

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Sobrevivencia y actividad de Bacillus thuringiensis var. israelensis en ambientes naturales contra larvas de mosquito

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. B. P. MARIBEL LEAL CASTILLO

Agosto 1993

Monterrey N. L.

320
B
93

TM

Z5320

FCB

1993

L4

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

***Sobrevivencia y actividad de Bacillus
thuringiensis var. israelensis en ambientes
naturales contra larvas de mosquito***

T E S I S

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

Q.B.P. MARIBEL LEAL CASTILLO

Agosto 1993

Monterrey N. L.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NEUVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sobrevivencia y Actividad de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* en ambientes naturales contra larvas de mosquito

TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE

MESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA


PRESENTA
Q.B.P. MARIBEL LEAL CASTILLO

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE


Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez

SECRETARIO


Dr. Luis J. Galán Wong

VOCAL


M. C. Katiushka Arévalo Niño



COMISION DE TESIS

Monterrey N. L.

Agosto 1993



1020091345

TM
ZS3 0
FC
1º 3
L4



FONDO TESIS

4 94

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yanes por dirigir este trabajo. .

Al M.C. Luis j. Galán Wong por facilitar los medios para la realización de la presente investigación, por su asesoría y revisión del escrito.

Al M.C. José A. Suárez Fernández por brindar el apoyo necesario para realizar este proyecto.

A la M.C. Katywska Arevalo Niño por sus sugerencias y la revisión del escrito.

A la Q.B.P. María Concepción Leal Castillo por su valiosa colaboración en el desarrollo del trabajo práctico.

Al M.C. Alfonso Flores Leal por facilitar el material empleado en los bioensayos y pruebas de toxicidad.

Al M.C. Mario Efren Nieto por su asesoría en el manejo de la computadora.

Al Lic. Alvaro Rosete Casados por su participación en el diseño e impresión de gráficas y rótulos.

DEDICATORIA

A DIOS: Por que aún conservo el Don maravilloso de su vida

A MI ESPOSO: Perino Garza Molina por que ha sabido ser mi
ayuda idonea

A MIS HIJOS: Samuel y David por que son la razón de mi
existencia

A MIS PADRES: Sixto Leal Morales y Soledad Cactillo López.

A MIS HERMANOS: Sixto, Fernando, Maria Elena y Tom, Cony y
Sonia

A la Iglesia Universal.

Y cantan el cántico de Moisés siervo de Dios, y el cántico del Cordero, diciendo: Grandes y maravillosas son tus obras Señor Dios Todopoderoso; justos y verdaderos son tus caminos, Rey de los santos.

Quién no te temerá, oh Señor, y glorificará tu nombre? pues sólo tú eres santo; por lo cual todas las naciones vendrán y te adorarán, por que tus juicios se han manifestado.

Diciendo a gran voz: Temed a Dios, y dadle gloria, por que la hora de su juicio ha llegado; y adorad a aquel que hizo el cielo y la tierra, el mar y las fuentes de las aguas.

Apocalipsis 15:3,4; 14:7.

Este trabajo fué realizado en el laboratorio de Microbiología industrial e inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con la Facultad de Ciencias Agroindustriales de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

C O N T E N I D O:

	pag.
RESUMEN.....	1
IMPORTANCIA.....	2
OBJETIVO.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Ecología de <i>Bti</i>	6
Toxinas y Mecanismo de Acción.....	7
Aplicación en la naturaleza.....	8
Estudios genéticos de la δ -endotoxina de <i>Bti</i>	9
ORIGINALIDAD.....	10
HIPOTESIS.....	10
MATERIAL Y METODO.....	11
I- Inducción de mutantes.....	11
II- Producción de la δ -endotoxina de <i>Bti</i>	11
III-Sobrevivencia y Actividad Metabólica.....	12
Matríz tipo Bartha.....	13
IV- Bioensayos.....	14
RESULTADOS.....	15
Cuadros.....	18
Gráficas.....	23
DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....	28
LITERATURA CITADA.....	31

R E S U M E N

Con el proposito de determinar la sobrevivencia y capacidad de colonización de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en ambientes acuáticos naturales. Se indujo resistencia genética mediante diferentes dosis de radiación ultra violeta a 30 µgr. de kanamicina y 550 ppm. de parathión metílico.

Los resultados indican que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* tiene capacidad para sobrevivir en ambientes acuáticos hasta por 10 días sin aumentar la población inicial.

Por otro lado, para comprobar que la mutación inducida no afectó la capacidad de la bacteria para producir la δ -endotoxina y su acción tóxica contra larvas de mosquito, se realizaron bioensayos y con los resultados se comprobó que conservaba su toxicidad contra *Aedes aegypti*, mediante el análisis estadístico de probit se observó un intervalo de confianza de 95% para ambas cepas.

IMPORTANCIA

En los últimos 20 años se ha prestado mayor interés para reemplazar o aumentar la potencia de los pesticidas químicos que se emplean en el control de plagas agrícolas y vectores de enfermedades humanas, no solo por su desfavorable efecto en el medio ambiente, también porque generan resistencia en los insectos. Afortunadamente desde 1901 se sabe de la existencia de especies de bacterias relacionadas con las enfermedades de larvas de insectos, entre ellas se encuentran especies del género *Bacillus*, como son: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus larvae*, *Bacillus popillae*, *Bacillus sphaericus*. (18,19,20). *Bacillus thuringiensis* es un organismo esporulado que contiene una inclusión que se sintetiza al mismo tiempo que la spora, se ha demostrado que la toxicidad contra insectos esta asociada principalmente con esta inclusión cristalina de naturaleza protéica que requiere para su actividad de la solubilización en álcali diluido o jugo intestinal del insecto (17,18,40).

Esto representa una alternativa en el control microbiológico de plagas de interés agrícola y urbano, ya que tiene múltiples ventajas como son: especificidad, estabilidad, bajo costo, sin generar resistencia en los insectos. (17).

Dentro de la especie *thuringiensis* se han encontrado diferentes variedades mediante pruebas bioquímicas, serológicas en base a sus antígenos flagelares H, tipo y forma de cristal y con adsorción de fagos (8,9,27). Además de acuerdo con la actividad insecticida que presentan se han establecido diferentes patotipos dentro del serotipo H. Patotipo A: producen cristales bipiramidales tóxicos para lepidópteros, patotipo B: presenta cuerpos esféricos a ovoides efectivo contra *Nematocera* (Diptera).

Y el patotipo C: produce cristales muy característicos de tipo placa plana siendo cuadrangulares a romboidales en el contorno, y presentan efectividad contra Coleópteros. (17)

En relación a salud pública se ha observado que ni la segunda guerra mundial produjo tantas bajas humanas como las causadas por enfermedades diseminadas por mosquitos, esto ha incrementado el empleo de productos químicos para su control, que contribuye con la creciente contaminación ambiental.

Una vez en el ambiente el pesticida puede seguir diversas vías como: ser asimilado por las plantas y acumulado en partes comestibles; ser transportado a corrientes de agua con partículas de suelo, o acumularse en lombrices de tierra y presentarse en grandes cantidades en aves que se alimentan de gusanos. Tales problemas son menos importantes en los compuestos que no son estables y permanecen poco tiempo en la naturaleza (2).

En estas circunstancias el control biológico y en especial *Bacillus thuringiensis* ofrece una alternativa para devolver al medio ambiente el equilibrio distorcido por el hombre.

Dentro del patotipo B se encuentra una variedad muy activa contra larvas de especies de mosquito y mosca negra: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (30,35). En la actualidad se han realizado diversos estudios para evaluar el grado de toxicidad contra las diversas especies de mosquitos dependiendo de sus hábitos alimenticios, comparación con compuestos químicos, concentraciones y formulaciones más tóxicas, además se ha demostrado que la potencia de las toxinas de *Bti* pueden ser 300x mayor que los piretroides sintéticos y que los organofosforados (1,4,5,9,12,23,27,40).

Sin embargo para pronosticar la eficacia del control de plagas con *Bti*. es necesario conocer más acerca de la autoecología de la bacteria y aumentar la probabilidad de éxito en su aplicación.

Por lo anterior se planteo el siguiente objetivo:

EN EL PRESENTE TRABAJO SE PLANTEO EL SIGUIENTE OBJETIVO

- 1.- Determinar sobrevivencia y actividad metabólica de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* bajo condiciones ambientales.

ANTECEDENTES

A través del tiempo se ha observado que los insectos también son susceptibles a las enfermedades causadas por bacterias, en 1870 Pasteur observó una bacteria que presentaba una inclusión cristalífera *Bacillus bombycis* causante de la flechería del gusano de seda (17,18).

No obstante, fue en el año de 1902 cuando Ishiwata aisló de larvas enfermas del gusano de seda *Bombix mori*, un microorganismo que denominó *Bacillus sotto*. Posteriormente Berliner en 1911 lo reaisló de larvas enfermas de la palomilla del mediterráneo *Anagasta kuehniella* e identificó la especie tipo de este grupo como *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis*. (17,19,27). Más tarde científicos japoneces observaron que cultivos viejos esporulados de *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* después de formar los cristales liberaban una sustancia tóxica para el gusano de seda (14,17).

Fué hasta 1954 en que se estableció una relación entre la toxina cristalizada de la variedad *sotto* y la parálisis que ocurre en el insecto después de la ingestión del cristal.

Se observó que aunque la toxina causa parálisis al ser ingerida; ésta no tiene efecto cuando se inyecta dentro del cuerpo del insecto (17).

En 1958 Heimpel y Angus intentaron una clasificación de bacterias cristalíferas; en base a la morfología y pruebas bioquímicas. Posteriormente De Barjac y Bonnefol, en 1962 reportaron un análisis de 161 cepas de *Bacillus thuringiensis* y propusieron una clasificación en base a sus antígenos flagelares H y pruebas bioquímicas, organizaron nueve serotipos con doce variedades. Estudios posteriores demostraron que los cultivos esporulados de *Bacillus thuringiensis* son tóxicos para un gran número de insectos plaga como: Lepidópteros y Coleópteros (8,10,11,14,19,20).

En 1977 Goldberg y Margalit encontraron una nueva bacteria en un lago al noreste del Negev en el desierto de Israel. En 1978 fué descrita y clasificada por De Barjac como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotipo H-14, que produce un cuerpo parasporal δ -endotoxina que es altamente tóxica para larvas de dípteros, nematoceros, tales como mosquitos y simúlidos, no así contra larvas de lepidópteros (7,9).

Se han probado extractos de diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* y no todas presentan la misma toxicidad contra diferentes insectos, las cepas GM-1, GM-6, GM-7, GM-8, GM-9, GM-10 y GM-13 aisladas de muestras de suelo fueron probadas contra larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus* sin encontrar resultados positivos de toxicidad contra estos insectos, en cambio cuando se probó la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a nivel de campo se presentaron porcentajes aceptables de mortalidad en concentraciones de 5 kg./ha. (12,14,26,36).

Distintas cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* muestran diferente capacidad para producir toxinas letales contra larvas de mosquitos, en función del medio de cultivo y condiciones de crecimiento, sin existir proporcionalidad entre la cantidad de esporas y toxinas producidas (39).

ECOLOGIA DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

En un estudio realizado para probar la colonización de *Bti*. en un ambiente acuático a nivel de laboratorio y cuerpos acuíferos, se encontró baja toxicidad contra larvas en el segundo estadio de *Culex pipiens* y *Aedes aegypti*, además ésta disminuyó con la presencia de materia orgánica en el agua. Perdió el 50% de su actividad larvicida en 6 días.

En otros estudios se ha observado que la toxina de *Bti* tiene mayor acción sobre larvas de mosquito del primero al tercer instar disminuyendo el efecto tóxico en larvas del cuarto instar requiriendo de 1.5 a 2 veces más toxina del porcentaje normal usado para *Aedes nigromaculis* y *Psoropora columbiae* (3,22).

Mediante modelos de laboratorio que simulan las condiciones naturales empleando mutantes de *Bti* resistentes a tres antibióticos, cuando se inocularon esporas de una cepa de *Bti* mutante en partículas de lodo, se detectó una adsorción inmediata de la actividad tóxica sin influir en la viabilidad de la bacteria, por agitación del lodo se logró detectar bacterias viables al menos por 22 días; aunque las esporas fueron incapaces de germinar en el fango (3).

TOXINAS Y MECANISMO DE ACCION

En estudios recientes se han encontrado diferentes toxinas como partes constitutivas del cristal de *Bti*: 134, 72, 67, y 28 KDa. La de 67 KDa ha sido designada como la más tóxica *in vivo* contra larvas de *Aedes aegypti*. La proteína de 28 KDa tiene actividad citolítica y hemolítica contra eritrocitos de conejo. Se ha comprobado que cada subunidad proteica de los cristales es tóxica solamente después de su activación por enzimas proteolíticas parecidas a la tripsina (24,25,28,40,43). Después de que una larva de insecto ingiere el cristal, éste se disuelve en el intestino medio, produciendo subunidades tóxicas activas que se unen a la membrana celular del tejido epitelial del intestino, esto genera

poros que desequilibran el balance osmótico ocasionando lisis de las células epiteliales, se detiene la alimentación y la larva muere. Se ha incrementado la evidencia bioquímica de la presencia de sitios de unión específica de alta afinidad en el epitelio del intestino medio que puede definir si un insecto es resistente o susceptible a determinada toxina (24, 28, 40).

APLICACION EN LA NATURALEZA

Al probar formulaciones para determinar la actividad de toxinas de *Bti*. contra larvas de especies de *Anopheles* empleando sustancias que facilitan la aspersion y flotación de partículas de formulados como aceite de maíz, lecitina, y dos productos comerciales de *Bti*. (Arosurf y Liparol). Se encontró que las concentraciones y combinaciones más efectivas fueron: ingrediente activo con harina de trigo y aceite de maíz. La mortalidad completa se obtuvo en concentraciones de 0.1% para (*Anopheles stephensis*), de 0.2% contra (*Anopheles albimanus*), y 0.3% contra (*An. quadrimaculatus*), (12).

En la actualidad existen diversas compañías como: Duphar, Novo-Labs, Ecogen, Abbott Labs, Sandoz etc. que se dedican a la producción de formulados a base de *Bacillus thuringiensis* de sus diferentes variedades, entre ellas *israelensis* con productos como: skeetal, tekmar, vectobac que se aplican en diversas regiones principalmente en Norte America. (1, 28, 40).

En un estudio a nivel de campo se aplicaron formulaciones granuladas de *Bti* para combatir la mosca negra, y mediante un análisis de costos se observó que estos pueden reducirse hasta en un 5% después del primer año de aplicación, debido al incremento en la eficiencia de operación, entrenamiento, etc. (28, 34).

ESTUDIOS GENETICOS CON LA δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Mediante la introducción del gen-Cry IVD procedente de *Bti* en la cianobacteria unicelular *Agmenellum quadruplicatum* se ha observado que el gen fusionado se expresa a altos niveles en las cianobacterias y los bioensayos revelan que las larvas de mosquito *Culex pipiens* facilmente ingieren la cianobacteria transformada conservando su toxicidad contra la larva (5).

Se ha descrito la clonación de genes que codifican para las toxinas 51.4 y 91.4, la 100-KDa procedente de *Bacillus sphaericus* y la fracción 130- KDa de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* en plásmidos con amplio rango de hospedero y se introdujeron para su expresión en *Caulobacter crescentus* los recombinantes presentaron actividad tóxica contra larvas de mosquito. *Caulobacter* es un microorganismo que se desarrolla en la superficie de ambientes acuáticos y provee un control potencial tóxico contra mosquitos en zonas de alimentación de las larvas. (28,40,41). En otros estudios se ha empleado mutagénesis en sitios determinados para cambiar los aminoácidos constitutivos de las proteínas presentes en la δ -endotoxina de *Bti*, al reemplazar los residuos ácidos y básicos por alanina se obtienen mutantes con toxicidad reducida. (42).

ORIGINALIDAD

En trabajos anteriores se ha investigado el tiempo de actividad tóxica de *Bti.* en ambientes acuáticos, en el presente estudio se verificará la capacidad de colonización de una cepa de *Bti.* marcada, así como su toxicidad contra mosquitos

HIPOTESIS DEL TRABAJO

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes naturales y conservar su toxicidad contra mosquitos.

MATERIAL Y METODO

Origen de las cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

En el presente trabajo se empleó una cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* HD-14 proporcionada por el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

I.- INDUCCION DE MUTANTES de *Bti*.

a)- Activación:

De la cepa de referencia de *Bti*. se sembró en un matríz de 50 ml. con 10 ml. de caldo nutritivo, se incubó de 13 a 18 hrs. a 37 °C. en agitación rotatoria de 250 r.p.m.

b)- Preparación de cultivo para ensayo de mutagénesis en *Bti*.

Con la cepa activada se inocularon 36 placas de agar nutritivo, luego se les irradió con luz ultra violeta en dos longitudes de onda a diferentes tiempos: 253.7 nm. y 375 nm. a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min., cada prueba se realizó por triplicado.

A las cepas de *Bti*. sobrevivientes de cada dosis se les asignó un número diferente para evaluar resistencia a un pesticida y antibióticos.

c)- El pesticida probado fué Parathión Metílico 50 %. concentrado emulsificable organofosforado, a tres concentraciones: 25, 50 y 100 p.p.m.

d)- El Patrón de resistencia de antibióticos se obtuvo con el uso de sensidiscos para bacterias gram + (13,32).

II.- PRODUCCION DE LA Δ -ENDOTOXINA.

a).- Se seleccionó la cepa marcada para la producción de la δ endotoxina, en matraces erlem-meyer de 500 ml. con una quinta parte de su volumen total de caldo de propagación (medio melaza) (10,22).

Como control se empleó la cepa silvestre *Bti*.

Para ambas cepas se empleó el mismo medio de cultivo,

- monitoreando al microscopio cada 4 o 6 hrs. hasta la liberación homogénea de la espora y el cristal.
- b).-Extracción de la δ -endotoxina de *Bti*.
Para obtener el complejo espora cristal se empleó el método propuesto por Dulmage 1970 (19,21,22).
- c).-Una vez obtenido el complejo espora-cristal se procedió a la formulación del ingrediente activo. (12,38).

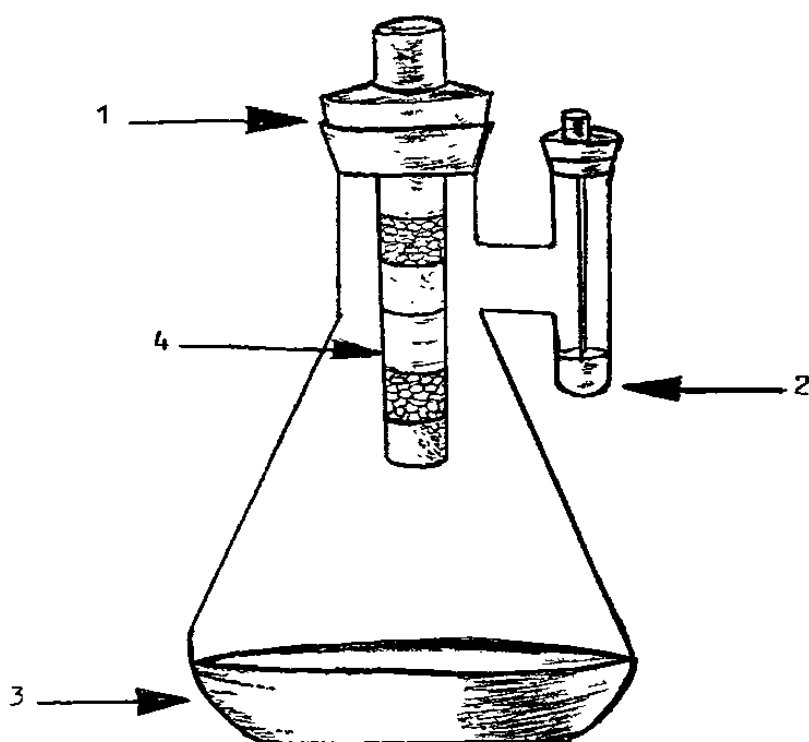
FORMULADO

Ingrediente activo..	1. %	- Complejo espora-cristal
Soporte.....	50. %	- Tierra de diatomeas
Coadyuvante.....	0.1 %	.- Tritón 67. (12, 27).

III.- SOBREVIVENCIA Y ACTIVIDAD METABOLICA DE *Bti*. EN AMBIENTE NATURAL

Se emplearon matraces tipo Bartha para evaluar la actividad metabólica del formulado de *Bti*. en un microambiente que simuló las condiciones naturales. La actividad metabólica se midió mediante la captación del CO₂ en álcali y se registró diariamente, a los matases se les agregó 1/5 parte de su volumen de agua, esterilizada por filtración con filtro membrana milipore de 0.2 μ de diámetro. El agua fué colectada en el arroyo Los Cavazos en Los Cavazos N.L., se agregaron 0.5 gr. del formulado. La captación se realizó con NaOH al 0.1 N. P/V, que se tituló diariamente con HCl 0.1 N. (29,31). Para evitar la entrada de CO₂ del aire, el matrás se cerró con un tapón monohoradado al que se adaptó una columna de seguridad que permitió la entrada del O₂ ambiental. El empaque contenía sílica gel, cristales de NaOH, algodón y fibra de vidrio. La viabilidad de *Bti*. se verificó mediante microscopía el monitoreo se realizó diariamente durante 10 días.

TIPO BARTHA



- 1.- Tapón de Goma
- 2.- Na OH .1 N
- 3.- Suspensión de prueba .5 gr de formulado + 1/5 del volúmen de agua de río filtrada con membrana milipore de 0.2 micras
- 4.- Columna para captura de CO₂
 - Sílica gel
 - NaOH
 - Fibra de vidrio
 - Algodón

La viabilidad también se determinó, colocando en una serie de vasos con 150 ml. de agua de río y 14 ppm. del formulado. Se emplearon 3 tratamientos: designándose un número a cada cepa; 1 para la cepa silvestre y 2 para la mutante, para cada tratamiento se corrió un testigo sin formulado con 4 repeticiones cada uno. Diariamente se realizaron diluciones en placas de agar nutritivo con el pesticida y antibiótico, la muestra antes de inocularse se pasteurizó 80°C/10 min. para eliminar la flora vegetativa, monitoreando solamente la población esporulada.

10.- Se efectuaron también bioensayos para probar la toxicidad de los formulados preparados con la cepa de *Bti*. marcada y el control (cepa silvestre) siguiendo el método recomendado por la organización mundial de la salud (O.M.S.), descrito por De Barjac en 1982, con el uso de larvas del tercer estadio o del cuarto estadio temprano (22,42).

Se probó toxicidad contra larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, que fueron proporcionadas por el insectario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. se emplearon vasos desechables con 200 ml. de H₂O de río, con larvas del tercer estadio o del cuarto estadio temprano. Se aplicó la solución stock del formulado con una micropipeta estandarizada, para obtener una serie de concentraciones finales de 2 a 14 p.p.m. por vaso. En los testigos se colocaron 200 ml. de H₂O y 25 larvas por vaso. Cada bioensayo se realizó con 7 dosis, 4 repeticiones y un testigo por cada dosis, el experimento se corrió tres veces. La mortalidad se midió a las 24 y 48 hrs. después de la aplicación del formulado. los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de PROBIT. (22).

RESULTADOS

I.-SELECCION DE MUTANTES DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Se observó desarrollo escaso de colonias en los extremos de las cajas irradiadas con 5, 10 y 15 min a 253.7 nm. estas cepas se etiquetaron con los números 1,2, y 3. En la aplicación con la segunda dosis 375 nm. se encontro mayor sobrevivencia en todas las cajas, aquí las cepas se etiquetaron como 4 al tratamiento con 5 min., hasta 9 el de 30 min., el número 10 fué para la cepa de *Bti.* silvestre (control sin irradiar). Esto se muestra en el cuadro No.1.

La sensibilidad a antibióticos se muestra en el cuadro No.2. El desarrollo de las cepas de *Bti.* irradiadas fué semejante a la cepa silvestre, en presencia de cuatro antibióticos: tetraciclina, estreptomina, lincomicina y eritromicina. La cepa silvestre mostró resistencia natural solo a ampicilina, esta resistencia se mantuvo solo en las cepas 7 y 9. Se seleccionaron las cepas 1, 6, y 9 resistentes a 10 µgr. de gentamicina, y las cepas 2 y 5 resistentes a kanamicina en una concentración de 30 µgr.

Tanto las cepas seleccionadas como la cepa silvestre mostraron una marcada resistencia natural al parathión como se observa en el cuadro No.3, por lo tanto las concentraciones fueron aumentadas progresivamente desde 25 ppm. hasta 550 ppm. a concentraciones superiores no se detectó sobrevivencia de ninguna cepa de *Bti.*, esta fué la concentración seleccionada, los resultados se expresan en el cuadro No.4. Tanto las cepas marcadas como el control presentaron resistencia natural al pesticida en las concentraciones probadas. En el cuadro No.3 se observa el patrón de sensibilidad de 5 cepas de *Bti.* a gentamicina, kanamicina y 550 p.p.m. de parathión metílico.

1020091345

En los medios de cultivo que contenían antibiótico y pesticidano no se observó con claridad la producción del cristal, por lo que las cepas se sembraron en caldo tripticaseína y fosfato para comparar la producción del cristal. A las 48 hrs. se revisaron las cepas y se seleccionó la número 2 resistente a 10 μ gr. de kanamicina y 550 ppm de parathión, para la producción de la δ -endotoxina y las pruebas de sobrevivencia, actividad metabólica y toxicidad

II.- SOBREVIVENCIA Y ACTIVIDAD METABOLICA

En la gráfica No.1 se muestra la sobrevivencia de la población esporulada nativa del agua de prueba, se observo estabilidad durante 6 días y posteriormente declinó en condiciones naturales. En la gráfica No. 2 se muestra el comportamiento de la cepa *Bti.* silvestre, que no presenta resistencia a kanamicina ni parathión y sobrevivió por 10 días. En la gráfica No.3 se describe el patrón de sobrevivencia de la cepa mutante de *Bti.* que fué muy semejante al de la cepa de *Bti.* silvestre. Sin embargo la densidad poblacional disminuyó menos drásticamente que en la gráfica No.2. Se detectó mayor número de mutantes de *Bti.* en los monitoreos realizados en placas de agar nutritivo y en presencia de parathión que en los medios con kanamicina, aunque el patrón de crecimiento de ambas cepas mostrado en la gráfica No.3 fué muy semejante.

Los resultados de la actividad metabólica (producción de CO₂) se muestran en la gráfica No.4, donde la cepa de *Bti.* silvestre presentó una mayor producción de CO₂, la cantidad más alta se detectó en el segundo día, disminuyó en el tercero y del cuarto al sexto la actividad se mantuvo constante, en el séptimo disminuyó, y se estabilizó del octavo al décimo. La cepa mutante de *Bti.* mostró un patrón de comportamiento muy semejante pero con menor cantidad de actividad, en ambas cepas puede detectarse la oxidación de dos fuentes de carbono presentes en el medio.

Las bioensayos de toxicidad de *Bti*. realizados contra *Aedes aegypti* mostraron que el formulado preparado con la cepa mutante de *Bti*. tuvo un buen rango de aceptación al igual que la cepa silvestre, con una LD₅₀ de 0.3392 y LD₉₀ de 2.430 para la segunda y una LD₅₀ de 0.3618 y LD₉₀ de 2.566 µgr/ml. para la primera.

Los analisis estadísticos de Probit realizados con los resultados de los bioensayos presentaron un intervalo de confianza de 95% para ambas cepas.

En los bioensayos realizados contra *Anopheles albimanus* no se encontró toxicidad.

Cuadro No.1
 Sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a diferentes dosis de irradiación con luz ultra violeta.

Tiempo de exposición en minutos	Resistencia a la radiación 253.7 nm.	Tiempo de exposición en minutos	Resistencia a la radiación 253.7 nm.
1.- 5	+	4.- 5	+
2.-10	+	5.- 10	+
3.-15	+	6.- 15	+
.-20	-	7.- 20	+
.-25	-	8.- 25	+
.-30	-	9.- 30	+
		10.-control sin irradiar	

+ resistencia a la radiación - sensibilidad a la radiación

Cuadro No.2

Patrón de resistencia y sensibilidad a antibióticos de mutantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>										
Antibiótico	cepas irradiadas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cefatoxima	R ⁺	R	R ⁺	S	R	R	R	R	S	S
ampicilina	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R
cefalotima	R ⁺	R ⁺	S	S	S	R	S	R	R	S
dicloxacilina	R ⁺	R ⁺	R ⁺	R ⁺	S	S	R	S	S	S
eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
gentamicina	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
lincomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
kanamicina	S	R	S	S	R	S	S	S	R ⁺	S
penicilina	R ⁺	R ⁺	S	S	S	S	S	R	S	S
estreptomina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
trimetoprim--- sulfametoxazol	S	R ⁺	R ⁺	S	R ⁺	R ⁺	R ⁺	S	S	S
tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

+ sensible - resistente + resistencia parcial

Cuadro No.3
 Resistencia de mutantes de *Bacillus thuringiensis* a
 diferentes agentes químicos

No. cepa	Parathión metílico 550 p.p.m.	Gentamicina 10 µgr.	Kanamicina 30 µgr.
1	+	+	-
2	+	-	+
5	+	-	+
6	+	+	-
9	+	+	+
10	-	-	-

+ resistencia

- sensibilidad

Cuadro No.4

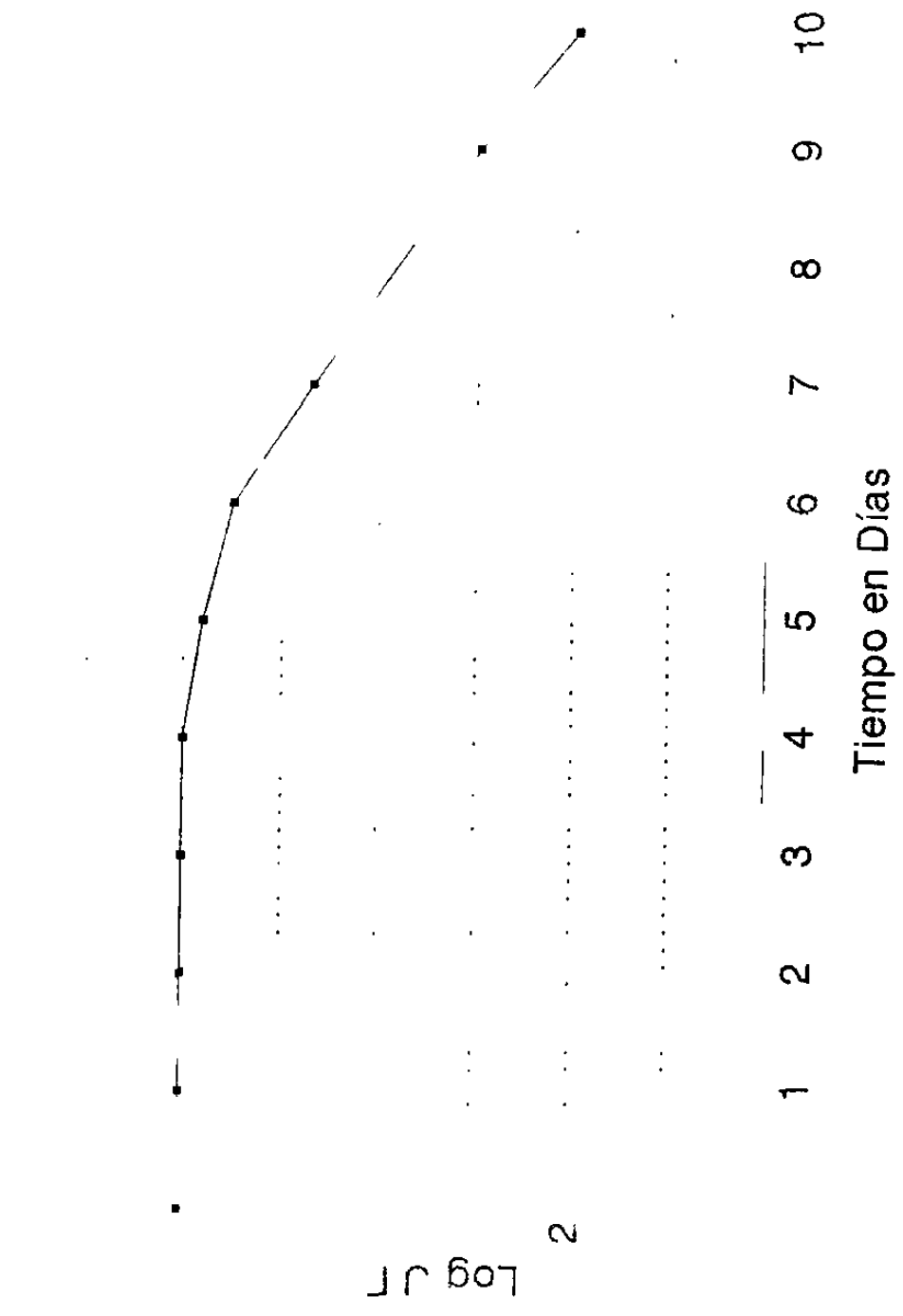
Mortalidad de larvas del tercer estadio y cuarto temprano de *Aedes aegypti* a las 24 horas después de la exposición a 2 formulados a base de *Bti*. Cepa 1 HD-14 y Cepa 2 HD-14 mutante.

Concentración en mg/lt.	No.de larvas tratadas	% de mortalidad Cepa-1 control	%de mortalidad Cepa-2 mutante
0.02	300	20	18
0.04	300	45	35
0.06	300	56	40
0.08	300	70	66
0.10	300	85	70
0.12	300	90	78
0.14	300	90	84
T	300	13	11

Cuadro No. 5
Resultados del análisis estadístico PROBIT
de los bioensayos de 2 cepas de *Bacillus*
***thuringensis* var. *israelensis* contra larvas**
de *Aedes aegypti*. Con un intervalo de
confianza del 95%.

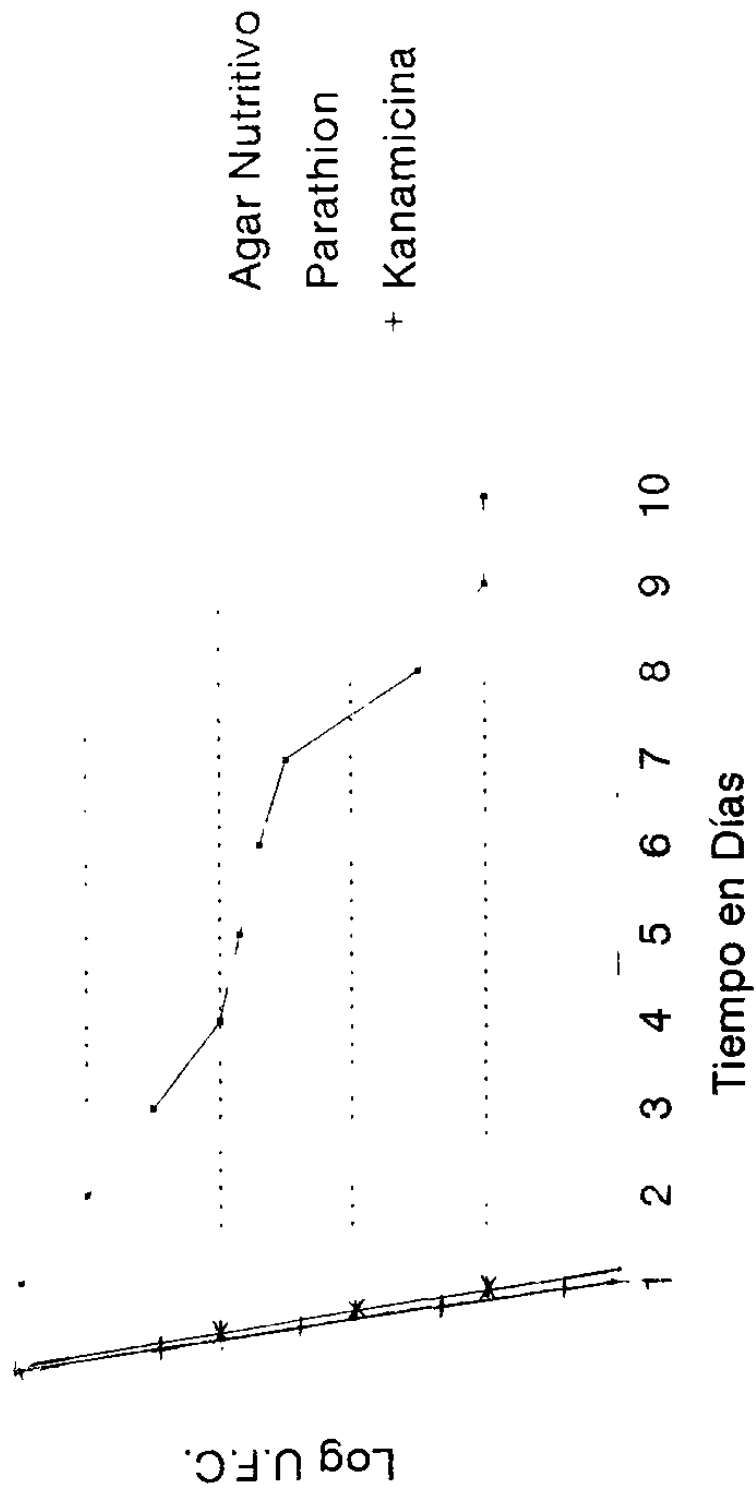
	Cepa-1	Cepa-2
PENDIENTE	1.45581	1.508115
INTERCEPCION	5.721832	5.665805
CHI CUADRADA	5.2338	3.8192
LD ₅₀ (PPM)=	0.3192802	0.3618416
LD ₉₀ (PPM)=	2.430187	2.566935
ERROR EST.	0.1431973	0.1537569
	7.782938	7.174998

Grafica No. 1
Sobrevivencia de la población esporulada natural en el
agu de prueba procedente del arroyo Los Cavazos



Grafica No. 2

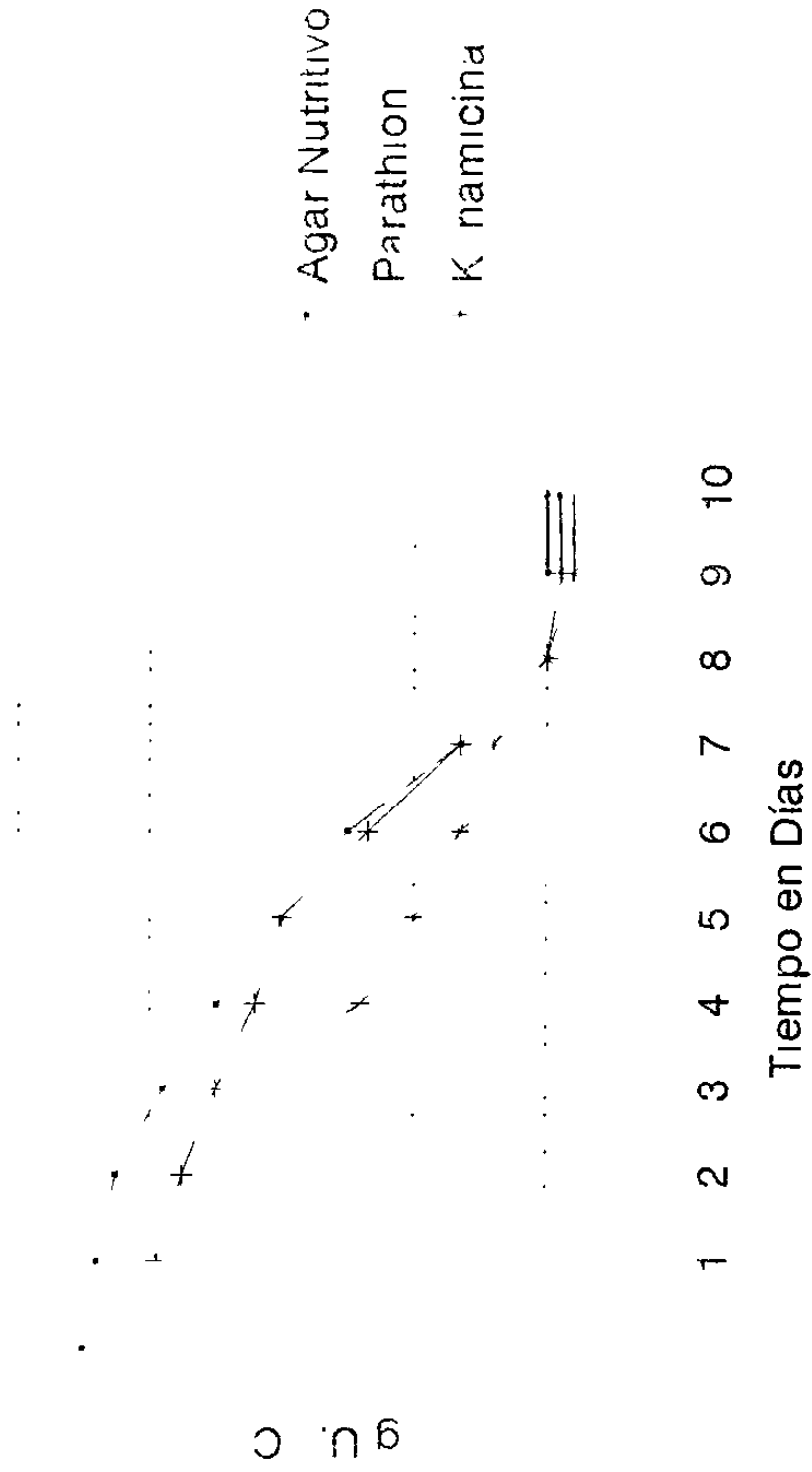
Monitoreo de la cepa silvestre Bti-HD-14 en agua de río



ad v representa el promedio de cuatro repeticiones

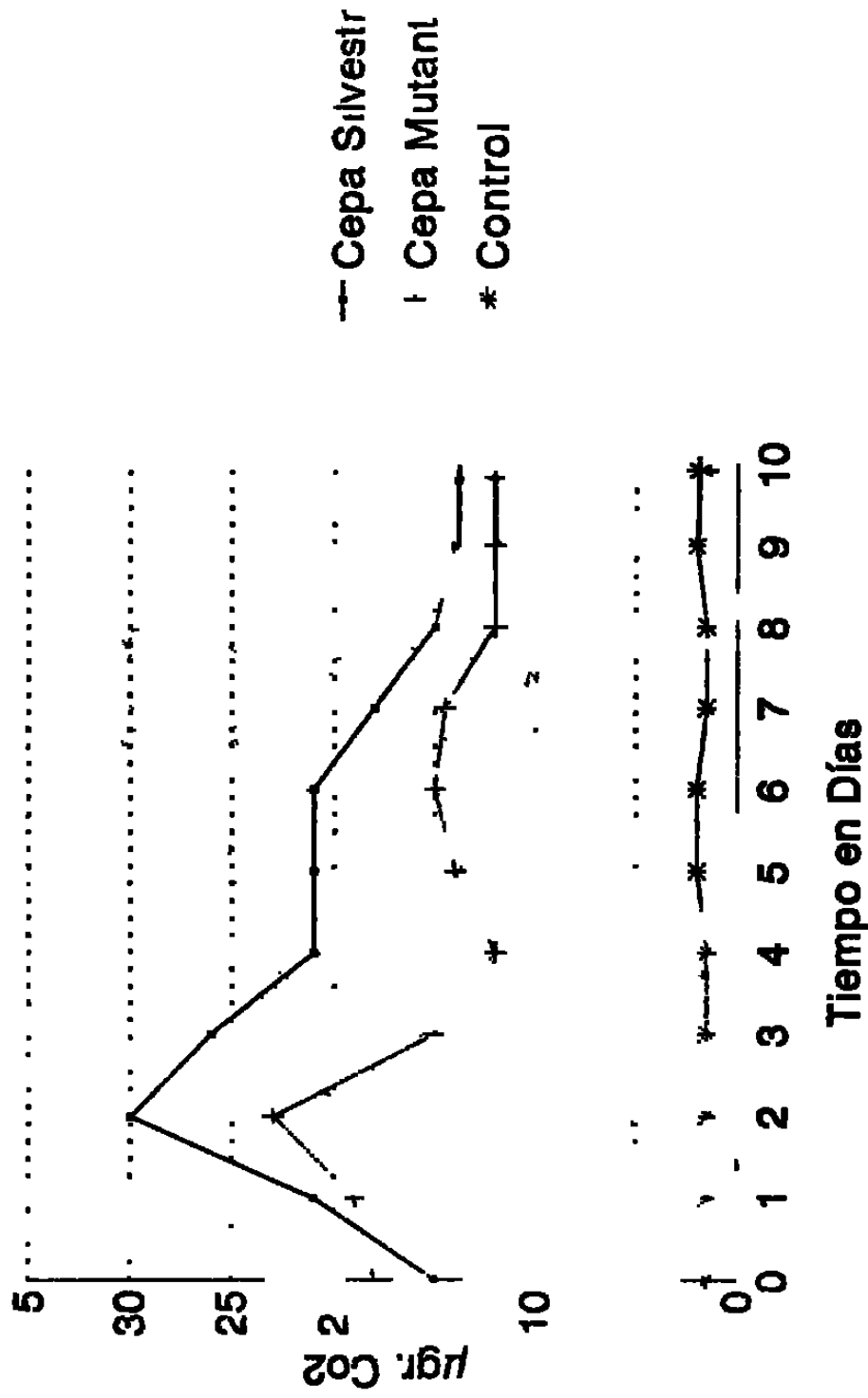
Gr a f i a o. 3

Monitoreo de la cepa mutante Bti-HD-14 en agua de río

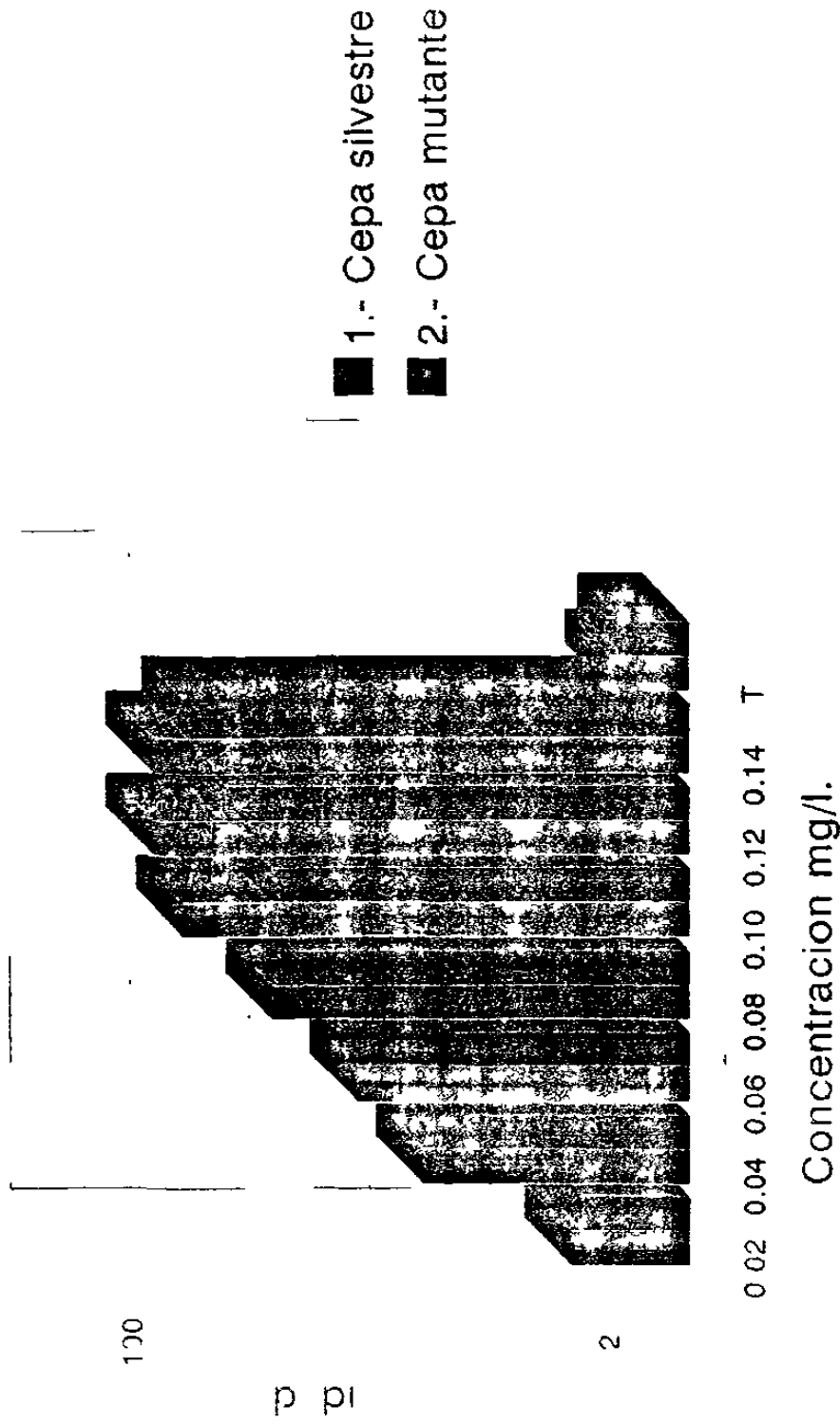


Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones

Grafica No. 4
Comparacion de la actividad metabolica presentada por Bti-HD-14
silvestre y con marcaje genético en agua esteril de rio



Gráfica No. 5



Mortalidad de larvas del tercer estadio y cuarto tempano de *Aedes aegypti* a las 24 horas después de la exposición a 2 formulados Bti-HD-14

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Al aplicar radiación ultra violeta en dos longitudes de onda en diferentes dosis sobre *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a baja frecuencia (253.7nm.) se produjeron daños que se manifestaron en falta de viabilidad, puesto que la radiación inhibió los mecanismos enzimáticos de reparación cromosómica. Las dosis letales aplicadas se registraron a más de 15 min. La cepa tratada con 375 nm. en diferentes tiempos no presentó alteración en cuanto a sobrevivencia, pero los efectos se manifestaron cuando las cepas se probaron en presencia de diferentes antibióticos, aunque el mecanismo enzimático de reparación funciona anulando los daños letales, es muy probable que las alteraciones en cuanto a sensibilidad, resistencia parcial o total a los antibióticos se deba a la formación de dímeros de timina que comúnmente se generan por el efecto de la radiación ultra violeta sobre el genoma bacteriano. (36).

Tanto la cepa silvestre de *Bti.* como las mutantes irradiadas presentaron resistencia al parathión metílico hasta 100 ppm.

La marcada resistencia al parathión metílico se debe a que una gran cantidad de microorganismos, entre ellos los esporulados como *Bacillus* tienen la capacidad de utilizar los pesticidas como sustrato, por cometabolización o como fuente de carbono, energía y, ocasionalmente de nitrógeno fósforo y azufre. (2). Las mutaciones favorecieron la capacidad de síntesis de enzimas para metabolizar el pesticida en concentraciones mayores, como se observa en el cuadro No.3, las cinco cepas toleraron 550 ppm. de parathión metílico.

En algunas de las mutantes resistentes al pesticida y antibióticos se disminuyó la síntesis del cristal, por lo tanto se seleccionó la cepa No. 2 que presentó mayor producción de δ -endotoxina.

En lo concerniente a las pruebas de sobrevivencia, la población esporulada nativa del agua de prueba se mantuvo constante durante 5 días debido probablemente al consumo de nutrientes, que disminuyeron lentamente hasta el décimo día.

En la gráfica No.2 se observa que aunque la cepa silvestre de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* posee resistencia natural al parathión las concentraciones seleccionadas de antibiótico y pesticida para la cepa mutante resultaron tóxicas inhibiendo completamente el crecimiento de la cepa silvestre. No obstante la cepa silvestre sobrevivió en agua de río durante 10 días, (gráfica No.2) pero en los recuentos se detectó una disminución poblacional más drástica que en las cepas nativas del agua de río (gráfica No.1).

La cepa mutante se mantuvo durante 10 días con recuentos poblacionales ligeramente mayores a la cepa silvestre, esto indica que de alguna manera las mutaciones favorecieron la capacidad de competencia contra la población nativa del agua. (gráficas No.2 y 3).

Por otra parte en la gráfica No. 4 se observa que la la cepa silvestre presenta mayores valores de actividad metabólica (producción de CO₂) que la cepa mutante, en ambos casos se detecta la utilización de dos fuentes de carbono, la primera posiblemente más simple que la segunda puesto que presentó una mayor capacidad de asimilación.

Aunque ambas cepas presentaron un patrón de actividad muy semejante, los valores alcanzados por la cepa mutante fueron menores en comparación con los obtenidos por la cepa silvestre, esto probablemente se debió a los efectos causados por la radiación aplicada durante el marcaje.

Los análisis de Probit realizados con los resultados de los bioensayos con *Aedes aegypti* mostraron que la potencia del bioinsecticida es aceptable, aunque la radiación pudo haber

disminuido ligeramente la capacidad de sobrevivencia no afectó la síntesis ni la toxicidad de la δ -endotoxina.

Los bioensayos realizados con *Anopheles albimanus* mostraron que ni la cepa silvestre ni la mutante tienen efecto tóxico contra dichas larvas, en este caso tampoco se alteró la toxicidad de la cepa probada.

Al analizar los resultados se concluyó que la sobrevivencia de *Bti.* es insuficiente para lograr un control biológico constante puesto que no alcanza poblaciones mayores a las que se introdujo inicialmente ya que sobrevive pero no coloniza el medio, aunque para afirmar esto es necesario realizar estudios con larvas de mosquito en el ambiente y controlando las concentraciones de materia orgánica, así como la temperatura y otros factores que pudieran afectar la colonización de *Bti.*

No obstante el uso de bioinsecticidas es el mejor camino para lograr un control efectivo en las plagas de insectos, (1,3,27).

En este trabajo se mostró como *Bti.* tiene suficiente capacidad para sobrevivir, aunque por periodos cortos en ambientes acuáticos naturales siempre que exista materia orgánica disponible en el medio. Es necesario para poder aprovechar mejor los controles biológicos realizar más estudios, ahora para verificar si durante su sobrevivencia se produce la síntesis y liberación del cristal.

Una posible alternativa son los estudios que se realizan mediante la introducción de genes procedentes de *Bti* en la cianobacteria unicelular *Agmenellum quadruplicatum*, el gen fusionado se expresa en altos niveles y los ensayos revelaron que las larvas de mosquito fácilmente ingieren la cianobacteria transformada conservando su toxicidad. (5,40).

Por otra parte se han clonado genes procedentes de *Bacillus sphaericus* y *Bti.* en plásmidos con amplio rango de hospedero y se introdujeron para su expresión en *Caulobacter crescentus* los recombinantes presentaron actividad tóxica contra larvas de mosquito. (40,41).

LITERATURA CITADA

- 1.- Abbott, Laboratories; (1988) "Una alternativa biológica para el control de mosquitos y mosca negra". Chemical and Agricultural Products Division. North Chicago, Il, 60064
- 2.- Alexander, Martin; (1980). "Introducción a la Microbiología del Suelo" A. G. T. EDITOR S.A. México 18 D.F.
- 3.- Aly, C., M.S. Mulla.; (1987). "Floating bait formulation increase efectivenes of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles* larvae." Journal of the American Mosquito Control Association. 3:583-588.
- 4.- Aranda, G.A.; (1986). "Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-7, GM-8 y GM-9 en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex p.* var. *quinquefasciatus*" Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 5.- C., Murphy, R; Stevens, Stevens, E., S; (1992). "Cloning and expression of the *cryIVD* gene de *Bacillus thuringiensis* subsp. *isrselensis* in the Cyanobacterium *Agmenellum cuadruplicatum* PR-6 resulting larvicidal activity Applied and Environmental Microbiology 58: 1650-1655
- 6.- Balaraman, K., S.L. Hoti.; (1988) "Competitive costs of mosquito control with larvicidal bacillus and insecticides"., The Environmentalist, 8: 123 - 126.
- 7.- Barak, Z., L., Blaustein.; (1980). "The fate of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the natural habitat". Ben Gurion University of the Negev. Beer Sheva, Israel.

- 8.- Barba Cabrera A. L.; (1983) "Identificación bioquímica y serológica de cinco cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelos de nuevo león". Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita)
9. Bosques, P.M.C.; (1985) "Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM 1, GM-6 y GM-10 en larvas de *Aedes aegypti* L. y *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus* say." Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. México. (Tesis Inédita).
- 10.- Castro, P. E.; (1986) "Toxicidad de trece nuevos aislados a partir de suelo y larvas enfermas, de *Bacillus thuringiensis* (GM-20 a GM-32)". Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. México. (Tesis Inédita).
- 11.- Cerda, M.A.; JM, Sánchez, Y. (1987). "Interacción biológica de *Bacillus thuringiensis* con microorganismos de suelo". Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. México. (Tesis Inédita).
- 12.- Cervantes, S.O.; (1985). "Toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Aedes aegypti* L y *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus*." Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 13.- Coronado, P.R.; JM, Sánchez, Y. (1984). "Sobrevivencia y colonización de *Rizobium phaseoli* en suelo y rizosfera de tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*)" Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita).

- 14.- Culebro, C.M de J., (1989) "Evaluación de laboratorio y campo de una formulación, a base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*". Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 15.- Cheung, V., P., & Hammock D.B , (1985) "Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -Endotoxina for control of mosquito larvae." *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 948 - 988.
- 16.-Davidson E., Yamamoto T.; (1984). "Isolation and assay of the toxic component from the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". *Current Microbiology*. 11: 171 - 174.
- 17.- Debach, P.; (1985) "Control biológico de plagas de insecto y malas hierbas". 12 impresión, Ed. C.E.C.S.A.
- 18.- De la Garza, L.S.; (1984) "*Bacillus thuringiensis* como agente de control microbiológico de insectos plaga" Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesina Inédita).
- 19.- Dulmage, H.T.; (1981). "Production de Bacteria for biological control of insects". Published by U.S.D.A., Brownsville, Texas, U.S.A. No.9.
- 20.- Dulmage, H.T.; and Aizawa, K.; (1980) "Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Nature. Published by U.S.D.A., Brownsville, Texas, U.S.A. No.4.

- 21.- Dulmage, H.T.; J. A. Correa and A.J. Martínez; (1970).
 "Coprecipitación with lactose as a means of revering
 the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*".
 Journal of Invertebrate Pathology; 15: 15 - 20.
- 22.- Dulmage, H.T.; A.A. Yousten,; S. Singer.; L.A. Lacey,; (1990).
 "Guideline for production of *Bacillus thuringiensis*
 H-14 and *Bacillus sphaericus*". UNDP / WORLDBANK / WHO.
 Special Program for Research and Training in Tropical
 Diseases (T D R).
- 23.-Faust. R.,M;;Mulla, L.A.Jr.; (1982) "Bacteria and their
 toxins as insecticides". pp. 75-208. In: Kurstak E. (ed),
 Microbial and Viral Pesticides New York: Marcel Dekker.
- 24.-Huguette de Barjac; (1989) "New facts and trends in
 bacteriological control of mosquitoes". Mem. Inst. Oswaldo
 Cruz . Rio de Janeiro 84: 101-105.
- 25.- Ibarra, J.E.; B.A. Federici ; (1985) "Isolation of a
 relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from
 the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* var.
israelensis." Journal of Bacteriology. 165: 527-533.
- 26.- Klein, M.T.; M. Alexander.; (1986). "Bacterial inhibitors
 in lake water". Applied and Environmental Microbiology
 52: 114-118.
- 27.- Kreig A.; Schnetter W.; (1987). "*Bacillus thuringiensis*
 var. *tenebrionis*, strain B1-256-82 a third pathotype
 within the H. serotype 8a 8b system" Applied
 Microbiology 9: 138 - 141.

- 28.- Lambert, B; Feferoen, M; (1992) "Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*". *BioScience* 42:112-121
- 29.- Leal, C., M.; JM. Sánchez, Y.; (1984), "Efecto de Biocidas En Un Fluido de Corte". Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 30.- L. Coch. T., "Mosquito pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". *Symposium: Microbial Control of Mosquitoes*.
- 31.- Marín, M. D; JM. Sánchez, Y.; (1985) "Efecto del riego con agua residual en la actividad metabólica de suelos agrícolas" Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 32.- Medrano, G; JM. Sánchez Y.; (1986) "Sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* en rizosfera de frijol *Phaseolus vulgaris* Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 33.- Mendoza, M. M., JM. Sánchez, Y.; (1985) "Resistencia a Antibióticos de *Bacillus thuringiensis* Como Marcadores Genéticos" Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 34.- Molly, D., P.; Struble, R., H; (1989). "Investigación of the feasibility of the microbial control of black flies (*Diptera: simuliidae*) with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the Adirondack mountains of New York" *Bull. Society Vector Ecology*. 14: 266 - 276.

- 35.- Mulla, S.; B.A. Federici.; (1982) "Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes". Applied and Environmental Microbiology 43: 1288 - 1292.
- 36.- Felczak., Reid., Chan., (1981) "Microbiología" Cuarta Edición Mc. Graw - Hill México.
- 37.- Pérez, O., C.; Rodríguez, T., M.; Galán, W., L. (1985) "Efecto de tres extractos de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Aedes aegypti* L. *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus* Say (*Diptera* : *Culicidae*) en condiciones de laboratorio". Folia Entomología Mexicana. 63: 75 - 81.
- 38.- Santos, Terreros J.G.; (1990) "Evaluación de laboratorio y campo de un formulado a base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 De Barjac (1982). en larvas de *Aedes aegypti* Lineo y *Culex quinquefasciatus* Say *Diptera Culicidae*". Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. México (Tesis Inédita).
- 39.- Smith. A. R., (1982).; "Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". Journal of Microbiology. 28: 1089-1092.
- 40.- S., Feitelson,; J. Payne,; K. Leo; (1992). "*Bacillus thuringiensis*; insects and beyond". Biotechnology 10: 271 - 275.

- 41.- Thanabalu, Thirumaram; J. Hindley,; Barnner, S.; (1992)
"Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae". Applied Environmental Microbiology 58: 905 - 910.
- 42.- Vandekar, M. ; H. T. Dulmage.; (1982) "Guidelains for production of *Bacillus thuringiensis* H-14" Public by UNDP/WHO Geneva Switzerland.
- 43.- Ward, E., S.; Ellar, D., J.; (1988) "Single amino acido changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxina affect the toxicity and expression of the protein" Journal Molecular Biology 202: 527- 535.
- 44.- Weinstein, S., A.; Bernheimer, A., W.; (1988). "Kinetics of hemolysis induced by a toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". Toxicon 26: 1177 - 1185.

