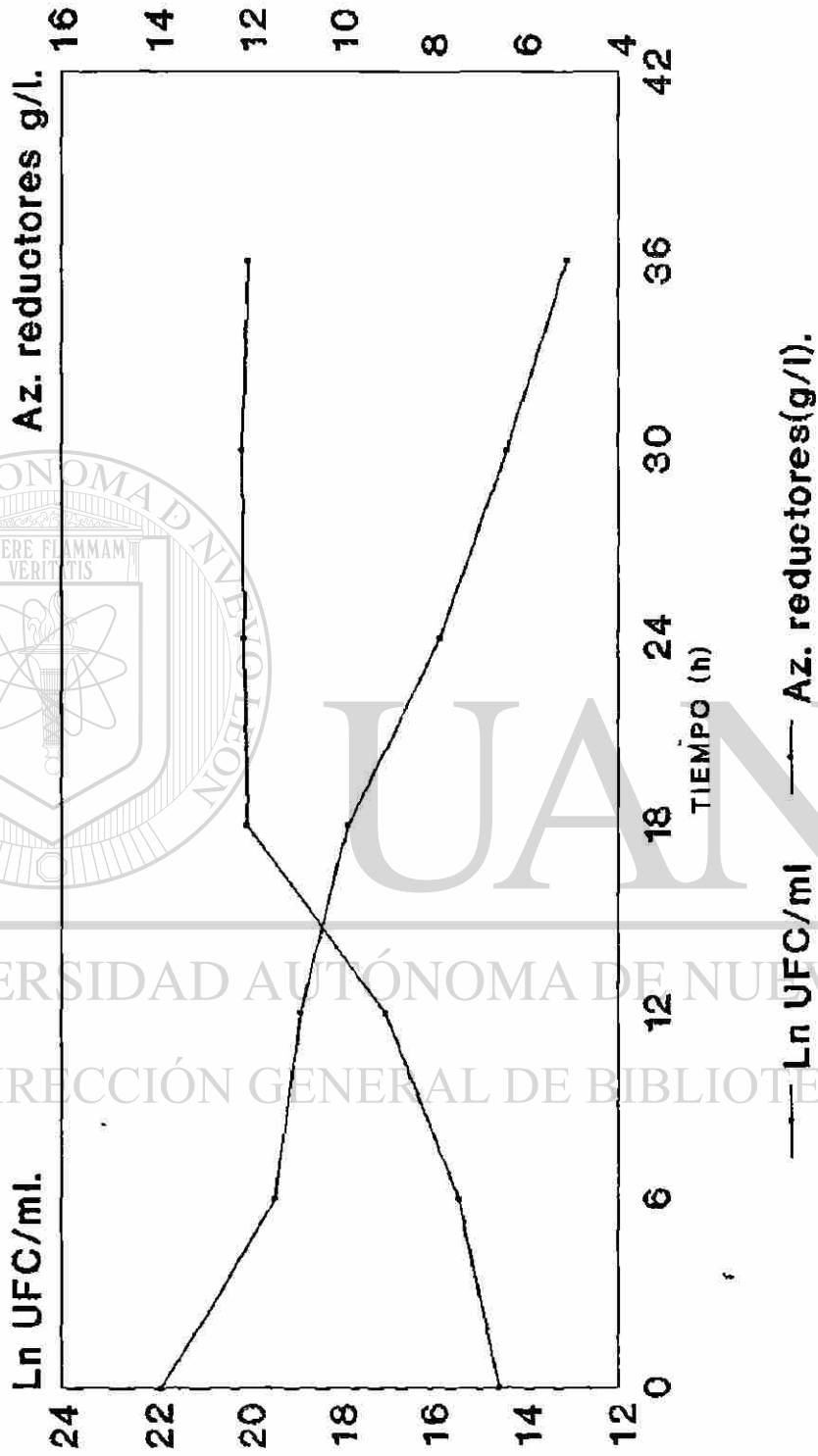
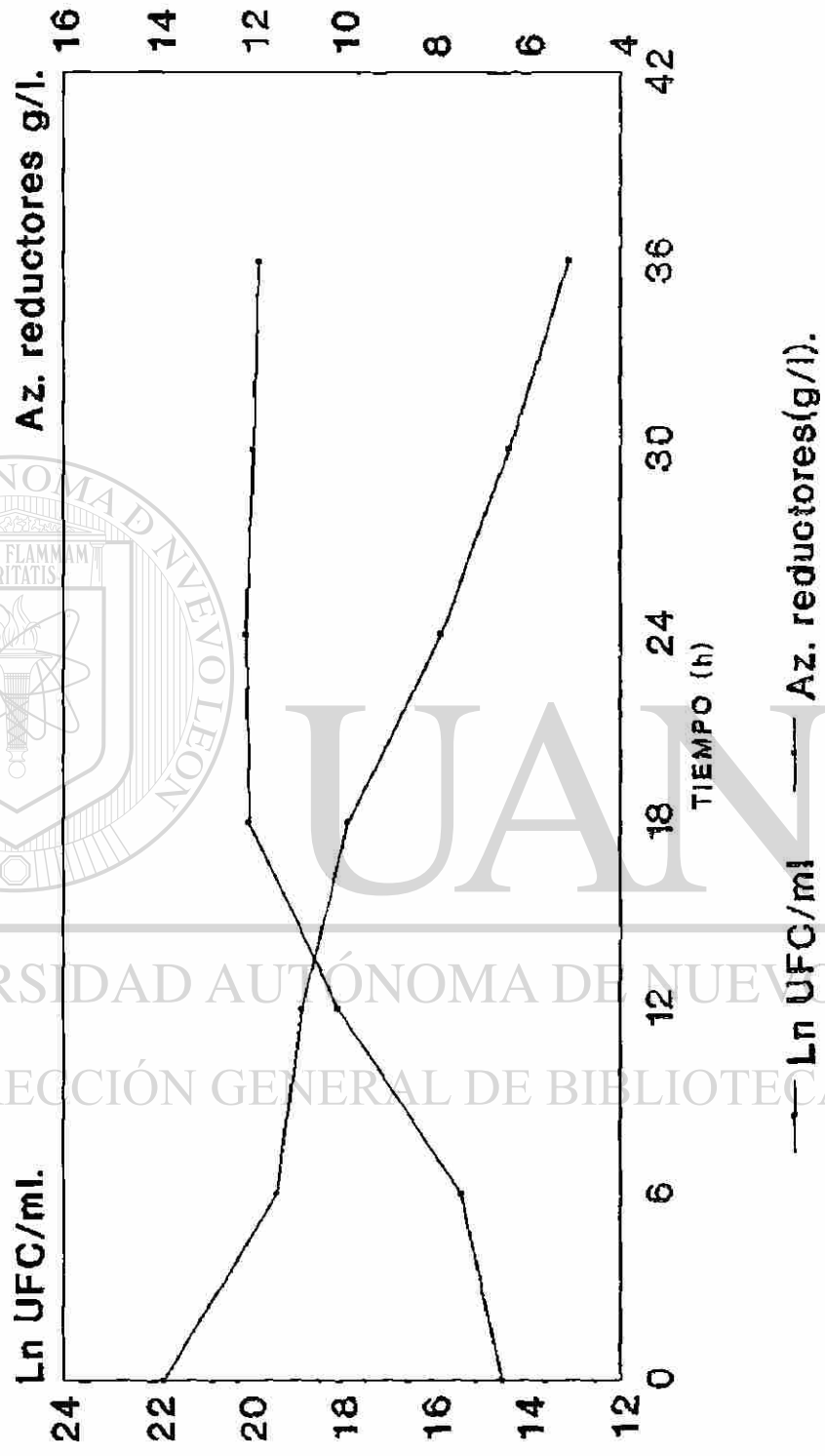


Fig.7. CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES DE *Bacillus thuringiensis* CEPA CNPVBt-12, MEDIO V.



**Fig.8. CINETICA DE CRECIMIENTO DE
Bacillus thuringiensis
 AGITACION 300 rpm, AERACION 0.5 VVM**

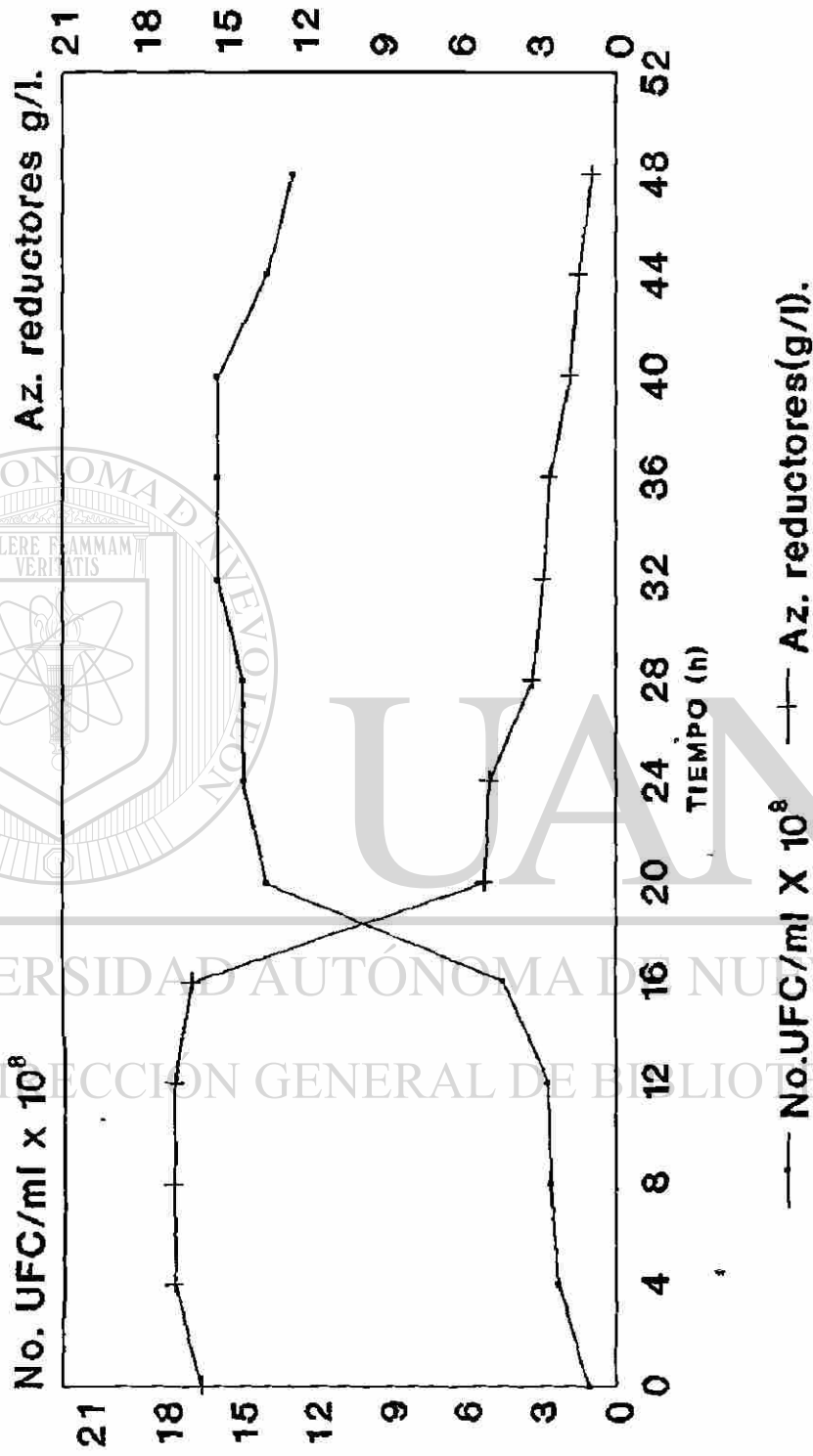
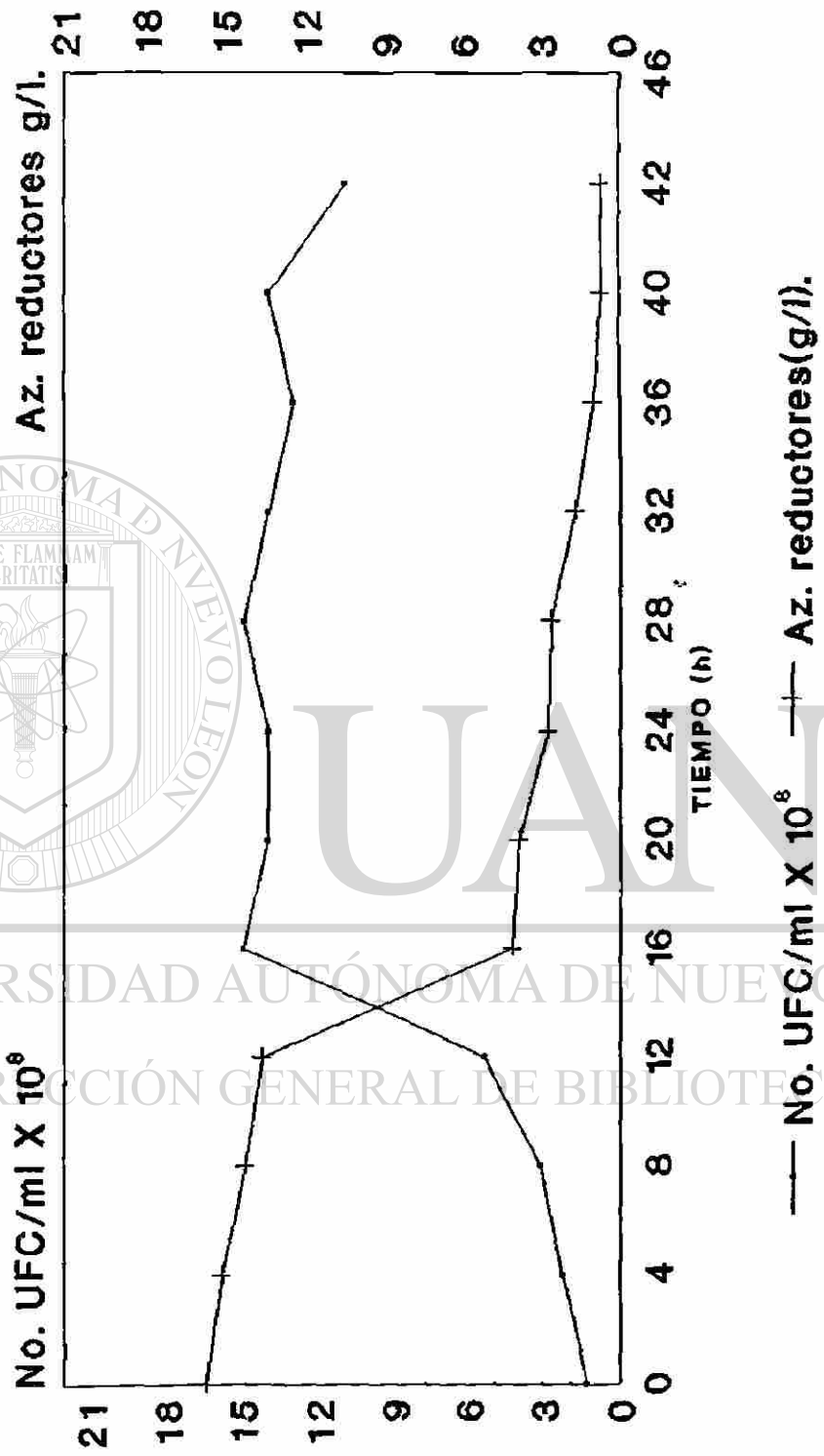
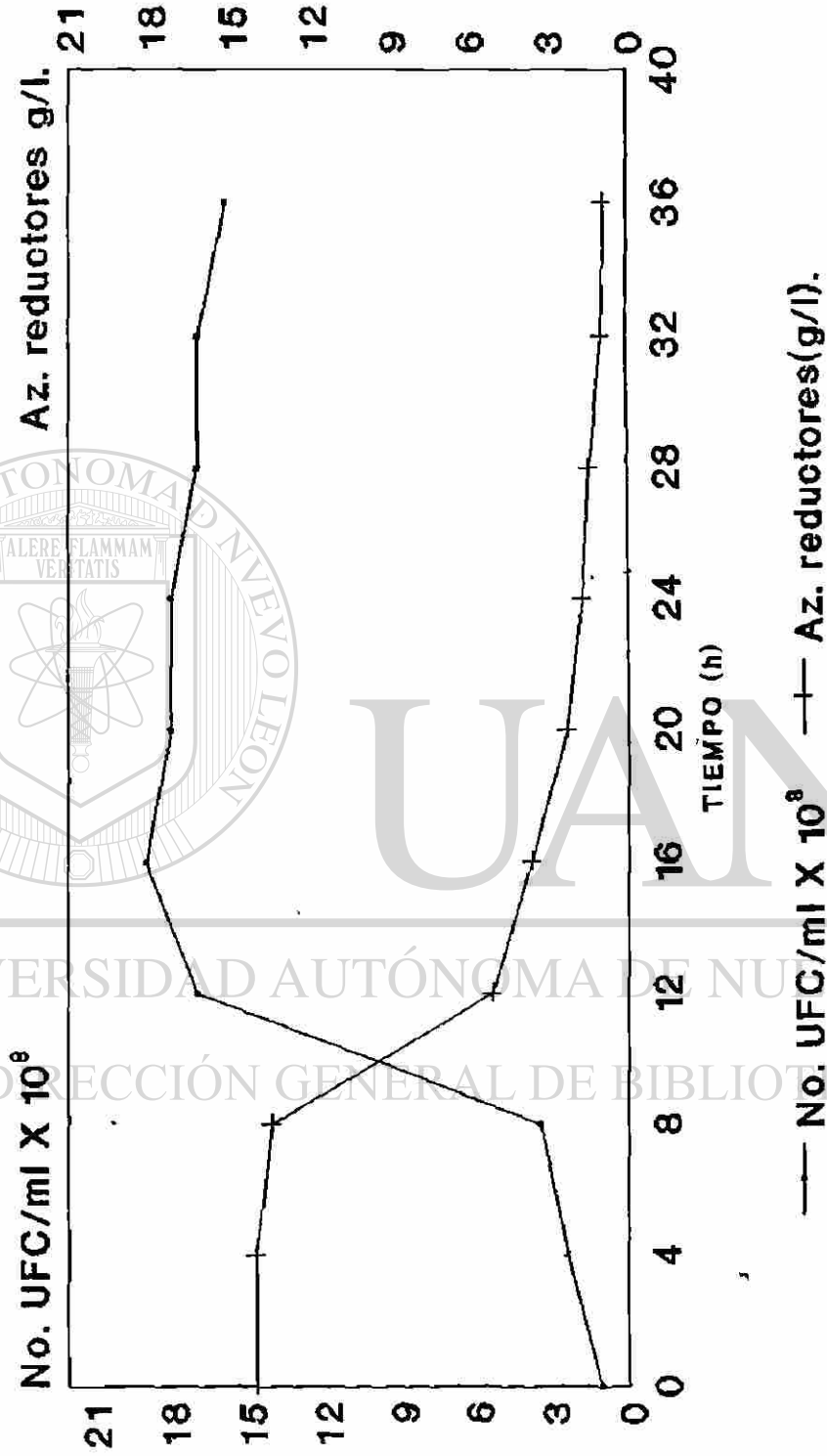


Fig.9. CINETICA DE CRECIMIENTO DE
Bacillus thuringiensis
 AGITACION 400 rpm, AERACION 0.5 VVM



**Fig.10. CINETICA DE CRECIMIENTO DE
Bacillus thuringiensis
AGITACION 500 rpm, AERACION 0.5 VVM**



—+— No. UFC/ml X 10⁶ —•— Az. reductores(g/l).

Fig.11. CINETICA DE CRECIMIENTO DE
Bacillus thuringiensis
 AGITACION 400 rpm, AERACION 1 VVM

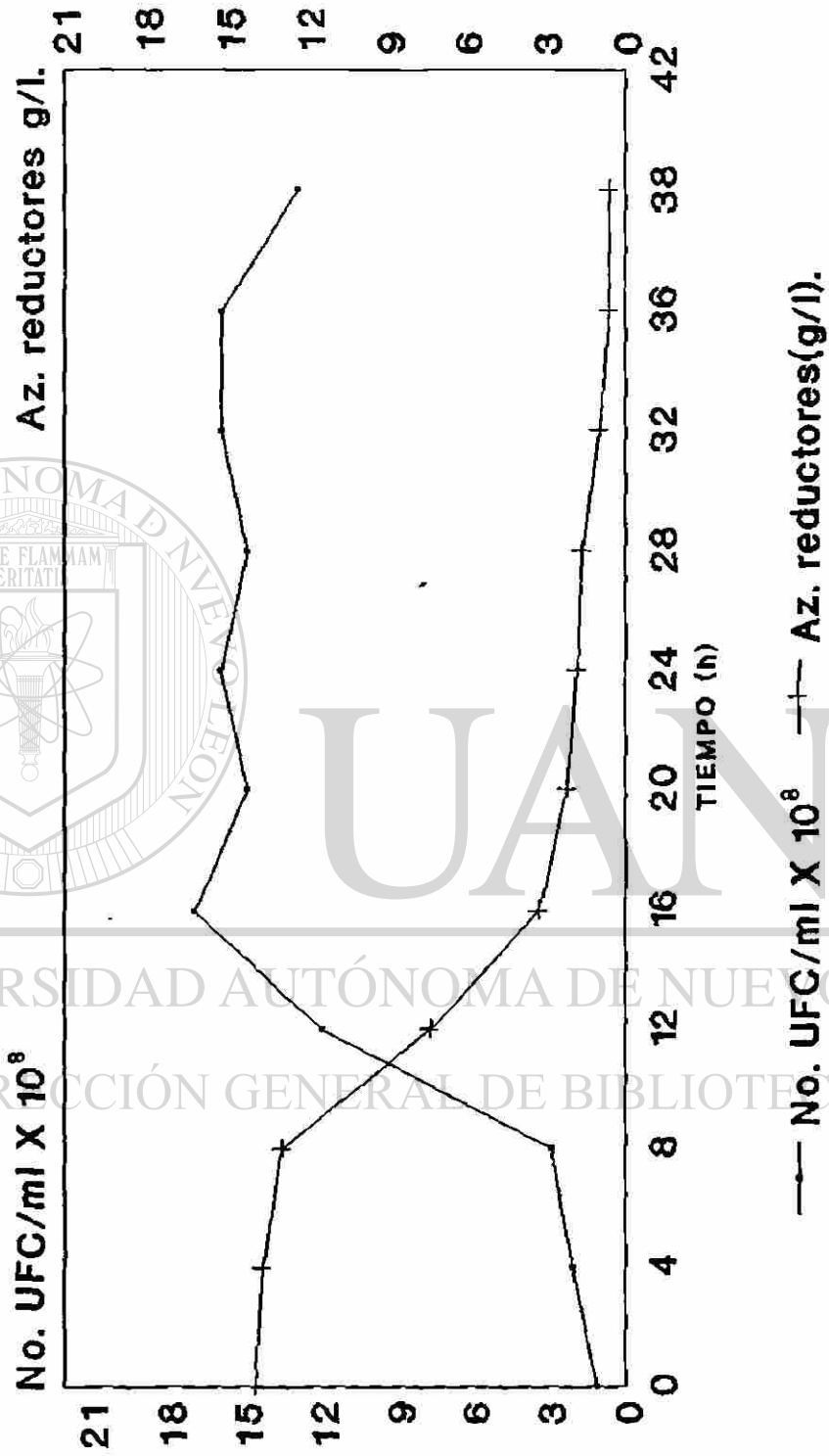
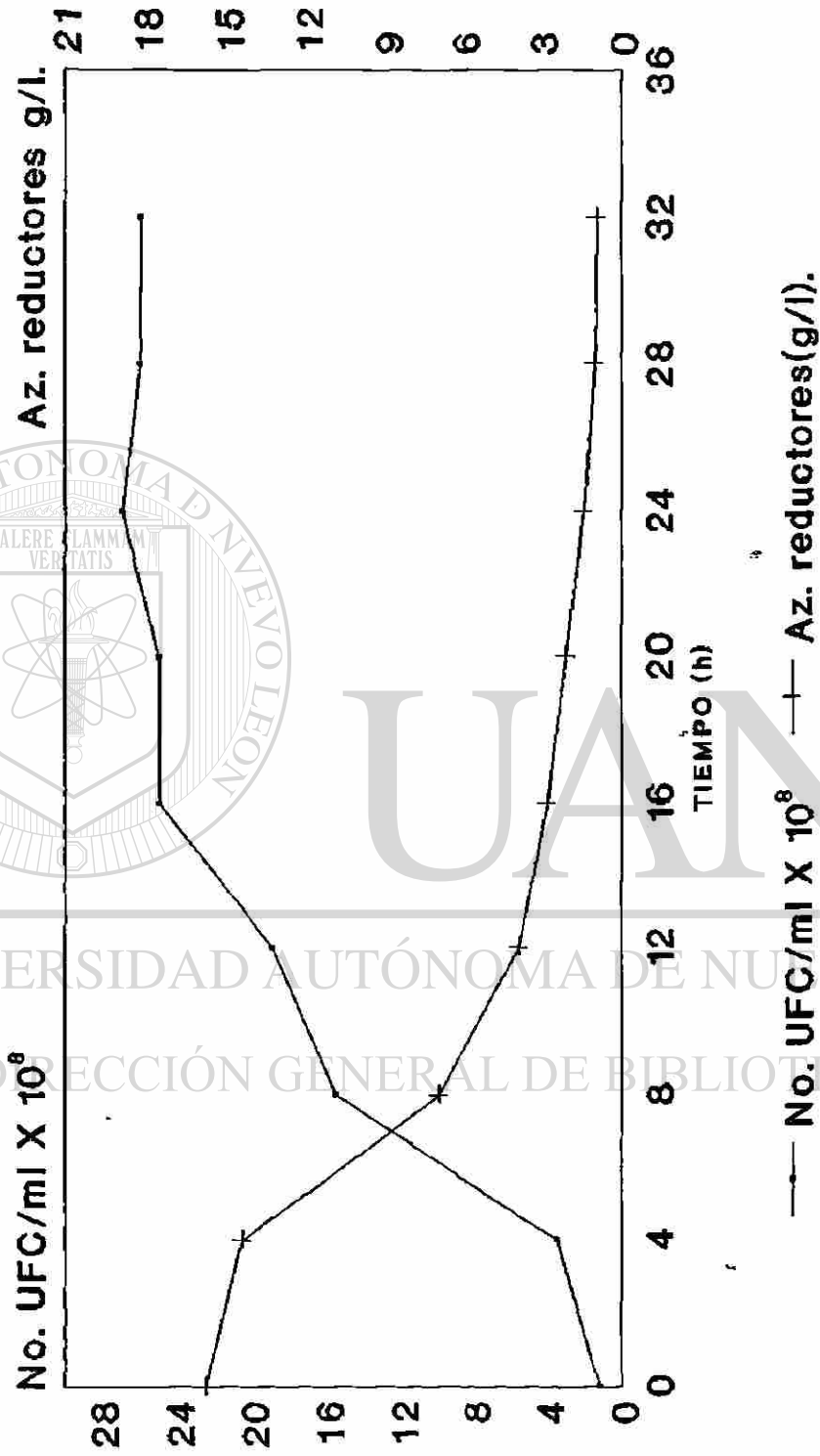


Fig.12. CINETICA DE CRECIMIENTO DE
Bacillus thuringiensis
 AGITACION 500 rpm, AERACION 1 VVM



**Fig.13. CINETICA DE CRECIMIENTO DE
Bacillus thuringiensis
 AGITACION 600 rpm, AERACION 1 VVM**

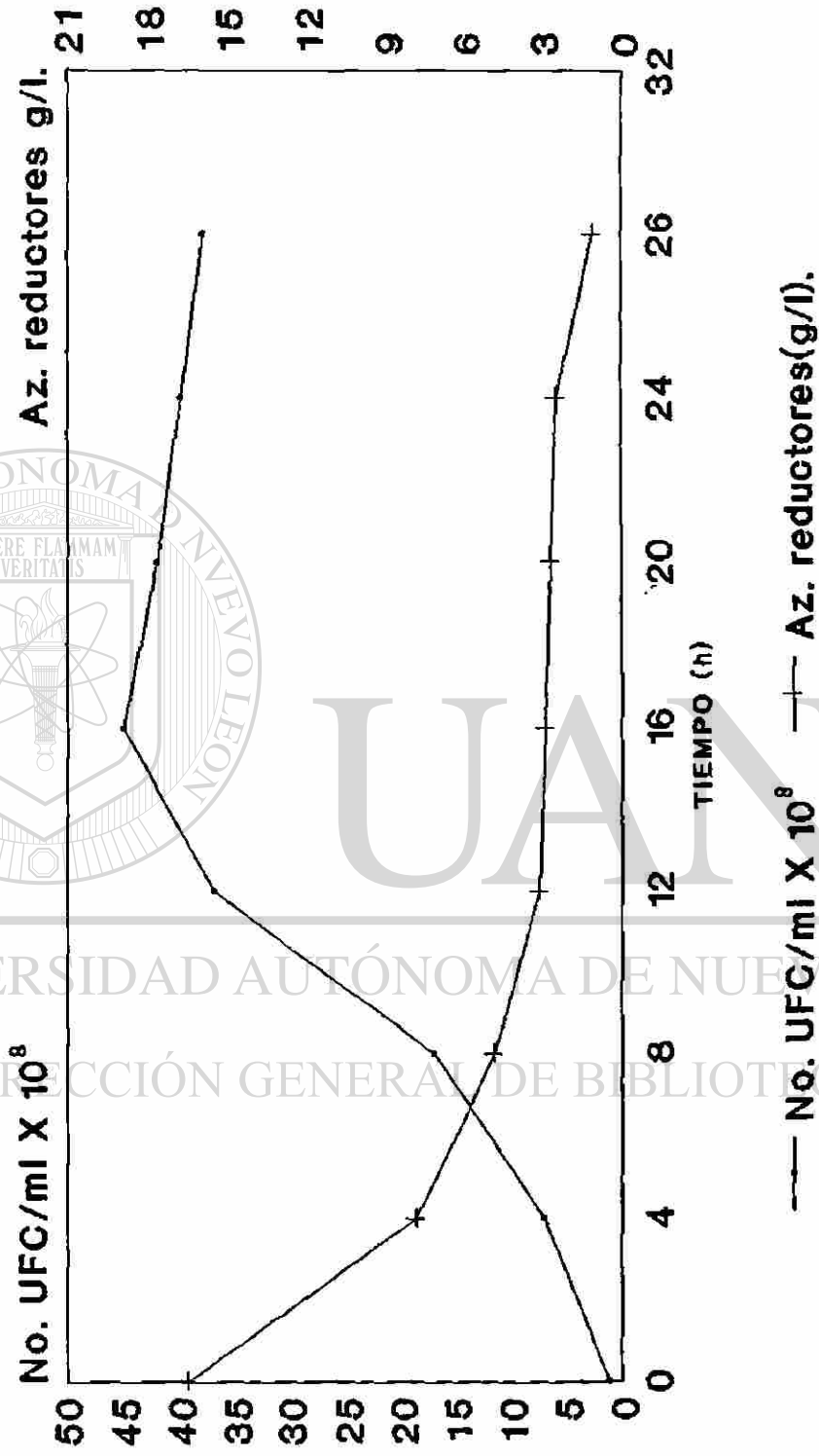
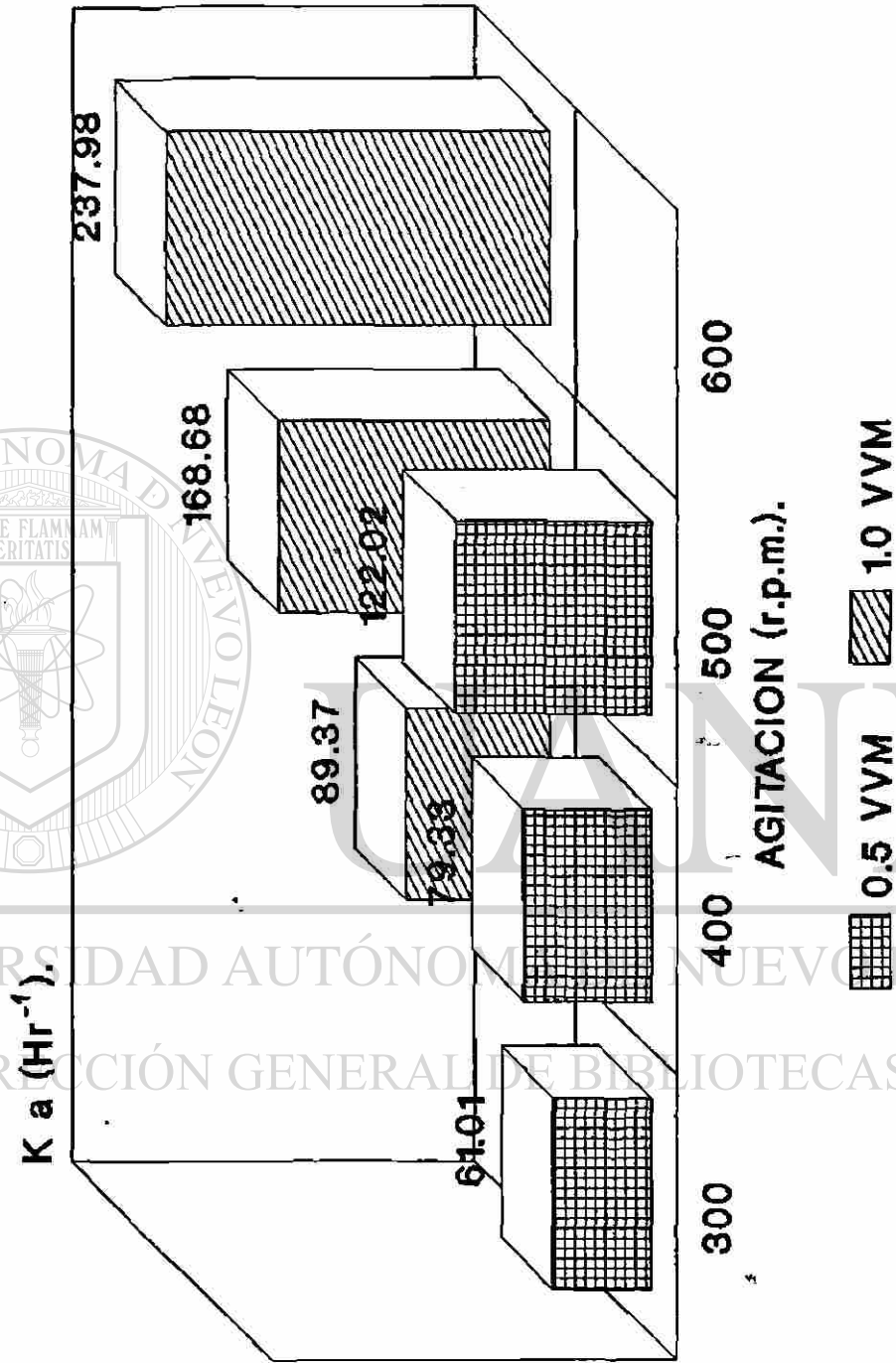


FIG.14. K_a EN FUNCION DE LA AGITACION
A NIVEL PLANTA PILOTO A
0.5 VVM Y 1 VVM



CUADRO 1.

ORIGEN DE LOS DOCE AISLAMIENTOS DE
Bacillus thuringiensis

CLAVE	FECHA DE REAISLAMIENTO	LUGAR DE RECOLECCION O PROCEDENCIA
CNPV B.t. 1	23.06.87	La Palmera, Diriamba Carazo
CNPV B.t. 2	13.07.87	La Trinidad, Diriamba Carazo
CNPV B.t. 3	13.07.87	La Trinidad, Diriamba Carazo
CNPV B.t. 4	13.07.87	La Trinidad, Diriamba Carazo
CNPV B.t. 5	13.07.87	Loma Negra, La Concha Carazo
CNPV B.t. 6	23.07.87	Chaguitillo, Sébaco Matagalpa
CNPV B.t. 7	23.07.87	Chaguitillo, Sébaco Matagalpa
CNPV B.t. 8	23.07.87	San Benito, Sébaco Matagalpa
CNPV B.t. 9	27.07.87	Campos Azules, Carazo
CNPV B.t. 10	17.07.87	El Gurró, León
CNPV B.t. 11	31.08.87	Sta. Ursula, Rivas
CNPV B.t. 12	31.08.87	Sta. Lucia, Chontales

CUADRO 2.

IDENTIFICACION SEROLOGICA DE 12 CEPAS
DE *Bacillus thuringiensis* NATIVAS
DE NICARAGUA

Antisuero antigeno	HD-2; 1 thuringiensis	HD-3; 2 finitimus	HD-4; 3a alesti	HD-21; 3a3b kerstaki
CNPV B.t. 1	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 2	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 3	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 4	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 5	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 6	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 7	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 8	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 9	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 10	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 11	---	---	1-1280	1-1280
CNPV B.t. 12	---	---	1-1280	1-1280
HD-4	---	---	1-1280	1-1280
HD-21	---	---	1-1280	1-1280

CUADRO 3. SATURACION DEL ANTISUERO 3a3b (HD-21) CON EL ANTIGENO 3a (HD-4) CRUZADO CON LAS 12 CEPAS NATIVAS.

CEPAS NATIVAS	HD-21 (antisuero) Saturado con HD-4 (antígeno)
CNPVBt-1	320
CNPVBt-2	320
CNPVBt-3	320
CNPVBt-4	320
CNPVBt-5	320
CNPVBt-6	320
CNPVBt-7	320
CNPVBt-8	320
CNPVBt-9	320
CNPVBt-10	320
CNPVBt-11	320
CNPVBt-12	320
HD-21	320
HD-4	80

**CUADRO 4. PRODUCCION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL PARA
LOS BIOENSAYOS DE SELECCION DE CEPAS.**

CEPA	g/l.
CNPVbt-1	14.22
CNPVbt-2	9.87
CNPVbt-3	10.61
CNPVbt-4	11.43
CNPVbt-5	10.0
CNPVbt-6	11.27
CNPVbt-7	13.07
CNPVbt-8	10.84
CNPVbt-9	11.39
CNPVbt-10	12.38
CNPVbt-11	11.79
CNPVbt-12	16.67

CUADRO 7. DOSIS LETAL MEDIA EN $\mu\text{g/ml}$ DE LA CEPA SELECCIONADA CNPVBt-12 CONTRA *Heliothis zea*.

Dosis	x'	(n)	(nM)	(PMC)	(Ye)
30	1.477	60	8	0.07143	3.53448
50	1.698	60	13	0.16071	4.00851
80	1.903	60	22	0.32143	4.53672
125	2.097	60	36	0.57143	5.17966
200	2.301	60	46	0.75000	5.67419
320	2.505	60	50	0.82143	5.92073
500	2.699	60	55	0.91071	6.34538
test.	-----	60	4	-----	-----

x'	- log. dosis.
n	- Número de insectos tratados.
nM	- Número de muertos.
PMC	- Proporción de Mortalidad Corregida.
Ye	- Próbit de la Proporción Afectada.
test.	- Testigo.

Regresión lineal:
 $x' \rightarrow X ; Ye \rightarrow Y$
 $a = 0.09637$
 $b = 2.36237$

	Dosis	L.C.I.	L.C.S.
DL_{50}	119.05	102.28	138.56
DL_{90}	415.17	-----	-----

L.C.I. - Límite de Confianza Inferior.
L.C.S. - Límite de Confianza Superior.
Análisis estadístico Probit con un 95% de confianza.

CUADRO 6. BIOENSAYOS PRELIMINARES DE LAS DOCE CEPAS NATIVAS CONTRA *Spodoptera exigua*.

CEPAS	DOSIS µg/ml	% M \bar{x}	σ
CNPVBt-1	50	5.18	5.27
	500	8.77	6.08
CNPVBt-2	50	15.44	4.74
	500	28.06	6.07
CNPVBt-3	50	10.26	4.88
	500	19.30	3.04
CNPVBt-4	50	8.51	7.70
	500	24.56	3.04
CNPVBt-5	50	12.19	6.23
	500	28.06	6.07
CNPVBt-6	50	10.53	5.27
	500	14.04	3.04
CNPVBt-7	50	20.79	5.66
	500	29.98	8.04
CNPVBt-8	50	5.17	5.26
	500	8.77	3.04
CNPVBt-9	50	17.10	10.44
	500	35.08	3.04
CNPVBt-10	50	8.42	10.37
	500	29.82	6.07
CNPVBt-11	50	17.19	10.81
	500	28.07	3.03
CNPVBt-12*	50	39.73	11.30
	500	71.93	9.98

% M - por ciento de mortalidad.

σ - desviación estándar.

* - cepa seleccionada.

CUADRO 5. BIOENSAYOS PRELIMINARES DE LAS DOCE CEPAS NATIVAS CONTRA *Heliothis zea*

CEPAS	DOSIS μg/ml	% M \bar{x}	σ
CNPVBt-1	50	8.60	2.90
	500	8.60	2.90
CNPVBt-2	50	3.42	2.96
	500	6.84	2.73
CNPVBt-3	50	21.86	9.75
	500	24.12	7.93
CNPVBt-4	50	17.28	8.41
	500	27.55	2.12
CNPVBt-5	50	3.42	2.96
	500	10.26	4.88
CNPVBt-6	50	3.33	5.77
	500	13.77	2.84
CNPVBt-7	50	15.53	0.46
	500	24.12	2.74
CNPVBt-8	50	22.46	3.39
	500	15.26	13.03
CNPVBt-9	50	10.44	9.19
	500	10.35	5.27
CNPVBt-10	50	12.10	8.10
	500	20.61	4.62
CNPVBt-11	50	10.35	5.27
	500	20.70	5.30
CNPVBt-12*	50	46.41	7.44
	500	96.49	6.08

% M - por ciento de mortalidad.

σ - desviación estándar.

* - cepa seleccionada.

CUADRO 7. DOSIS LETAL MEDIA EN $\mu\text{g/ml}$ DE LA CEPA SELECCIONADA CNPVbt-12 CONTRA *Heliothis zea*.

Dosis	x'	(n)	(nM)	(PMC)	(Ye)
30	1.477	60	8	0.07143	3.53448
50	1.698	60	13	0.16071	4.00851
80	1.903	60	22	0.32143	4.53672
125	2.097	60	36	0.57143	5.17966
200	2.301	60	46	0.75000	5.67419
320	2.505	60	50	0.82143	5.92073
500	2.699	60	55	0.91071	6.34538
test.	-----	60	4	-----	-----
<p>x' - log. dosis. n - Número de insectos tratados. nM - Número de muertos. PMC - Proporción de Mortalidad Corregida. Ye - Próbit de la Proporción Afectada. test. - Testigo.</p>					
<p>Regresión lineal: $x' \rightarrow X ; Ye \rightarrow Y$ a = 0.09637 b = 2.36237</p>					
	Dosis		L.C.I.		L.C.S.
DL ₅₀	119.05		102.28		138.56
DL ₉₀	415.17		-----		-----

L.C.I. - Límite de Confianza Inferior.
L.C.S. - Límite de Confianza Superior.
Análisis estadístico Probit con un 95% de confianza.

CUADRO 8. DOSIS LETAL MEDIA EN $\mu\text{g/ml}$ DEL ESTANDAR (HD-1) CONTRA *Heliothis zea*.

Dosis	x'	(n)	(nM)	(PMC)	(Ye)
30	1.477	60	7	0.08621	3.63528
50	1.698	60	11	0.15517	3.98552
80	1.903	60	20	0.31034	4.50554
125	2.097	60	26	0.41379	4.78259
200	2.301	60	37	0.60345	5.26186
320	2.505	60	49	0.81034	5.87904
500	2.699	60	57	0.94828	6.62871
test.	-----	60	2	-----	-----

x'	- log. dosis.
n	- Número de insectos tratados.
nM	- Número de muertos.
PMC	- Proporción de Mortalidad Corregida.
Ye	- Próbit de la Proporción Afectada.
test.	- Testigo.

Regresión lineal:	
$x' \rightarrow X$; $Ye \rightarrow Y$	
a =	-0.05791
b =	2.36818

	Dosis	L.C.I.	L.C.S.
DL_{50}	136.71	118.45	157.77
DL_{90}	415.29	-----	-----

L.C.I. - Límite de Confianza Inferior.

L.C.S. - Límite de Confianza Superior.

Análisis estadístico Probit con un 95% de confianza.

CUADRO 9. DOSIS LETAL MEDIA EN $\mu\text{g/ml}$ DE LA CEPA SELECCIONADA CNPVBt-12 CONTRA *Spodoptera exigua*.

Dosis	x'	(n)	(nM)	(PMC)	(Ye)
40	1.602	60	7	0.08621	3.63528
65	1.812	60	12	0.17241	4.05541
105	2.021	60	26	0.41379	4.78259
170	2.230	60	33	0.53448	5.08633
275	2.439	60	37	0.60345	5.26186
445	2.648	60	40	0.65517	5.39888
700	2.845	60	56	0.93103	6.48383
test.	-----	60	2	-----	-----

x'	- log. dosis.
n	- Número de insectos tratados.
nM	- Número de muertos.
PMC	- Proporción de Mortalidad Corregida.
Ye	- Próbit de la Proporción Afectada.
test.	- Testigo.

Regresión lineal:
 $x' \rightarrow X ; Ye \rightarrow Y$
 $a = 0.77699$
 $b = 1.87281$

	Dosis	L.C.I.	L.C.S.
DL_{50}	179.851	151.53	213.463
DL_{90}	869.430	-----	-----

L.C.I. - Límite de Confianza Inferior.
L.C.S. - Límite de Confianza Superior.
Análisis estadístico Probit con un 95% de confianza.

CUADRO 10. DOSIS LETAL MEDIA EN $\mu\text{g/ml}$ DEL ESTANDAR (HD-1) CONTRA *Spodoptera exigua*.

Dosis	x'	(n)	(nM)	(PMC)	(Ye)
40	1.602	60	10	0.12281	3.83884
65	1.812	60	13	0.17544	4.06720
105	2.021	60	21	0.31579	4.52091
170	2.230	60	32	0.50877	5.02193
275	2.439	60	38	0.61404	5.28942
445	2.648	60	53	0.87719	6.16116
700	2.845	60	57	0.94737	6.62021
test.	----	60	3	-----	-----

x'	- log. dosis.
n	- Número de insectos tratados.
nM	- Número de muertos.
PMC	- Proporción de Mortalidad Corregida.
Ye	- Próbit de la Proporción Afectada.
test.	- Testigo.

Regresión lineal:
 $x' \rightarrow X ; Ye \rightarrow Y$
 $a = -0.06083$
 $b = 2.28534$

	Dosis	L.C.I.	L.C.S.
DL ₅₀	163.86	140.85	190.62
DL ₉₀	596.03	-----	-----

L.C.I. - Límite de Confianza Inferior.
L.C.S. - Límite de Confianza Superior.
Análisis estadístico Probit con un 95% de confianza.

CUADRO 11. ANALISIS DE VARIANZA PARA EL % DE MORTALIDAD DE *Heliothis zea* EN 5 MEDIOS DE CULTIVO.

	g.l.	S.C.	C.M.	F
tratamientos	5	16,521.73	3,304.35	43.77
error	12	905.73	75.48	
total	17	17,427.46		

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN (p< 0.05) PARA LAS MEDIA DE ANDEVA				
Tratamientos	I	II	III	Media de la Mortalidad
II	89.47	95	95	93.16 ab
V	89.47	90	70	83.16 bc
IV	73.68	85	85	81.23 bc
I	78.95	65	85	76.32 c
III	68.42	55	80	67.81 c

* Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes.

CUADRO 12. % DE MORTALIDAD DEL INSECTO BLANCO *Heliothis zea* CON LA δ -ENDOTOXINA DE LA CEPA CNPVBt-12 MEDIO II, BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS.

tratam	dosis (μ G/ml)	R E P E T I C I O N E S						\bar{X}	σ
		1 ra.		2 da.		3 ra.			
		M	% (c)	M	% (c)	M	% (c)		
I	500	5/20	25	5/20	25	6/20	30	26.67	2.89
II	500	7/20	35	6/20	30	8/20	40	35.00	5.00
III	500	9/20	45	9/20	45	8/20	40	43.33	2.89
IV	500	7/20	35	5/20	25	8/20	40	33.33	7.64
V	500	13/20	65	10/20	50	12/20	60	58.33	7.64
VI	500	17/20	85	16/20	80	15/20	75	80.00	5.00
test.	---	0/20	0	0/20	0	0/20	0	0.00	0.00

CUADRO 13. EVALUACION DE LOS TRATAMIENTOS (AEREACION\AGITACION)
A TRAVES DE DIFERENTES PARAMETROS DE FERMENTACION

tratamien. (rpm/VVM)	tiempo (h)	K _{La}	esporas viables	UFC/ml	P. e/c (g/l)
(300/0.5)	48 h.	61.01	4.7 x 10 ⁸	16 x 10 ⁸	5.35
(400/0.5)	42 h.	79.33	7.8 x 10 ⁸	15 x 10 ⁸	6.87
(500/0.5)	36 h.	122.02	1.9 x 10 ⁸	19 x 10 ⁸	10.20
(400/1.0)	38 h.	89.37	2.8 x 10 ⁸	17 x 10 ⁸	7.30
(500/1.0)	32 h.	168.68	3.4 x 10 ⁹	27 x 10 ⁸	13.10
(600/1.0)	26 h.	237.98	3.9 x 10 ⁹	45 x 10 ⁸	18.00

P.e/c - Peso en gramos de esporas y cristales/litro de medio de cultivo.

