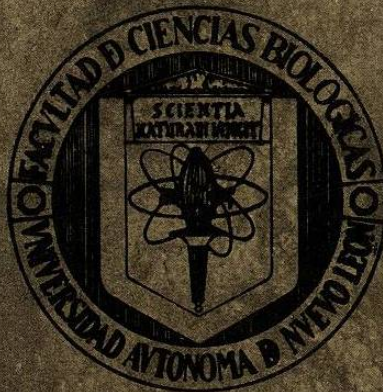


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"LA DELTA ENDOTOXINA DE Bacillus thuringiensis GM-2"

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

PRESENTA

Q.B.P. MARIVEL GOMEZ TREVIÑO

Monterrey, N. L.

Julio de 1989

FM

Z532

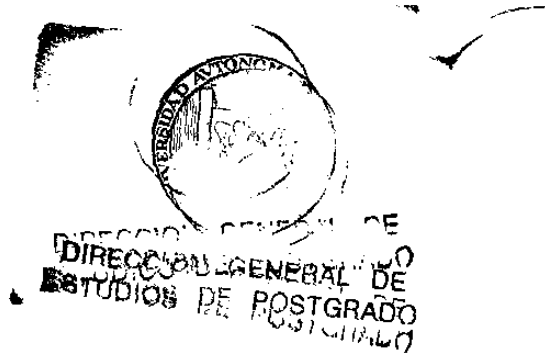
FCB

1989

G65

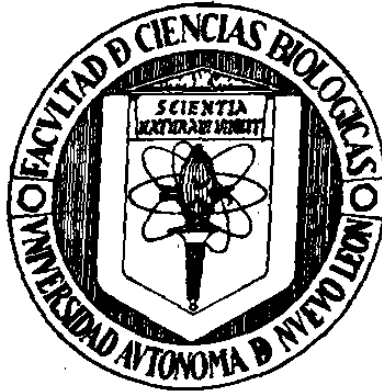
B10

282



DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO

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



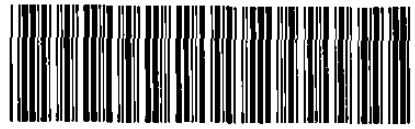
"LA DELTA ENDOTOXINA DE Bacillus thuringiensis GM-2"

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

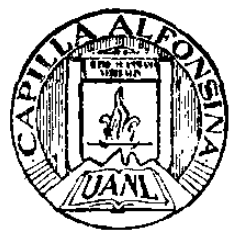
PRESENTA

Q.B.P. MARIVEL GOMEZ TREVIÑO

TM
25320
FCB
1989
G65



1020091389



FONDO TESIS

62912

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

La δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis GM-2

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

P R E S E N T A


Q.B.P. MARIVEL GOMEZ TREVIÑO



M.C. LUIS J. GALAN WONG
PRESIDENTE



DR. REYES S. TAMEZ GUERRA
SECRETARIO



M.C. LILIA H. MORALES RAMOS
VOCAL

DEDICATORIA

A Dios:

Porque creo en tí

A él Gracias.

A mis Padres:

Sr. Enrique Gómez de la Garza

Sra. Aurora Treviño de Gómez

Por su amor, comprensión y paciencia
que siempre me han brindado.

Con todo mi amor.

A mis Hermanos:

Enrique y María Dolores

César Javier e Isabel Cristina

Olga Yadira y Patricio

José Ricardo y Beatriz

Jesús Alberto

Alejandro

Aurora Carolina

Por el cariño y apoyo
de siempre.

A mis Sobrinos:

Con cariño.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al M.C. *Luis J. Galán Wong* mi más sincero y reconocido agradecimiento porque desde el inicio de mi carrera profesional ha sido siempre un ejemplo, gracias a su apoyo y orientación académica constantes he logrado llegar al término de una etapa más de mi formación profesional.

Al Dr. *Reyes S. Tamez Guerra* por su valiosa colaboración, asesoría y apoyo académico brindados siempre amablemente, por su interés en este trabajo.

A la M.C. *Lilía H. Morales Ramos* por su preocupación porque este trabajo pudiera salir adelante, ayudándome a vencer las barreras que se presentan en toda investigación.

A la Dra. *Ma. Cristina Rodríguez de Tamez* por su cooperación y consejos al presente trabajo.

A la Q.B.P. *Ma. Luisa Rodríguez Tovar* por su amable disposición para ayudarme en la realización de una parte importante de este trabajo.

Al M.C. *Jorge Miguel Saldaña Acosta* por su colaboración en este trabajo.

Al Q.B.P. *Juan Antonio Rodríguez Arzave* por permitirme utilizar parte del espacio y equipo del Departamento de Bioquímica.

Al Dr. *Guillermo A. Compeán Jiménez* por las atenciones brindadas durante el desarrollo del presente trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo por los momentos que juntos hemos compartido.

A la Sra. Yolanda Castillo de Hernández por realizar gentilmente la mecanografía de este trabajo.

A las Familias Torres González y García Garza por el apoyo y cariño brindados durante mis estudios.

Al Reverendo Jesús González por sus consejos.

A mis amigos.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL:
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y
DEL SUELO. DEPTO. DE MICROBIOLOGIA E INMU
NOLOGIA. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS,
U.A.N.L., BAJO LA DIRECCION DEL M.C. LUIS
J. GALAN WONG.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	3
ANTECEDENTES	4
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	19
DISCUSIONES Y CONCLUSIONES	22
APENDICE	25
LITERATURA CITADA	50
ABREVIATURAS	58

RESUMEN

Con el propósito de caracterizar bioquímicamente la δ -endotoxina de -- una cepa de Bacillus thuringiensis aislada de suelo designada como GM-2, -- la cual produce un cuerpo de inclusión paraesporal de forma rectangular rodeado por membranas y de compararla con Bacillus thuringiensis subsp. - - - morrisoni serotipo H 8a 8b con la que cruza por serología flagelar, sin embargo de acuerdo a las pruebas bioquímicas no corresponde a ninguna variedad previamente descrita. Para caracterizar la δ -endotoxina se purificaron cristales los cuales fueron analizados mediante métodos de solubilización y separación de cromatografía en columna, encontrándose que los cristales de GM-2 presentan una proteína con un peso molecular de 47,000 Da, bajo un método de solubilización más drástico se degradó en dos proteínas, una de - - 30,000 Da y otra más pequeña (20,000 \pm 5,000 Da), mientras que por el mismo método de solubilización, la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis - -- subsp. morrisoni presentó una proteína con un peso molecular de 135,000 Da, además los bioensayos contra larvas de Aedes aegypti y Trichoplusia ni con Bacillus thuringiensis GM-2 no presentaron mortalidad mientras que - - - - Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni fué tóxico a larvas de - - - - - Trichoplusia ni. Por lo anterior concluimos que la δ -endotoxina de la cepa de Bacillus thuringiensis GM-2 es diferente a la δ -endotoxina de - - - - - Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni en cuanto a composición bioquímica y actividad tóxica para insectos.

I N T R O D U C C I O N

El control microbial de insectos plaga de importancia agrícola, médica y forestal, provee en la actualidad una alternativa al uso excesivo de los insecticidas químicos, los cuales han causado grandes daños ecológicos. Dentro del control microbial se ha destacado una bacteria esporulada denominada Bacillus thuringiensis que se caracteriza por producir un cuerpo de inclusión (δ -endotoxina) que presenta actividad bioinsecticida.

Las formulaciones a base de este microorganismo son utilizadas por su modo de acción selectiva hacia insectos plaga sin causar daños a otras especies animales o vegetales y/o contaminar el medio ambiente. En algunos países la producción de preparaciones comerciales a partir de esta bacteria han comenzado a sustituir gradualmente en el mercado a los insecticidas químicos.

Se han descrito numerosas cepas de Bacillus thuringiensis las cuales se han clasificado dentro de subespecies por serología flagelar complementándose por pruebas bioquímicas, sin embargo, hay cepas clasificadas dentro de la misma subespecie que contienen proteínas diferentes en el cuerpo de inclusión y diferencias en cuanto a toxicidad hacia la misma especie de insectos. Esto ha llevado a realizar estudios dirigidos a analizar en que parte del cuerpo de inclusión producido por este microorganismo radica la actividad tóxica hacia los insectos.

El objetivo principal del presente trabajo, fué determinar la composición protéica y la toxicidad hacia insectos de importancia en Agricultura y Salud Pública de la δ -endotoxina de una cepa nativa de -----
Bacillus thuringiensis denominada GM-2, la cual tiene como característica poseer un cuerpo de inclusión con morfología rectangular rodeado por membranas diferentes a las reportadas internacionalmente y comparar su constitución con la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni serotipo H 8a 8b con la que cruza por serología flagelar.

H I P O T E S I S

Suponemos que la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis GM-2 está constituida por diferentes proteínas a las reportadas para Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni

ANTECEDENTES

El descubrimiento de Bacillus thuringiensis es acreditado al investigador Ishiwata en Japón, quién en 1901, aisló una bacteria aeróbica formada de esporas a partir de larvas enfermas del gusano de seda (Bombix mori) y la denominó Bacillus sotto. En 1911, Berliner aisló una bacteria de una mariposa Ephestia kuniella enferma, y posteriormente en 1915, la denominó Bacillus thuringiensis. La describe como un bacilo esporulado gram positivo, con flagelos peritricos, observando que después de terminar su crecimiento vegetativo, el bacilo contiene, además de la espora una inclusión paraesporal la cual designó como " Restokoper " o cuerpo de desecho de inicial forma esférica y romboidal posteriormente. También en 1915, Aoki y Chigasaki demostraron que cultivos viejos de Bacillus sotto contenían una sustancia tóxica que causaba muerte en insectos. En 1927, Mattes confirmó lo de Berliner, observando además que el crecimiento del cuerpo de desecho cambia también la posición de la espora (17,19,24,46).

En 1946, Smith et al describen a Bacillus thuringiensis como una variedad de Bacillus cereus, porque independientemente de su patogenicidad para ciertos insectos y forma oblicua de la espora en las células, era muy similar a Bacillus cereus. En 1951, Toumanoff y Vago proponen dividir a Bacillus thuringiensis en variedades diferentes, logrando aislar un microorganismo entomopatígeno formador de esporas a partir de larvas enfermas del gusano de seda, encontrando similitudes entre el Bacillus sotto de Ishiwata, el Bacillus thuringiensis de Berliner y este nuevo aislamiento al cual denominaron Bacillus cereus var. alesti y en 1952, Toumanoff sugirió que los cultivos aislados por Ishiwata, Berliner, Vago y de él mismo, eran todas variedades pertenecientes a Bacillus cereus (17,19,24).

En 1953, Hannay al estudiar la esporulación de esta bacteria confirma las observaciones de Berliner y sugiere por primera vez que la patogenicidad de este microorganismo podía estar asociada con los cristales en forma de diamante que se formaban durante el proceso de esporulación (24). En 1954, Angus demostró que las observaciones de Aoki y Chigasaki, así como de Hannay acerca de la relación entre el cristal y patogenicidad hacia el

insecto eran válidas. La toxicidad para el insecto está principalmente asociada con el cuerpo de inclusión del bacilo, el cual debe primero ser solubilizado por el jugo intestinal del insecto para activarse. En 1955, Hannay y Fitz-James reportan que la inclusión cristalina es de naturaleza proteica y su ingestión es suficiente para causar la muerte en larvas susceptibles de insectos lepidópteros; también publican las primeras microfotografías del cristal que tiene una forma regular bipiramidal cuya estructura superficial está formada por estrías en dirección paralela a la base del cristal (24, 46).

En 1958-1959, Heimpel y Angus proponen que los bacilos entomopatógenos podían estar relacionados con Bacillus cereus, sin embargo presentaron dos importantes diferencias, eran patógenos a insectos y producían un cuerpo paraesporal dentro de las células, lo cual permitió colocarla como una especie separada (25).

En 1962, H. de Barjac y Bonnefoi realizaron un estudio de clasificación con 24 cepas diferentes de Bacillus thuringiensis mediante pruebas bioquímicas y serológicas, (Antígeno flagelar H) concluyen que el método serológico es rápido y adecuado para la identificación y separación de las cepas de Bacillus thuringiensis en variedades y que las pruebas bioquímicas deberían considerarse como parte complementaria del proceso de identificación. En 1963, Norris y Burges proponen que existen diferentes patrones electroforéticos de la enzima esterasa producido por las células vegetativas de Bacillus thuringiensis, y que esto podría ser utilizado para distinguir las variedades diferentes de este microorganismo, finalmente concluyen que existe una relación estrecha entre la clasificación serológica y análisis de esterases (15, 40).

En 1967, Heimpel propone que la toxina producida por Bacillus thuringiensis sea llamada δ -endotoxina, sin embargo también se ha sugerido que solo la porción activa del cristal debe ser considerada como δ -endotoxina (19, 37).

La serología del cristal se ha relacionado con el espectro de toxicidad

dad y se considera una herramienta taxonómica de importancia. En 1977, - - Krywienczyk realizó un amplio estudio serológico del cristal de 332 aislamientos de Bacillus thuringiensis proporcionando características que permiten clasificarlos en grupos diferentes, los cuales corresponden en su mayoría con subespecies por serología flagelar. En 204 aislamientos identificados el antígeno flagelar y el antígeno del cristal fueron específicos para la misma variedad, en 38 aislamientos el antígeno del cristal fué diferente del antígeno flagelar o presentaban cristales de composición antigénica mixta (33). Se han realizado estudios utilizando anticuerpos monoclonales para el análisis detallado de la relación entre la estructura y la función de la toxina de Bacillus thuringiensis, en 1983, Huber-Lukac et al seleccionan 8 líneas celulares híbridas que secretan anticuerpos monoclonales directos contra la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis, la especificidad de cada anticuerpo monoclonal para la toxina y la protoxina fué establecida por medio de un estudio por ELISA (27).

En 1986, la especie de Bacillus thuringiensis es caracterizada en la novena edición del Manual de Bergey's como diferente a Bacillus cereus por la patogenicidad a larvas de lepidópteros y por la producción dentro de la célula de un cristal paraesporal de proteína, (rara vez dos o tres), paralelo con la formación de la espora. Bacillus thuringiensis es clasificado de acuerdo al antígeno flagelar H, forma del cristal, número de antígenos, ciertas propiedades fenotípicas y patrones de DNA de plásmidos, éstos pequeños grupos han sido llamados variedades y subespecies. En 1986, - - - - - Burges utiliza el término de variedades para describir a grupos de cepas de Bacillus thuringiensis basados en el antígeno flagelar, pero que de - - acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura de Bacteria solamente el - término " Subespecie " (subsp) es apropiado para subgrupos taxonómicos de Bacillus thuringiensis. Hasta 1987, H. de Barjac reporta 24 serotipos de Bacillus thuringiensis basados en el antígeno H, de los cuales algunos están divididos por subfactores antigénicos (Tabla 1). (1, 10):

Cuando Bacillus thuringiensis se propaga en un medio de cultivo artificial durante un período de crecimiento se lleva a cabo la formación de - la espora y el cristal los cuales son liberados al medio del cultivo des--

pués ocurre la lisis celular. Para efectuar los estudios sobre el cristal es necesario contar con una pureza de los mismos, sin embargo existen algunas dificultades para eliminar las esporas, debido a sus propiedades similares de tamaño y características superficiales. Los primeros intentos para resolver este problema se basaron en sistemas de separación difásicos, empleando una amplia variedad de solventes orgánicos y polímeros de alto peso molecular. En 1957, Vanková introduce la centrifugación con gradientes de densidad de sacarosa, mientras que en 1966, Pendelton y Morrison proponen un método basado en la hidrofobicidad de las esporas (39, 44).

En 1972, Fast recomienda la purificación del cristal usando ultracentrifugación isopícnica en gradientes de cloruro de cesio y en 1975, Sharpe et al recomiendan el mismo método en gradientes de renografin, mientras que Nishitsutsuji-~~Wo~~ y ~~Wakisaka~~ utilizan mutantes no esporuladas para facilitar mayormente la purificación de cristales (20, 48, 53). Estos métodos fueron útiles para purificar cristales, sin embargo los tubos de gradientes son intrínsecamente limitados en su capacidad. En 1978, Ang y Nickerson reportan que utilizan centrifugación zonal en gradientes de bromuro de sodio, presenta además como ventaja la eliminación de las proteasas producidas durante el proceso de esporulación (2).

En 1980, Rao y Shethna describen una técnica basada en la agregación específica de cristales en columna con amortiguador salino (47). En 1984, Mahillon y Delcour describen un método simple y rápido para el crecimiento, esporulación y autólisis de Bacillus thuringiensis en el cual los cristales y las esporas pueden ser separados por centrifugación en Urografin - - (38).

Los estudios sobre composición de aminoácidos presentes en el cristal han demostrado una diferencia no significativa entre las variedades de - - Bacillus thuringiensis encontrándose que el ácido glutámico y ácido aspártico forman más del 20% de los aminoácidos y son los responsables del bajo punto isoeléctrico 4.4, la cantidad de cisteína es extremadamente baja (menor del 2%) lo que produce una alta insolubilidad del cristal; aparte de su composición proteínica existen evidencias que contiene otras sustancias (37).

En 1977, Bulla et al reportan la presencia de un 5.6% de carbohidra--tos, pero existe la posibilidad que estos sean incorporados dentro del cris--tal como impurezas durante el proceso de esporulación. El cristal también --se caracteriza por su extrema insolubilidad lo cual dificulta el trabajo --analítico, desarrollándose actualmente métodos químicos y enzimáticos para su solubilización (9).

Se conoce que el cristal es tóxico a un amplio rango de larvas de lepi--dópteros por ingestión, pero atóxicos cuando son inoculados dentro del hemo--cele del insecto, en base a esta observación, Angus (1954) sugiere que el cristal es una protoxina, requiriéndose su activación en el intestino de la larva del insecto susceptible para liberar la toxina, tomando en cuenta esta hipótesis todos los estudios del cristal de Bacillus thuringiensis se --han enfocado hacia la identificación, aislamiento y caracterización de las subunidades tóxicas (3).

El cristal produce un número variado de subunidades de proteína con un peso molecular de 1000 a 200,000 Daltons, ésto depende del método empleado para la solubilización (46). La cromatografía de exclusión molecular o --filtración en gel se ha utilizado para preparar fracciones de proteína para un rango restringido de peso molecular. En 1967, Watanabe et al reportan --que el cristal de Bacillus thuringiensis var. sotto, en solución a pH 11.5 y por cromatografía a pH 7.8 presenta 2 componentes tóxicos. En 1968, - - - Cooksey encuentra similares resultados con el aislamiento de Mattes, y So--merville et al, al trabajar con Bacillus thuringiensis var. alesti, encuen--tra que la proteína fué excluída del Sephadex G-100 y G-200, ésto demuestra lo difícil de trabajar con cristales disueltos (11).

En 1972, Glatron et al indican que el cristal de Bacillus thuringiensis var berliner se encuentra formado por una subunidad repetitiva con peso - - molecular de 80,000 Da utilizan para hidrolizar el cristal tratamiento con mercaptoetanol e hidrocioruro de guanidina (22). Más tarde en 1974, Faust et al realizaron varios tratamientos para la degradación de cristales de --Bacillus thuringiensis var. kurstaki, sus resultados indican que después --del tratamiento alcalino (0.05 - 0.1 M NaOH) fué donde se encontró una --

mayor toxicidad, la que fué asociada con una proteína de un peso molecular de 230,000 Da, cuando realizaron la digestión de los cristales en jugo intestinal de Bombix mori encuentran resultados similares, 5 proteínas causaron toxicidad y presentaron un peso molecular de 235,000, 77,000, 30,200, 5,000 y 1,000 Da, cuando la degradación la realizaron con diferentes enzimas encontraron de 2 a 4 componentes tóxicos con peso molecular entre --- 235,000 a 1,000 Da (21).

En 1977, Chestukhina et al trabajan con cristales de --- Bacillus thuringiensis var galleriae y efectúan una completa disolución de los cristales bajo la acción de soluciones alcalinas (pH 12), la influencia simultánea de agentes desnaturalizantes y reductores, con el método de electroforésis en gel de poliacrilamida encuentran también que los cristales consisten de un 65% de proteína con un peso molecular de 120,000-140,000 Da, 8-10% de proteína de 65,000 Da y un menor número de componentes --- con peso molecular de 65,000 a 340,000 Da (12).

En 1979, Bulla et al aísla por cromatografía de filtración y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y determina que la toxina de --- Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki presenta un peso molecular de 68,000 Da, además hipotetiza que el cristal está compuesto de una repetida --- subunidad (protoxina) que es transformada a un compuesto más pequeño, por disolución con agentes reductores y desnaturalizantes, obtiene una máxima solubilización 5 h después de haber tratado con NaOH, bajo una prolongada incubación de hasta seis días, la protoxina fué convertida a toxina, y resulta tóxica a larvas por ingestión del gusano cogollero --- (Spodoptera frugiperda) (8).

La patogenicidad de las cepas de Bacillus thuringiensis aisladas durante un largo período (serotipo H 1 a H 13) fueron activas solamente --- contra larvas de lepidópteros comparadas con el Bacillus prototipo descrito por Berliner (1915), sin embargo en 1977, Goldberg y Margalit en Israel descubren un aislado nuevo tóxico para larva de mosquito y mosca --- negra, esto implicó un nuevo serotipo H 14 descrito por H de Barjac (1978) se denominó Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (23, 34).

En 1981, Yamamoto y Mc Laughlin al trabajar con cristales solubilizados con mercaptoetanol y NaOH de Bacillus thuringiensis var. kurstaki, encuentran cuatro picos durante la filtración en gel, un ensayo inmunoelectroforético indica que los primeros dos picos designados como P-1 y P-2 son antígenicos e igualmente tóxicos a larvas del falso medidor de la col (Trichoplusia ni), los picos tres y cuatro parecen ser ácidos nucleicos por el espectro en el análisis de absorbancia y carecen de toxicidad. El peso molecular para P-1 fué de 135,000 Da y el de P-2 fué de 65,000 Da, P-1 está compuesto de dos partes: una resistente a proteinasas de 62,000 Da y otra sensible a proteinasas de 73,000 Da, P-2 resultó tóxico a larvas de mosquito y se designó factor mosquito; se presenta en cristales de tipo K-1 producidos por Bacillus thuringiensis var. kurstaki y var. thuringiensis (59).

En 1982, Padua et al en Filipinas aísla una cepa de Bacillus thuringiensis denominada PG-14 y corresponde al serotipo H 8a 8b subsp. morrisoni, ésta fué recuperada de una muestra de suelo, produce un cristal esférico e irregular altamente tóxico a larvas de mosquito, su toxicidad es igual que la reportada para Bacillus thuringiensis subsp. israelensis serotipo H 14; recientemente en 1987, Yu et al establece que la actividad tóxica de Bacillus thuringiensis PG-14 hacia mosquitos radica principalmente en una proteína de 65,000 Da y la actividad hemolítica en una proteína de 25,000 Da (42, 43).

En 1983, Yamamoto e Iizuka por medio de una extracción selectiva y microscopía electrónica demuestran que P-2 no forma parte del cristal bipyramidal el cual consiste solamente de P-1, además es solubilizado por tratamiento alcalino sin agentes tiol (56). En 1983, Yamamoto realiza un amplio estudio con cristales de variedades diferentes de Bacillus thuringiensis y encuentra que la mayoría contiene solamente P-1, y algunas variedades como kurstaki, thuringiensis, kenyae, tolworthi, producen una proteína adicional (P-2), ésta fué serológicamente similar al factor mosquito previamente descubierto en la var. kurstaki (HD-1), ambas proteínas (P-1 y P-2) fueron digeridas con tripsina y separadas por cromatografía líquida de alta resolución encontrando diferencias entre las toxinas de P-1 aún en cepas de -

igual serotipo; en cuanto a P-2, su producción es independiente de P-1, y se sugirió que la información genética para P-2 es codificada por un plásmido o DNA cromosomal diferente al de P-1 (55). En 1983, Yamamoto et al analizan la composición de proteína del cristal de varias mutantes de Bacillus thuringiensis var. israelensis establece que la pérdida de actividad contra mosquitos está asociada con la pérdida de una proteína de 28,000 Da (57).

En 1983, Tojo y Aizawa, trabajan con cristales de Bacillus thuringiensis var. krustaki, solubilizados en jugo intestinal del gusano de seda (Bombix mori) encuentran que después de disolver los cristales aparece una proteína tóxica con peso molecular de 50,000 Da (51).

En 1983, Krieg et al en Alemania aislan una cepa nueva de Bacillus thuringiensis de Tenebrio molitor (Coleleóptera: Tenebrionidae), la cual produce un cristal paraesporal de forma cuadrangular y contorno liso, de acuerdo a características bioquímicas corresponde a una subespecie nueva que fué denominada Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis, es activa solamente contra larvas de Chrysomelidae (Coleóptera) y pertenece a un nuevo patotipo denominado patotipó " C " (31). En 1988, Li et al concluyen que el cristal paraesporal de Bacillus thuringiensis var. tenebrionis presenta una δ -endotoxina con un peso molecular de 67,000 Da (36).

En 1984, Davidson y Yamamoto por medio de cromatografía en columna -- sephacril S-200 seguida por DEAE-celulosa aislan un fragmento de 25,000 Da de la proteína tóxica de 28,000 Da del cristal de Bacillus thuringiensis var. israelensis demuestran que este fragmento de 25,000 Da presenta actividades citolítica, hemolítica, insecticida y letal en ratón, ésta proteína es rica en aminoácidos como ácido aspártico y glutámico (13).

En 1985, Armstrong et al describen un procedimiento para la purificación de una forma de δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, el cual presenta toxicidad a cultivos de células y larvas de mosquito, causa lisis en eritrocitos y muerte en ratón. El extracto de proteína fué tratado con álcali, neutralizado e incubado con tripsina y pro--

teínasa K, después purificado por filtración en gel y cromatografía en columna DEAE, obtienen 2 proteínas tóxicas: las proteínas 25a y 25b, ambas -- presentan un peso molecular cercano a 25,000 Da en SDS-PAGE, son serológicamente relacionados y presentan perfiles similares con una digestión con proteasa de S. aureus y SDS, además contienen una secuencia idéntica de 10 aminoácidos. Sin embargo una diferencia entre la proteína 25a y 25b es la presencia de residuos de arginina y valina en los aminoácidos terminales de la molécula 25a. El Western Blot ELISA con anticuerpos monoclonales de la proteína 25a indican que 25a y 25b son productos de división derivados de una proteína de 26,000 Da para Bacillus thuringiensis subsp. israelensis HD916 y de 28,000 Da en Bacillus thuringiensis para la cepa de Abbott (4).

En 1985, Pfannestiel et al estudian la toxina - - - - - Bacillus thuringiensis var. israelensis y su estabilidad después del tratamiento químico, encuentran que la toxina no es activada por agentes sulfhidrilo, la toxina fué resistente a concentraciones altas de sal (8 M NaBr), solventes orgánicos (40% Metanol), desnaturalizantes (4 M Urea) y detergentes neutros (10% de tritón X-100), sin embargo fué inactivado por detergentes cargados positiva y negativamente, así como por hidrocioruro de guanidina (45).

En 1985, Tojo investiga la liberación y descomposición de una proteína con peso molecular de 59,000 Da de Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (HD-1) en jugo intestinal del gusano de seda Bombix mori usando ELISA y bioensayos, sus resultados sugieren que el método de ELISA para P-59 es -- efectivo para estimar la actividad de preparaciones - - - - - Bacillus thuringiensis hacia insectos lepidópteros (50). En 1986, Visser et al reportan la separación y propiedades tóxicas de 4 componentes del cristal de proteína de Bacillus thuringiensis var. israelensis, la cual contiene 3 proteínas de peso molecular de 230,000, 130,000 Da con actividad tóxica a mosquitos y una de 28,000 Da con actividad hemolítica; éstas proteínas fueron solubilizadas de cristales incubándose en 10 mM DTT, pH 9.5 y purificadas por centrifugación en gradientes de sacarosa (52).

En 1986, Herrnstadt et al reportan el aislamiento de una cepa de - - -

Bacillus thuringiensis con actividad tóxica para coleópteros pero no contra lepidópteros ni dípteros, este nuevo aislado fué designado como - - - - - Bacillus thuringiensis var. san diego, sus cristales son en forma de rectángulo plano y diferente a la estructura bipiramidal de los cristales de cepas de Bacillus thuringiensis tóxicas a lepidópteros, el cristal de esta variedad presenta una proteína con un peso molecular de 64,000 Da con actividad insecticida hacia coleópteros (26).

En 1987, Krieg et al proponen que de acuerdo al rango de hospedero - - - - - existen 3 patotipos diferentes de Bacillus thuringiensis dentro del serotipo H 8a 8b: Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (aislados G-2 y - - - - - morrisoni). Patotipo "A" (Patógenas solo para larvas de lepidópteros), - Bacillus thuringiensis (Cepa PG-14) Patotipo "B" (Patógena solo para larvas de Nematóceras, Díptera) y Bacillus thuringiensis (cepa B1256-82) Patotipo "C" (Patógena solo para larvas de Chrysomelida, Coleóptera). Los cristales paraesporales de los 3 patotipos difieren en morfología, patrón de proteína y serología (32).

En 1987, Ohba et al reportan el aislamiento de dos cepas de - - - - - Bacillus thuringiensis que producen una inclusión típicamente romboidal sin toxicidad contra Bombix mori, Musca doméstica, Aedes aegypti, y - - - - - P. tibialis, este cristal contiene una proteína de 60,000 Da y algunas proteínas menores (41).

En 1987, Hurly et al describe la purificación por homogeneidad electroforética, filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico de 2 proteínas del cristal de Bacillus thuringiensis subsp. israelensis; una proteína con un peso molecular de 68,000 Da que no presenta actividad citolítica y una pequeña proteína con un peso molecular de 28,000 Da con alta actividad citolítica, estas proteínas fueron ensayadas contra larvas de - - - - - Aedes aegypti, la proteína grande fué al menos cien veces más tóxica que la pequeña, una mezcla de las dos proteínas puras fueron significativamente más tóxicas a larvas de mosquitos que la proteína sola (28).

Recientemente en 1988, Donovan et al reportan una nueva cepa de - - - - -

Bacillus thuringiensis aislada a partir del polvo de grano de haba y tóxica para larvas del escarabajo colorado de la papa - - - - -
(Leptinotarsa decemlineata), esta cepa sintetiza dos cristales paraesporales de proteína; un cristal de forma romboidal compuesto por una proteína de 73, 116 Da y uno plano forma de diamante compuesto de 30,000 Da (18).

MATERIAL Y METODOS

BACTERIAS USADAS:

Las cepas de Bacillus thuringiensis utilizadas en el presente trabajo fueron: Bacillus thuringiensis clave GM-2 cepa nativa aislada a partir de suelo agrícola de General Terán, N.L. (México) (5), - - - - - Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (HD-12), Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (HD-1), Bacillus thuringiensis subsp. israelensis - - - (HD-654), proporcionadas estas últimas por el Dr. Howard T. Dulmage del Depto. de Agricultura de Weslaco Texas, E.U.A.

Las cepas fueron conservadas por resiembras periódicas cada 3 meses - en tubos de ensaye con agar nutritivo inclinado pH 7 (Merck), y mediante liofilización (utilizando como soporte leche desnatada estéril al 10%), y se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Se realizaron observaciones morfológicas de las células vegetativas, esporas y cristales de las diferentes cepas al microscopio.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA:

Para Bacillus thuringiensis GM-2 las pruebas bioquímicas que se efectuaron primeramente fueron las correspondientes para la especie del género Bacillus de acuerdo al manual de Bergey's y posteriormente las pruebas para variedad establecidas por H. de Barjac y Krieg, éstas últimas también se realizaron para Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (7,15,16,30).

IDENTIFICACION SEROLOGICA:

Esta se realizó con la preparación del antígeno flagelar o antígeno H de las cepas de Bacillus thuringiensis de referencia internacional y de -- Bacillus thuringiensis GM-2 (6).

MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO:

Las cepas fueron actividades en tubo de agar nutritivo inclinado durante 18-24 h a 30°C, para la preparación del inóculo, se toma una asada a partir de éste y se pasa a un matrás con leche peptonizada (Sheffield - - Products). El cual es mantenido en agitación rotatoria a 200 rpm. (Lab--

Line Incubator), durante 18-24 h a 30°C para después transferir un inóculo de 0.5% al medio de producción que contiene: Leche peptonizada 1 gr/lto., glucosa 0.5 g/lto., extracto de levadura 0.2 gr/lto., $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02 gr/lto) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 gr/lto) (56, 58). Se mantienen en agitación rotatoria a 250 rpm. durante 48-72 h a 30°C. Después de la lisis celular la mezcla de cristales y esporas son recuperadas por centrifugación a 10,000 rpm. (Centrífuga Beckman J2-21) por 30 minutos a 3°C (Figura 4).

METODO DE PURIFICACION DE LOS CRISTALES PARAESPORALES:

Una vez recuperado el precipitado se resuspende en NaCl 1M y se centrifuga, este tratamiento se repite 3 veces y el precipitado se resuspende en agua destilada pH 7, se pasa a un embudo de separación y se agita para formar espuma con el fin de descartarla ya que esta contiene esporas, este procedimiento se repite 8 a 10 veces, finalmente los cristales se purifican parcialmente por flotación (56). El aislamiento de cristales puros se realiza por ultracentrifugación en gradiente de densidad de NaBr (30-36%) (2) a 25,000 rpm. por 90 minutos (Ultracentrífuga Beckman L5-50E). Las bandas resultantes se colectan mediante un fraccionador de gradientes (ISCO) y se examinan al microscopio de luz, la banda de los cristales se concentra y se lava con H_2O destilada pH 7 a 30,000 rpm. por 30 minutos, después se dializa contra agua destilada y se liofiliza, se guarda a -20°C hasta su uso (Figura 5).

SOLUBILIZACION DE CRISTALES:

Los cristales purificados (4 o 5 mg de c/u) de Bacillus thuringiensis GM-2, subsp. morrisoni (HD-12), subsp. kurstaki (HD-1) y subsp. - - - israelensis (HD-654) fueron disociados en 2% de 2 mercaptoetanol pH 10 y centrifugados a 30,000 rpm. por 30 minutos, posteriormente el sobrenadante se pasa a través de una columna de Sephacril S-300 (2.5 x 90 cm.) (Pharmacia) equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 8 en - - 0.1% de 2-mercaptoetanol, EDTA 1 mM. En todos los casos los eluentes se recuperaron en un colector de fracciones (ISCO) y se monitorearon a 280 nm de absorbancia. La columna fué previamente equilibrada con proteínas con peso molecular conocido (Sigma), tales como alcohol deshidrogenasa 150,000 Da, albúmina de suero bovino 66,000 Da, anhidrasa carbónica - -

29,000 Da, a una temperatura de 4°C (59).

Además del método anterior se utilizaron los siguientes métodos de solubilización para los cristales de Bacillus thuringiensis GM-2:

- a) 2 mercaptoetanol al 2% pH 11 con NaOH 2N
- b) " " " pH 11 con NaOH 2N durante 2 h de incubación
- c) " " 4% pH 10 con NaOH 2N
- d) " " 2% pH 11 con KOH 0.1M
- e) " " " pH 10 con NaOH 2N 1% de SDS
- f) DTT 0.05 M pH 12 con NaOH 2N, 1% de SDS.

En todos los tratamientos anteriores se utilizó una columna de - - - Sephacril S-300 (1.5 x 40 cm.), en cada paso se realizaron observaciones al microscopio.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR:

Para encontrar el peso molecular de las proteínas de los cristales solubilizados se realizaron electroforésis en gel de poliacrilamida (PAGE) de acuerdo al método de Laemly (35), utilizando un gel separador de poliacrilamida al 11% (12 cm. de longitud y 2 mm de grosor). Se colocaron -- alícuotas de cada una de las muestras en el gel separador y se llevó a cabo la electroforésis (cámara biorad) a 100 volts (büchler 3-1500) hasta que el colorante había migrado el 90% de la longitud del gel. Para determinar la curva de calibración se utilizaron estándares de peso molecular conocido (SIGMA): β -galactosidasa 116,000 Da, albúmina de suero bovi no 66,000 Da, albúmina de huevo 45,000 Da, gliceraldehído 3 fosfato deshi--drogenasa 36,000 Da, anhidrasa carbónica 29,000 Da, tripsinógeno 24,000 Da, α -lactoalbúmina 14,200 Da.

BIOENSAYOS:

La actividad tóxica de las cepas de Bacillus thuringiensis GM-2, subsp. morrisoni, subsp. israelensis se realizó con cristales enteros, cristales solubilizados y con las proteínas obtenidas después de la separación en columna contra larvas del mosquito Aedes aegypti del cuarto estadio (54), -

para lo cual se utilizó una colonia de Aedes aegypti mantenida en el insectario del Laboratorio de Entomología Médica del Depto. de Zoología de Invertebrados de la FCB-UANL. Los bioensayos se realizaron por triplicado con tres repeticiones utilizando lotes diferentes de larvas, los recipientes se incubaron a 30°C en un cuarto con 50-60% de humedad relativa. Se realizaron lecturas para ver el porcentaje de mortalidad a las 24-48 h.

Se realizaron bioensayos con larvas de Trichoplusia ni con cristales enteros y solubilizados de las cepas Bacillus thuringiensis GM-2, subsp. - morrisoni, subsp. kurstaki. (59) (Figura 6).

R E S U L T A D O S

OBSERVACION MORFOLOGICA DE Bacillus thuringiensis:

La cepa de Bacillus thuringiensis GM-2 aislada de suelo agrícola de General Terán, N.L. (México) en su morfología macroscópica cuando se cultiva en agar nutritivo presenta colonias planas con borde escasamente filamentosos de un color blanco-grisáceo sin pigmentación, pero presenta pigmentación rosácea en agar yema de huevo. En su morfología microscópica presenta células de forma bacilar, flageladas, gram positivas con una espora ovoides subterminal (Figura 1) y con la característica principal de presentar un cuerpo de inclusión de forma rectangular rodeado por membranas (Figura 2).

IDENTIFICACION BIOQUIMICA Y SEROLOGICA:

Por otra parte con el propósito de clasificar la cepa en estudio -- Bacillus thuringiensis GM-2, se realizaron las pruebas bioquímicas para el grupo de Bacillus thuringiensis, se encontró que corresponde a este grupo, sin embargo, presentó las siguientes diferencias: Ausencia de crecimiento en agar dextrosa saboraud al 7% NaCl así como de la hidrólisis de la caseína, -- además la cepa GM-2 produjo una pigmentación rosácea en agar yema de huevo, la cual no es característica de Bacillus thuringiensis (Tabla 2). En la tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas para variedad, se encontró que las características bioquímicas de -- -- -- -- -- Bacillus thuringiensis GM-2 no concuerdan con ninguna de las variedades actualmente descritas en la literatura. Con respecto a la identificación serológica se encontró que Bacillus thuringiensis GM-2 corresponde al serotipo H 8a 8b subsp. morrisoni (Tabla 4). En la tabla 3 se muestran también los resultados de las pruebas bioquímicas para esta subespecie, sin embargo, de acuerdo a éstas existen diferencias entre GM-2 y morrisoni tales como: Citratos, caseinasa, gelatinasa, salicina, glucosa, manosa y la pigmentación rosácea en la hidrólisis de gelatina y lecitina.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS TOXINAS:

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica en cuanto a los tipos de proteína que presentan las diferentes variedades que se utilizaron en -- éste trabajo se realizaron diferentes tratamientos de solubilización. Cuando los cristales de Bacillus thuringiensis GM-2 fueron tratados con 2-mer--

captoetanol al 2% pH 10 con NaOH 2N, no se logró su completa solubilización ya que cuando se hicieron observaciones al microscopio se veía la presencia de algunos cristales, con este método se obtuvo una sola proteína con un peso molecular de 47,000 Da (Figura 7), mientras que para la subsp. morrisoni con este mismo tratamiento se obtuvo una proteína con un peso molecular de 135,000 Da (Figura 8). Para Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki se obtuvieron dos proteínas con peso molecular, una de 135,000 Da y otra de 65,000 Da (Figura 9), y para la subsp. israelensis una sola proteína con peso molecular de 64,000 Da (Figura 10), con las tres últimas cepas se obtuvo una completa solubilización de las toxinas.

Cuando se utilizaron otros tratamientos de solubilización para Bacillus thuringiensis GM-2 a base de mercaptoetanol a diferentes pH con NaOH o KOH, con todos éstos se obtuvo también una sola proteína con un peso molecular de 47,000 Da (tratamiento a, b, c, d,). (Figura 11-14). Como los cristales de GM-2 no fueron solubilizados por completo con los tratamientos anteriores se utilizaron dos tratamientos más fuertes usando 2-mercaptoetanol al 2% a pH 10 con NaOH 2N y 1% de SDS y otro con 1% de SDS 0.05 M de DTT a pH 12 con NaOH 2N y se obtuvieron con ambos tratamientos dos proteínas con un peso molecular, una de 30,000 Da y otra menor ($20,000 \pm 5,000$ Da) (Figura 15 y 16), sin embargo con ningún tratamiento se logró una solubilización completa.

BIOENSAYOS:

Los bioensayos realizados con cristales enteros de Bacillus thuringiensis GM-2 contra larvas del cuarto estadio de Aedes aegypti fueron negativos, aún cuando se probaron dosis mas altas de 500 ug/ml, éstos resultados fueron también observados para Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni mientras que para Bacillus thuringiensis subsp. israelensis se obtuvo una mortalidad de 92% con una dosis de 30 ug/ml (Tabla 5). Cuando se utilizaron los cristales solubilizados y las proteínas obtenidas después de la separación en columna para la subsp. morrisoni y los obtenidos para GM-2 con los diferentes tratamientos de solubilización también fueron negativos, mientras que para la subsp. israelensis se observó una mortalidad de 92% con una dosis de 30 ug/

ml con cristales solubilizados y 87% con una dosis de 1 ug/ml con la proteí
na (Tabla 6 y 7).

Los bioensayos contra larvas de Trichoplusia ni de las cepas de - - -
Bacillus thuringiensis GM-2, subsp. kurstaki y subsp. morrisoni se realiza--
ron con una sola dosis de 500 ug/ml con cristales enteros y solubilizados y
se encontró 100% de mortalidad para las subsp. morrisoni y kurstaki mien---
tras que para GM-2 se encontraron resultados negativos (Tabla 8).

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Fu  reportada en 1982, por Gal n Wong et al el aislamiento de una cepa de Bacillus thuringiensis denominada GM-2 la cual presenta como característica principal un cuerpo de inclusión de forma rectangular el cual es diferente a los reportados en la literatura (5), esta característica podría indicar que se trata de una nueva subespecie de Bacillus thuringiensis. Más tarde en 1983, Krieg et al encuentran una nueva subsp. de Bacillus thuringiensis denominada tenebrionis y en 1986, Herrnstadt et al reporta también otra nueva subespecie de Bacillus thuringiensis denominada san diego ambas cepas son tóxicas para coleópteros y presentan una inclusión similar a GM-2, sin embargo estas cepas no han estado disponibles para realizar un estudio comparativo (26, 31).

De acuerdo a la identificación serológica Bacillus thuringiensis GM-2 cruza con Bacillus thuringiensis serotipo H 8a 8b subsp. morrisoni, sin embargo, con respecto a las pruebas bioquímicas se observaron diferencias como: Citratos, caseinasa, gelatinasa, salicina, glucosa, manosa y pigmentación rosácea de la colonia en agar yema de huevo así como en la hidrólisis de la gelatina. Otra diferencia entre GM-2 y la subsp. morrisoni es su cuerpo de inclusión característico de forma bipiramidal (Figura 3), el encontrado para GM-2 es de forma rectangular rodeado por membranas y totalmente diferente a cualquier tipo de inclusión actualmente descrita (Figura 2).

Para tratar de establecer una comparación más estrecha entre Bacillus thuringiensis GM-2 y Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni se efectuó la caracterización bioquímica de la δ -endotoxina de ambas cepas así como de Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki tóxica para lepidópteros y Bacillus thuringiensis subsp. israelensis tóxica para mosquitos.

El cuerpo de inclusión de Bacillus thuringiensis GM-2 resultó ser muy poco soluble al tratamiento mediante el cual la mayoría de los cristales de Bacillus thuringiensis se solubilizan probablemente ésto se debe a la presencia de membranas que rodean el cuerpo de inclusión, por otra parte se encontró que con el tratamiento de 2-Mercaptoetanol al 2% a pH 10 con NaOH 2N

el cristal de GM-2 presenta una sola proteína con un peso molecular de -- 47,000 Da, la misma que fué observada cuando se realizaron modificaciones a este método, sin embargo, cuando se utilizaron agentes como DTT o SDS se observaron dos proteínas, una de 30,000 Da y otra mas pequeña (20,000 \pm - - 5,000 Da). Si observamos las proteínas recuperadas en los dos tratamientos mas fuertes para GM-2, las dos proteínas obtenidas en estos tratamientos -- pueden ser el producto del rompimiento de la proteína obtenida con el tratamiento convencional y en los tratamientos (a, b, c, d,), ésto debido a -- que el volúmen de elución de ellas corresponde al observado en los tratamientos en los que se presentó una sola proteína.

En cuanto a la subsp. morrisoni se encontró una sola proteína de - - 135,000 Da, mientras que para la subsp. israelensis se observó una de - - - 64,000 Da, en el caso de la subsp. kurstaki dos proteínas, una de peso molecular de 135,000 Da y otra de 65,000 Da, éstos resultados son muy similares a los reportados por Yamamoto (55, 59).

Con respecto a la actividad tóxica de Bacillus thuringiensis GM-2, ésta fué nula cuando se utilizaron tanto cristales enteros y solubilizados -- así como las proteínas contra larvas de Aedes aegypti y Trichoplusia ni para la subsp. morrisoni también se encontró una ausencia de actividad tóxica para Aedes aegypti mientras que para Trichoplusia ni se presento un 100% de mortalidad. Los resultados de toxicidad obtenidos para GM-2 contra - - - -- Trichoplusia ni 0% de mortalidad concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que con ninguno de los tratamientos de solubilización encontramos una proteína de 135,000 Da, la cual en 1983 Yamamoto e Iisuka la reportan -- como una proteína tóxica para larvas de lepidópteros (56). En 1983, Yamamoto et al aislaron una proteína de 25,000 Da a partir de una proteína de - 28,000 Da, con una actividad para Aedes aegypti (13, 57), nosotros encontramos dos proteínas con un peso molecular cercano al reportado por ellos, sin embargo no presentaron actividad tóxica para Aedes aegypti.

Los bioensayos realizados con la subsp. israelensis y kurstaki se realizaron con la finalidad de usar en nuestros experimentos cepas testigo que fueran efectivas contra Aedes aegypti y Trichoplusia ni, respectivamente. -

Bacillus thuringiensis GM-2 corresponde serológicamente al serotipo H 8a 8b subsp. morrisoni, en la tabla 9 se observan las diferentes cepas que corresponden a este serotipo, y sin embargo presentan diferentes espectros de toxicidad. Resultando hoy en día altamente interesantes todas las cepas de Bacillus thuringiensis pertenecientes al serotipo H 8a 8b subsp. - - - morrisoni.

En 1987, Krieg et al proponen que de acuerdo al rango de hospedero -- Bacillus thuringiensis serotipo H 8a 8b subsp. morrisoni se divide en 3 patotipos: A,B,C, Bacillus thuringiensis GM-2 podría quedar como una cepa -- atóxica dentro de este serotipo diferente a los patotipos descritos por -- Krieg et al (1987), agregando la presencia de un cuerpo de inclusión paraesporal rectangular rodeado por membranas, una serie de pruebas bioquímicas, así como una composición bioquímica de la δ -endotoxina. Debido a que la subsp. tenebrionis y san diego presentan un cristal de morfología parecida a GM-2 y presentan toxicidad contra coleópteros, sería conveniente -- realizar bioensayos de Bacillus thuringiensis GM-2 contra estos insectos.

En 1987, Thiery remarca que la preparación de cristales es de importancia fundamental para determinar el potencial larvicida de cada polipéptido (49). Existen 3 factores que contribuyen a la potencia de la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis. El origen de la toxina (cepa), la habilidad del jugo intestinal para disolver los cristales y la susceptibilidad intrínseca del insecto a la toxina (29), estos factores o alguno de -- ellos podrían estar interactuando entre sí para que la δ -endotoxina de -- Bacillus thuringiensis cepa GM-2 resulte atóxica a los insectos probados, aunque no se descarta la posibilidad que podría resultar tóxica para otros insectos no probados hasta este momento.

A P E N D I C E

TABLA I
 CLASIFICACION DE CEPAS DE Bacillus thuringiensis EN BASE AL SEROTIPO H

SEROTIPO H	BIOTIPO	SUBESPECIES (o SEROVAR)
1	I	<u>thuringiensis</u>
2	II	<u>finitimus</u>
3a	III 1	<u>alesti</u>
3a, 3b	III 2	<u>kurstaki</u>
4a, 4b	IV 1	<u>sotto</u>
4a, 4b	IV 1	<u>dendrolimus</u>
4a, 4c	IV 2	<u>kenyae</u>
5a, 5b	V 1	<u>galleriae</u>
5a, 5c	V 2	<u>canadensis</u>
6	VI	<u>subtoxicus</u>
6	VI	<u>entomocidus</u>
7	VII	<u>aizawai</u>
8a, 8b	VIII 1	<u>morrisoni</u>
8a, 8c	VIII 2	<u>ostriniae</u>
8a, 8d	VIII 3	<u>nigeriensis</u>
9	IX	<u>tolworthi</u>
10	X	<u>darmstadiensis</u>
11a, 11b	XI 1	<u>toumanoffi</u>
11a, 11c	XI 2	<u>kyushuensis</u>
12	XII	<u>tompsoni</u>
13	XIII	<u>pakistani</u>
14	XIV	<u>israelensis</u>
15	XV	<u>dakota</u>
16	XVI	<u>indiana</u>
17	XVII	<u>tohokuensis</u>
18	XVIII	<u>kumamotoensis</u>
19	XIX	<u>tochigiensis</u>
20a, 20b	XX 1	<u>yunnanensis</u>
20a, 20c	XX 2	<u>pondicheriensis</u>
21	XXI	<u>colmeri</u>
22	XXII	<u>shandongiensis</u>
23	XXIII	<u>japonensis</u>
24	XXIV	<u>neoleonensis</u>

N.B. una variedad (no móvil) wuhanensis

Comunicación personal Dra. H. de Barjac

TABLA 2

RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA EL GRUPO DE Bacillus thuringiensis
COMPARADAS CON LAS OBTENIDAS PARA Bacillus thuringiensis GM-2

	<u>Bacillus thuringiensis</u>	GM-2
Producción de ácido a partir de Arabinosa, Xilosa y Manitol	-	-
Nitratos a Nitritos	+	+
Motilidad	d	+
Producción de ácido a partir de glucosa.	+	+
Producción de gas a partir de glucosa	-	-
Cristales intracelulares de proteína	+	+
Hidrólisis del almidón	+	+
Crecimiento en agar dextrosa Saboraud con 7% de NaCl.	+	-
Crecimiento en agar yema de huevo	+	+ *
Hidrólisis de caseína	+	-

* Pigmento rosáceo en el medio

- Negativa

+ Positiva

d duda

TABLA 3

RESULTADOS OBTENIDOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS RECOMENDADAS POR H DE FARJAC Y KRIEG
 PARA Bacillus thuringiensis GM-2 y Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni

	GM-2	<u>morrisoni</u>
Acetil metil carbinol	+	+
Película	+	+
Rojo de metilo	+	+
Citratos	+	-
Proteólisis	+	+
Hidrólisis del almidón	+	+
Producción del pigmento	-	-
Ureasa	-	-
Quitinasa	+	ND
Lecitinasa	+*	+
Arginina deshidrolasa	+	+
Caseinasa	-	+
Gelatinasa	+*	-
Hidrólisis de esculina	+	+
Producción de ácido a partir de:		
Sacarosa	-	-
Salicina	+	-
Glucosa	+	-
Manitol	-	-
Celobiosa	-	-
Arabinosa	-	-
Manosa	-	+

* Pigmento rosáceo en el medio

+ Positiva

- Negativa

ND No determinada

TABLA 4

REACCIONES CRUZADAS USANDO LOS SEROTIPOS DE Bacillus thuringiensis DE REFERENCIA INTERNACIONAL COMO ANTIGENO CONTRA EL ANTISUERO DE - - - - -
Bacillus thuringiensis GM-2

CLAVE:	SEROTIPO:	VARIEDAD:	GM-2
HD-2	1	<u>thuringiensis</u>	-
HD-3	2	<u>finitimus</u>	-
HD-4	3a	<u>alesti</u>	-
HD-1	3a 3b	<u>kurstaki</u>	-
HD-7	4a 4b	<u>dendrolimus</u>	-
HD-930	4a 4b	<u>sotto</u>	-
HD-650	5a 5b	<u>galleriae</u>	-
HD-553	5a 5c	<u>canadensis</u>	-
HD-109	6	<u>subtoxicus</u>	-
HD-9	6	<u>entomocidus</u>	-
HD-126	7	<u>aizawai</u>	-
HD-12	8a 8b	<u>morrisoni</u>	+
HD-501	8a 8c	<u>ostrinae</u>	-
HD-121	9	<u>tolworthi</u>	-
HD-146	10	<u>darmsstadiensis</u>	-
HD-201	11a 11b	<u>toumanoffii</u>	-
HD-541	11a 11c	<u>kyushuensis</u>	-
HD-542	12	<u>thompsoni</u>	-
HD-395	13	<u>pakistani</u>	-
HD-567	14	<u>israelensis</u>	-
HD-521	15	<u>indiana</u>	-
HD-932	16	<u>dakota</u>	-
HD-866	17	<u>tohokuensis</u>	-
HD-867	18	<u>kumamotoensis</u>	-
HD-868	19	<u>tochiqiensis</u>	-
HD-847	20	<u>colneri</u>	-

Tabla 5.- Toxicidad de cristales de Bacillus thuringiensis sobre larvas del cuarto estadio de Aedes aegypti (48 h).

Dosis ug/ml	Repetición	Número de larvas tratadas	% de Mortalidad		
			<u>israelensis</u>	<u>GM-2</u>	<u>morrisoni</u>
2.5	1	120			1
	2	120	26	0	0
	3	120	0	0	0
5	1	120			0
	2	120	40	0	0
	3	120	0	0	0
10	1	120			0
	2	120	63	0	0
	3	120	0	0	0
15	1	120			0
	2	120	80	0	0
	3	120	0	0	0
20	1	120			0
	2	120	85	0	0
	3	120	0	0	0
30	1	120			0
	2	120	92	0	0
	3	120	0	0	0

Tabla 6. - Toxicidad de cristales solubilizados de Bacillus thuringiensis sobre larvas del cuarto estadio de Aedes aegypti (48 h).

Dosis ug/ml	Repetición	Número de larvas tratadas	% de Mortalidad						
			<u>Israelensis</u>	<u>G4-2*</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>S</u>
2.5	1	120							1
	2	120	26	0	0	0	0	0	0
	3	120		0	0	0	0	0	0
5	1	120							0
	2	120	41	0	0	0	0	0	0
	3	120		0	0	0	0	0	0
10	1	120							0
	2	120	63	0	0	0	0	0	0
	3	120		0	0	0	0	0	0
15	1	120							0
	2	120	81	0	0	0	0	0	0
	3	120		0	0	0	0	0	0
20	1	120							0
	2	120	85	0	0	0	0	0	0
	3	120		0	0	0	0	0	0
30	1	120							0
	2	120	92	0	0	0	0	0	0
	3	120		0	0	0	0	0	0

* Con los diferentes tratamientos de solubilización.

Tabla 7.- Toxicidad de las proteínas de Bacillus thuringiensis sobre larvas del cuarto estadio de Aedes aegypti (48 h).

Dosis ug/ml	Repetición	Número de Larvas tratadas	% de Mortalidad		
			<u>Israelensis</u> ^a	GM-2b	<u>Morrisoni</u> ^c
0.2	1	120		0	0
	2	120	53	0	0
	3	120		0	0
0.4	1	120		0	0
	2	120	67	0	0
	3	120		0	0
0.6	1	120		0	0
	2	120	85	0	0
	3	120		0	0
0.8	1	120		0	0
	2	120	83	0	0
	3	120		0	0
1	1	120		0	0
	2	120	87	0	0
	3	120		0	0

a = Proteína de 64,000 Da

b = Con las proteínas obtenidas con los diferentes tratamientos de solubilización

c = Proteína de 135,000 Da.

Tabla 8.- Toxicidad de cristales de Bacillus thuringiensis sobre larvas del primer estadio de Trichoplusia ni (7 d).

Dosis	Número de	% de Mortalidad					
		<u>kurstaki</u>		<u>G-2</u>		<u>morisori</u>	
ug/ml	larvas tratadas	<u>Bt</u>	<u>sol</u>	<u>Bt</u>	<u>sol</u>	<u>Bt</u>	<u>sol</u>
500	10	100	100	0	0	100	100

* Con los diferentes tratamientos de solubilización

Tabla 9.- AISIAMIENTOS DE Bacillus thuringiensis QUE CORRESPONDEN AL SEROTIPO H 8a 8b.

CEPA	DESCUBRIDOR	FUENTE DE AISIAMIENTO	LUGAR	AÑO	TOXICIDAD	REF.
<u>B. morrisoni</u>	Norris	<u>Anagasta spp.</u>	Escocia	1963	Lepidópteros	(14, 19)
PG-14	Padua <u>et al</u>	Suelo	Filipinas	1982	Mosquitos	(42, 43)
GM-2	Galán <u>et al</u>	Suelo	México	1982	N D	(5, 6)
B1256-82	Krieg <u>et al</u>	<u>Tenebrio molitor</u>	Alemania	1983	Coleópteros	(32)
<u>san diego</u>	Herrnstadt <u>et al</u>	N D	E.U.A.	1986	Coleópteros	(26)

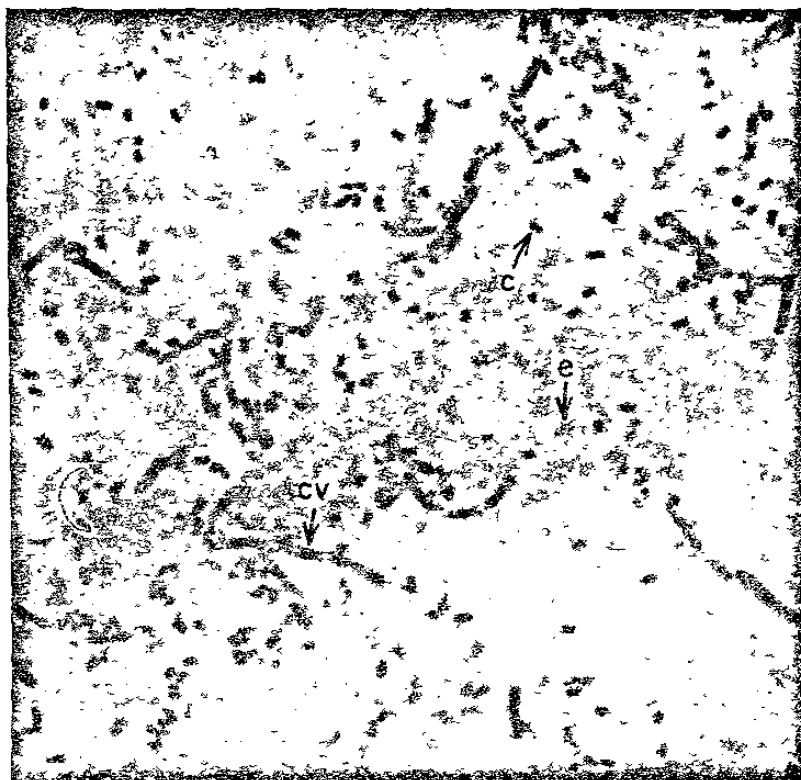


Figura 1.- Cepa de Bacillus thuringiensis G4-2 en donde se observan los cristales de forma rectangular (c) las células vegetativas (cv) y las esporas (e). (1,200 aumentos).

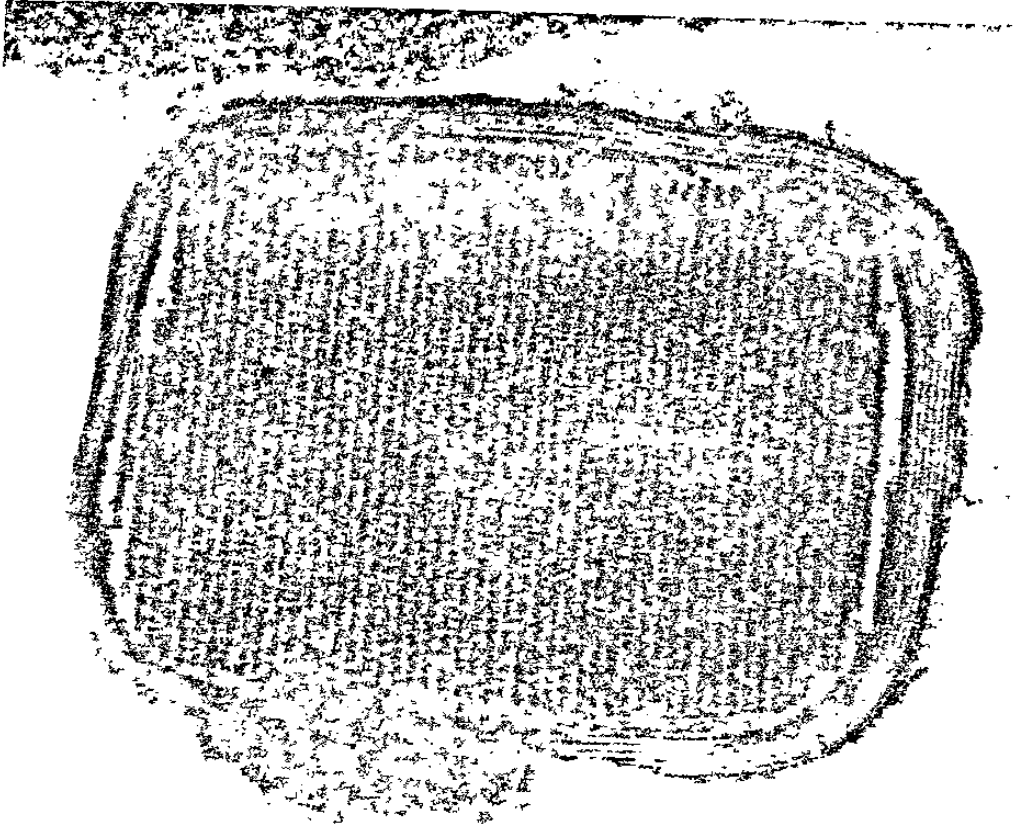


Figura 2.- Cuerpo de inclusión paraesporal de Bacillus thuringiensis GM-2 en donde se observa que está rodeado por membranas (130,000 aumentos).

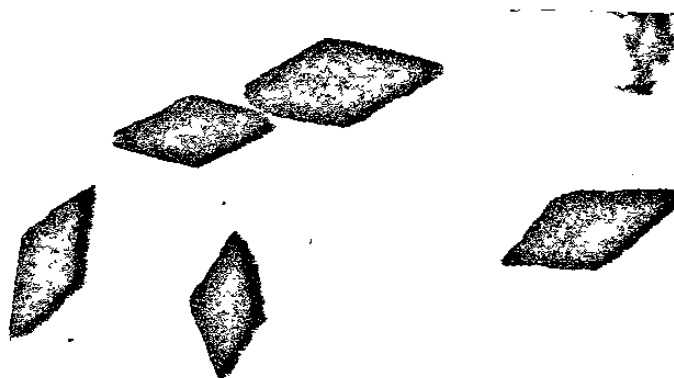


Figura 3.- Cuerpo de inclusión paraesporal de

Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni

(HD-12) (19,437 aumentos).

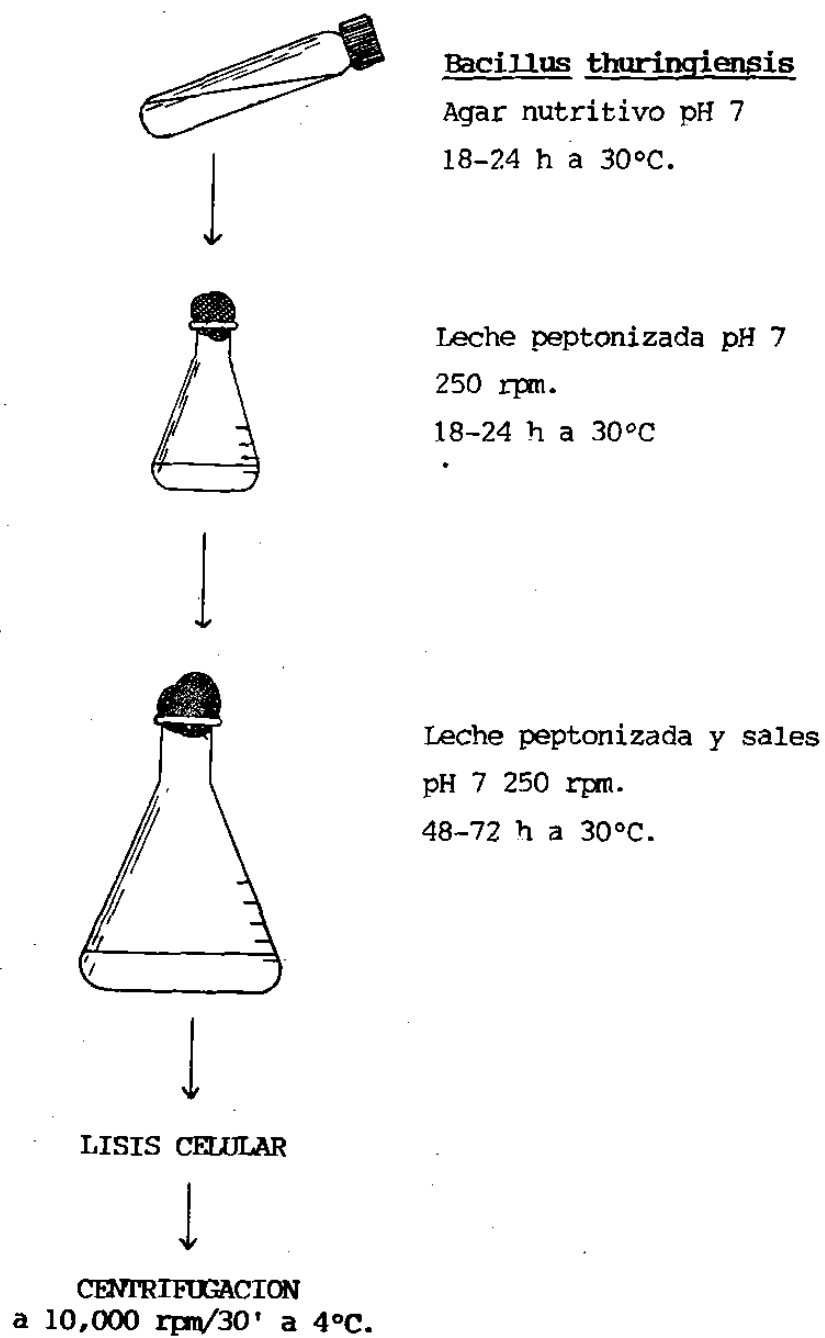


Figura 4.- Producción de *Bacillus thuringiensis*

Purificación por flotación
Resuspender NaCl 1M
Centrifugación a 10,000 rpm/30'
a 4°C, Lavar con agua destilada pH 7
Agitar y descartar la espuma.



Purificación en gradientes de NaBr
(30 - 36%) 25,000 rpm/90'..



Colectar bandas de cristales
Concentrar y lavar.



Liofilización



Conservación a -20°C

Figura 5.- Purificación de cristales paraesporales de Bacillus thuringiensis

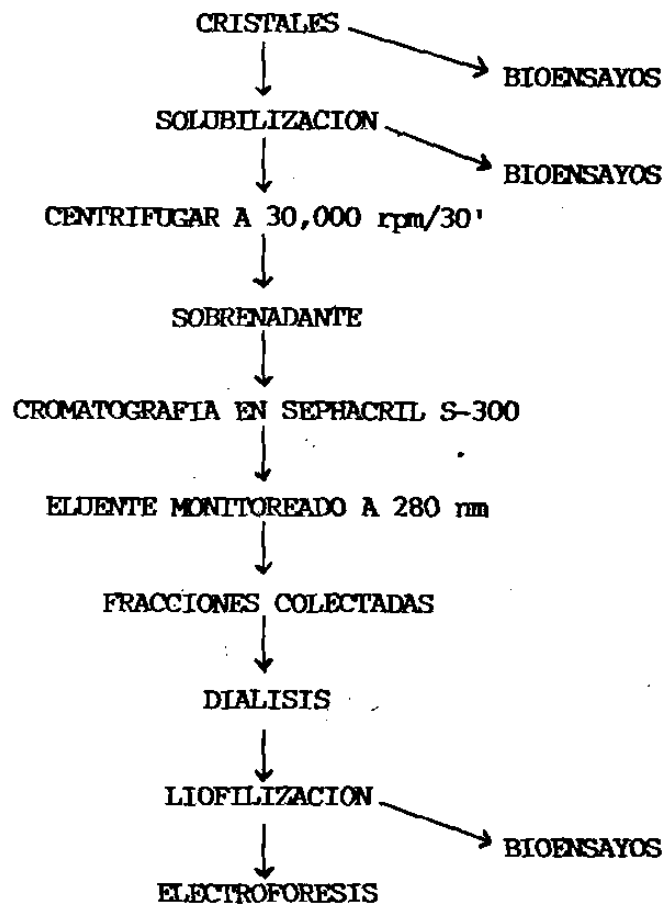


Figura 6.- Caracterización de las toxinas.

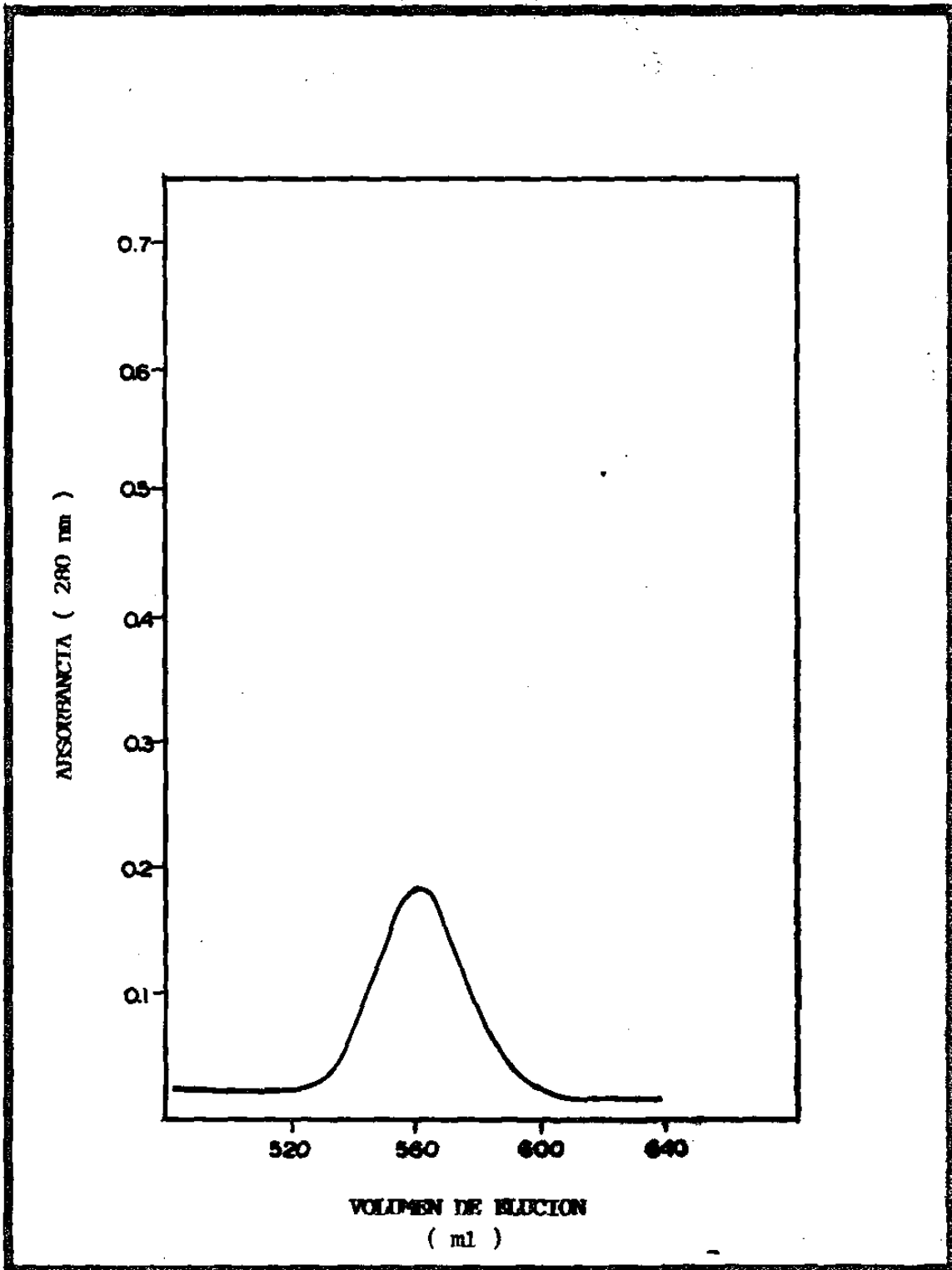


Fig. 7 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis GM-2 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH-10 y separados en una columna de Sephacril S-300 (2.5 x 90 cm) eluida con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreado a 280 nm.

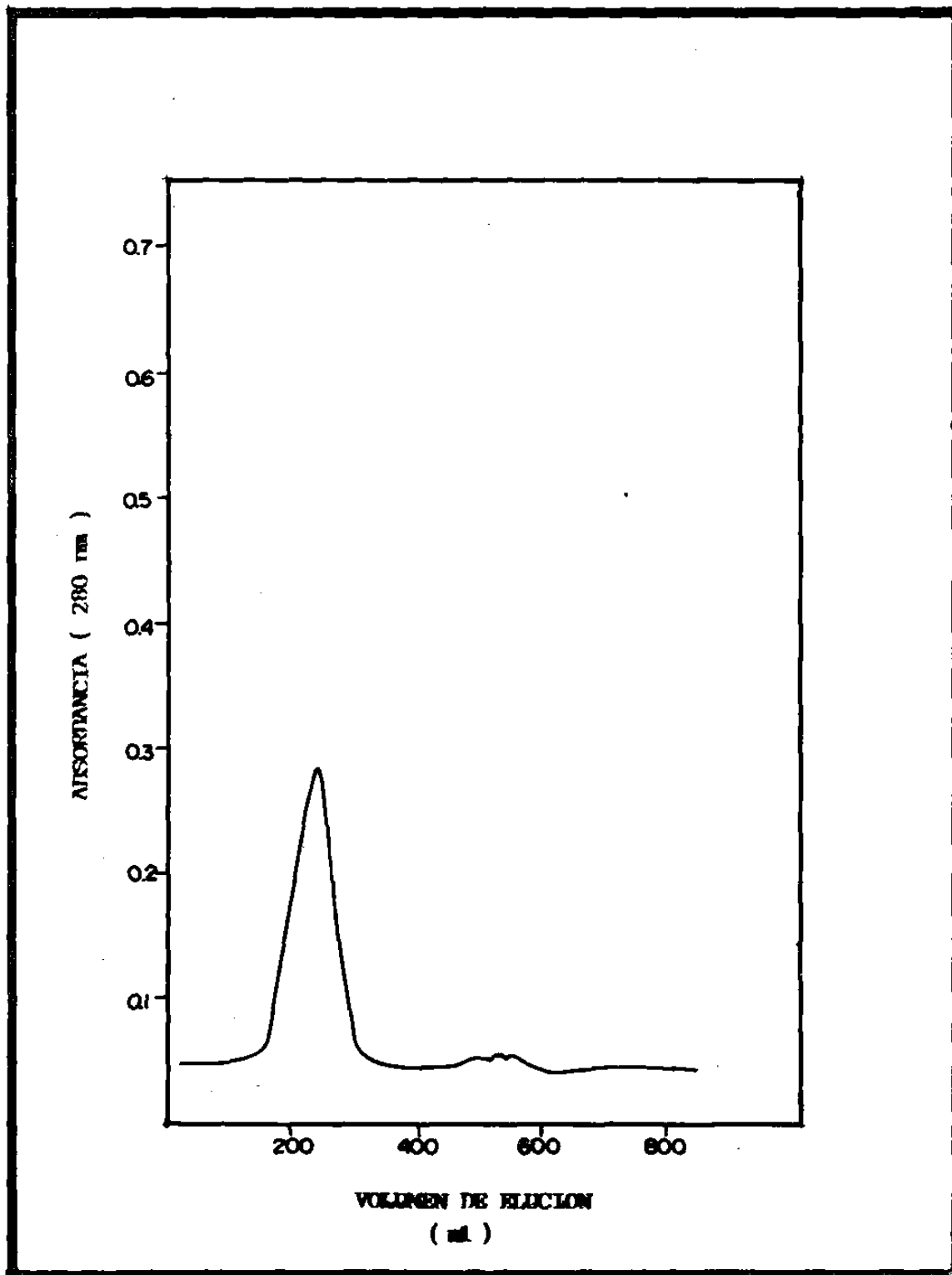


Fig. 8 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis HD-12 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH10 y separados en una columna de Sephacril S-300 (2.5 x 90 cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreada a 280 nm.

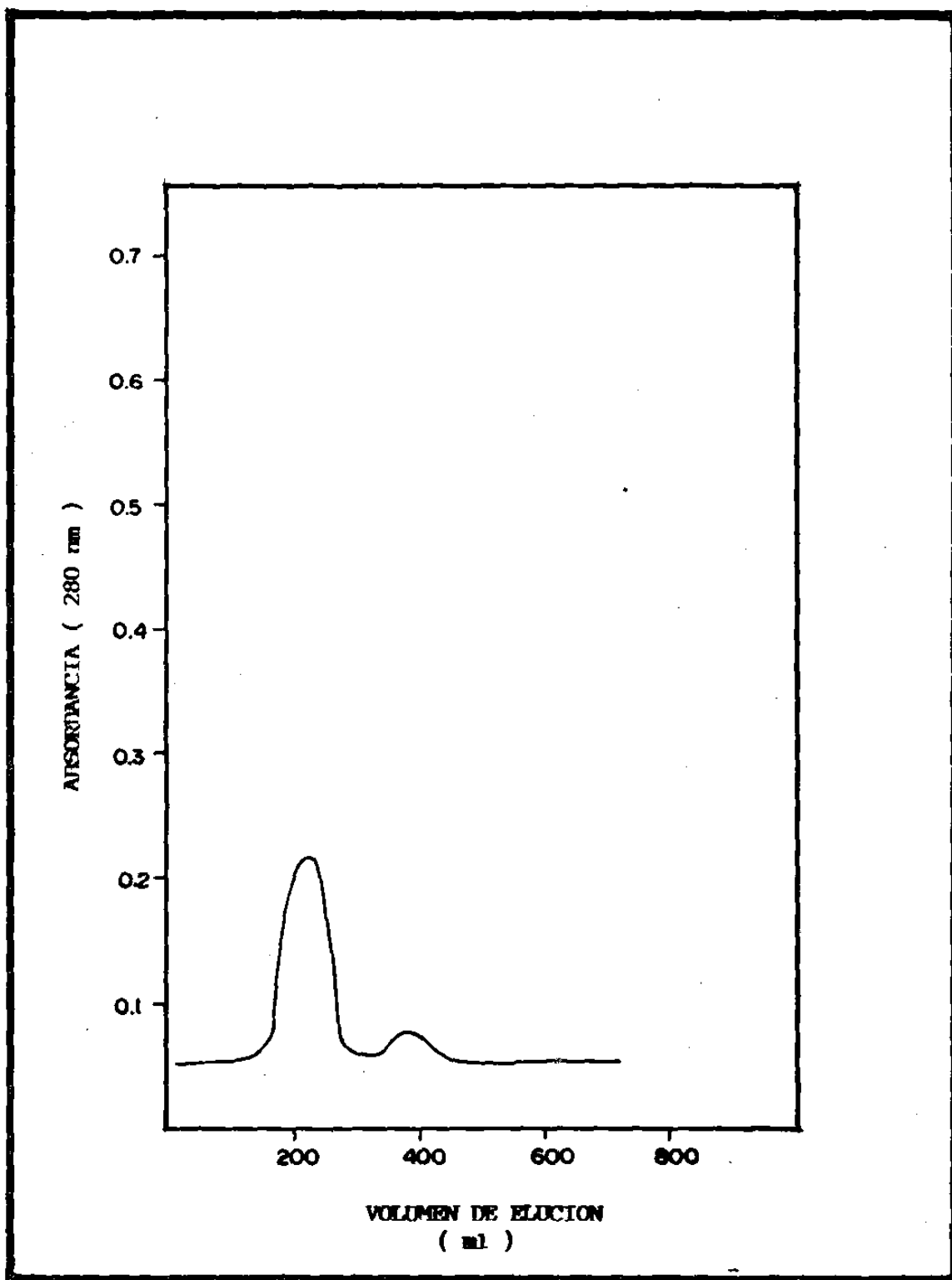


Fig. 9 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis HD-1 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH10 y separados en una columna de Sephacril S-300 (2.5 x 90. cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreada a 280 nm.

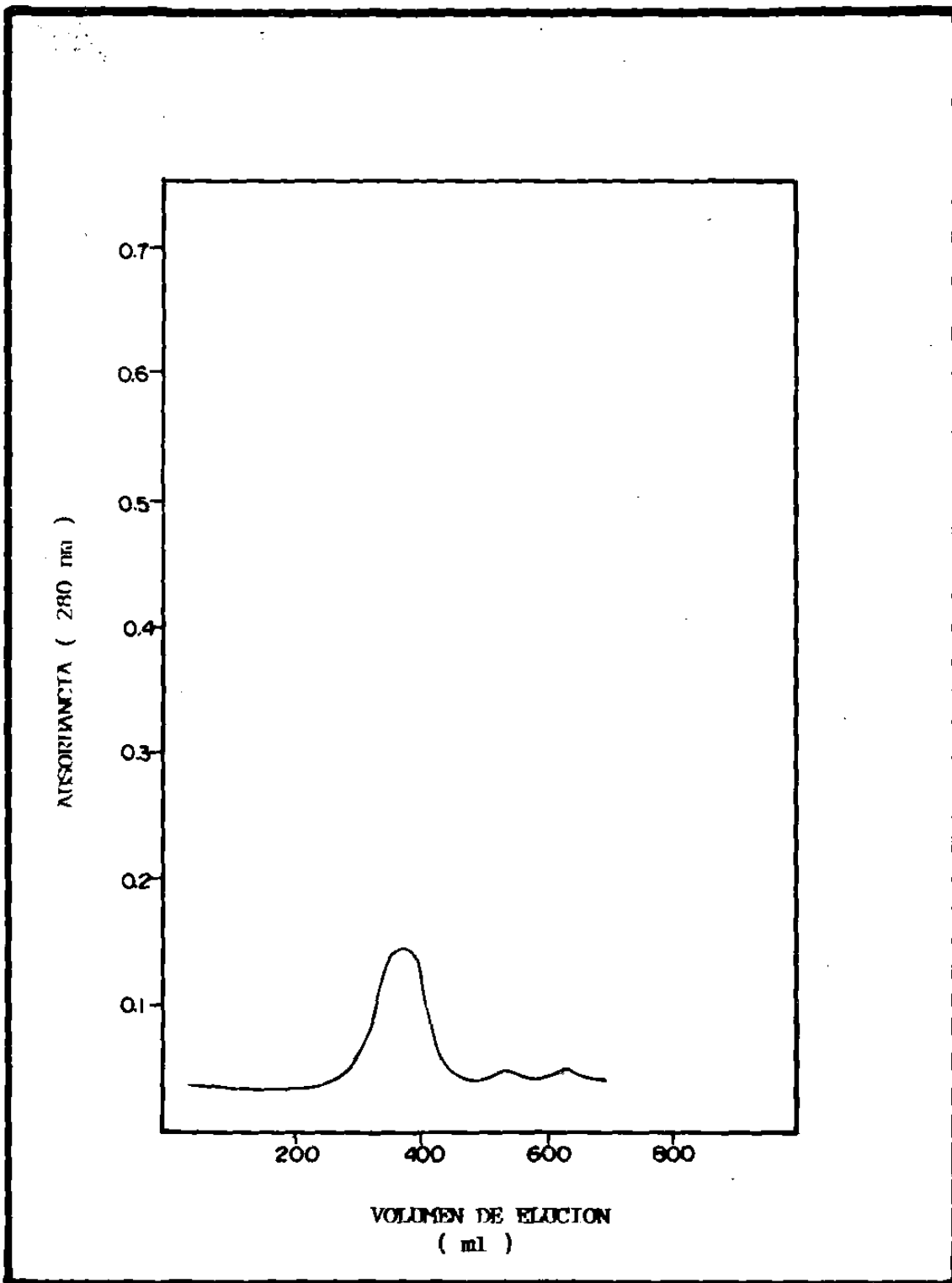


Fig. 10 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis HD-654 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH10 y separados en una columna de Sephacril S-300 (2.5 x 90 cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y moni-
toreada a 280 nm.

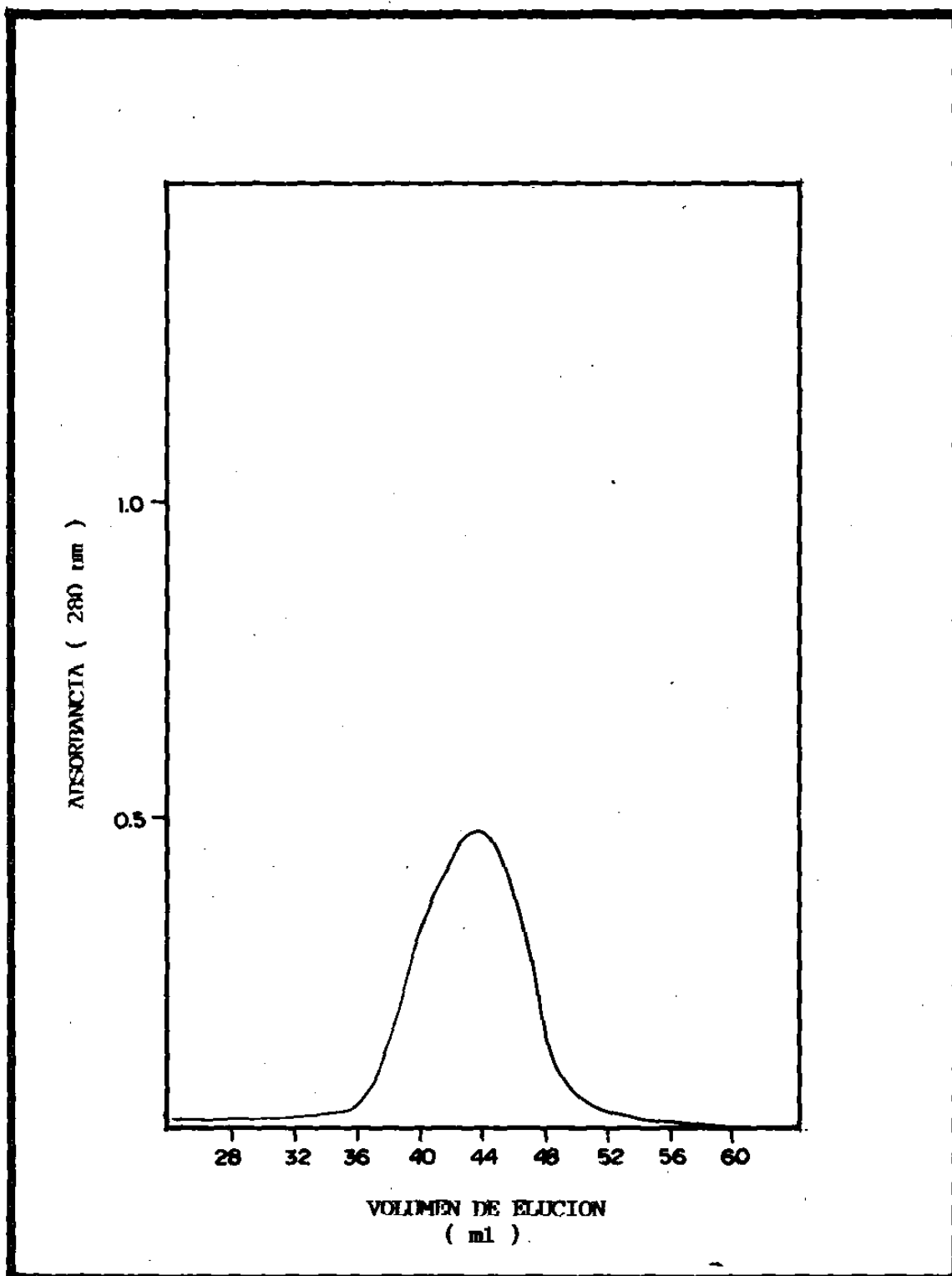


Fig. 11 Filtración en gel de cristales de *Bacillus thuringiensis* GM-2 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH11 y separados en una columna de Sephacril S-300 (1.5 x 40 cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreada a 280 nm.

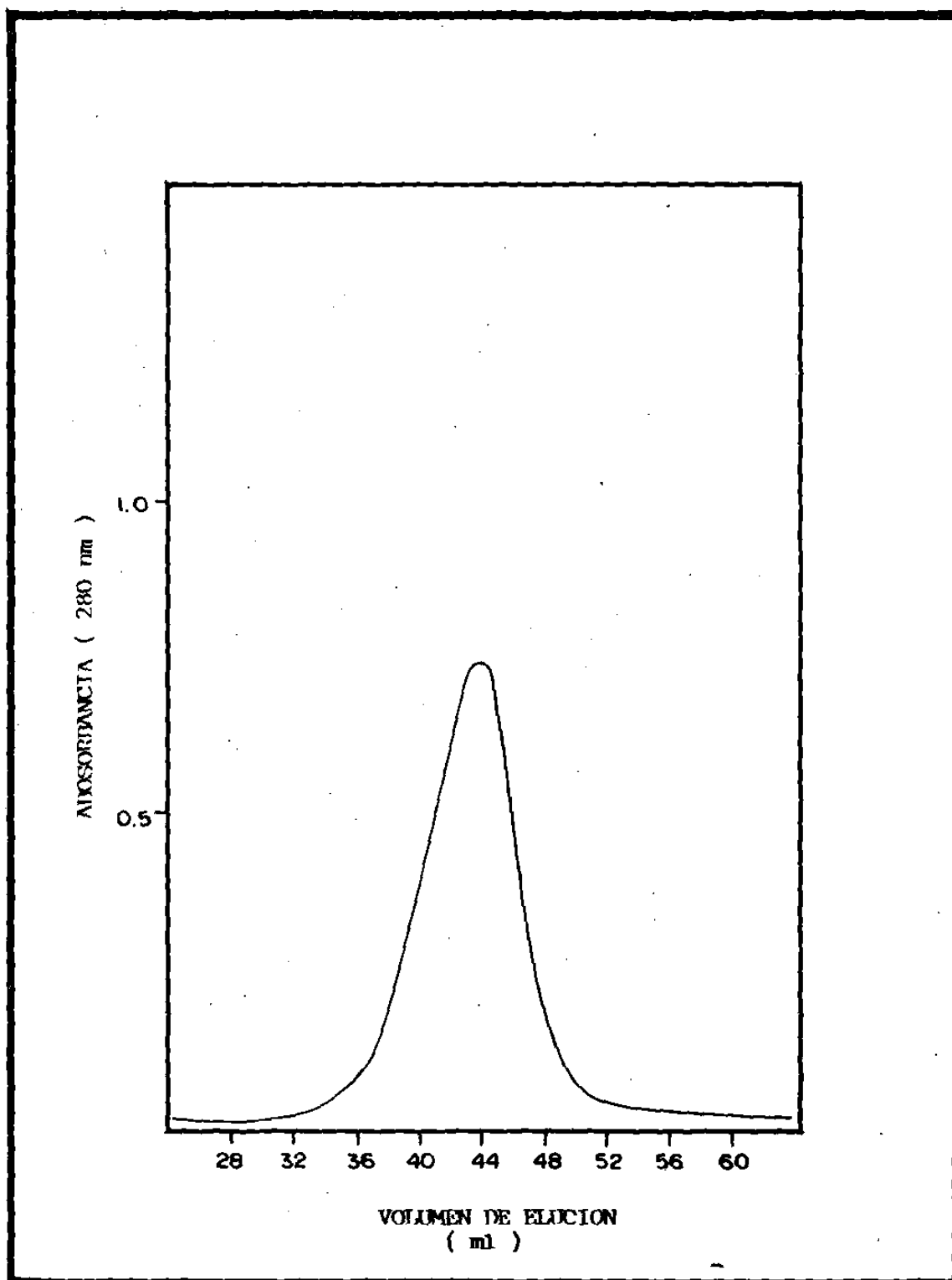


Fig. 12 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis GM-2 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH11* y separados en una columna de Sephacril S-300 (1.5 x 40 cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreada a 280 nm.

* 2 horas de incubación.

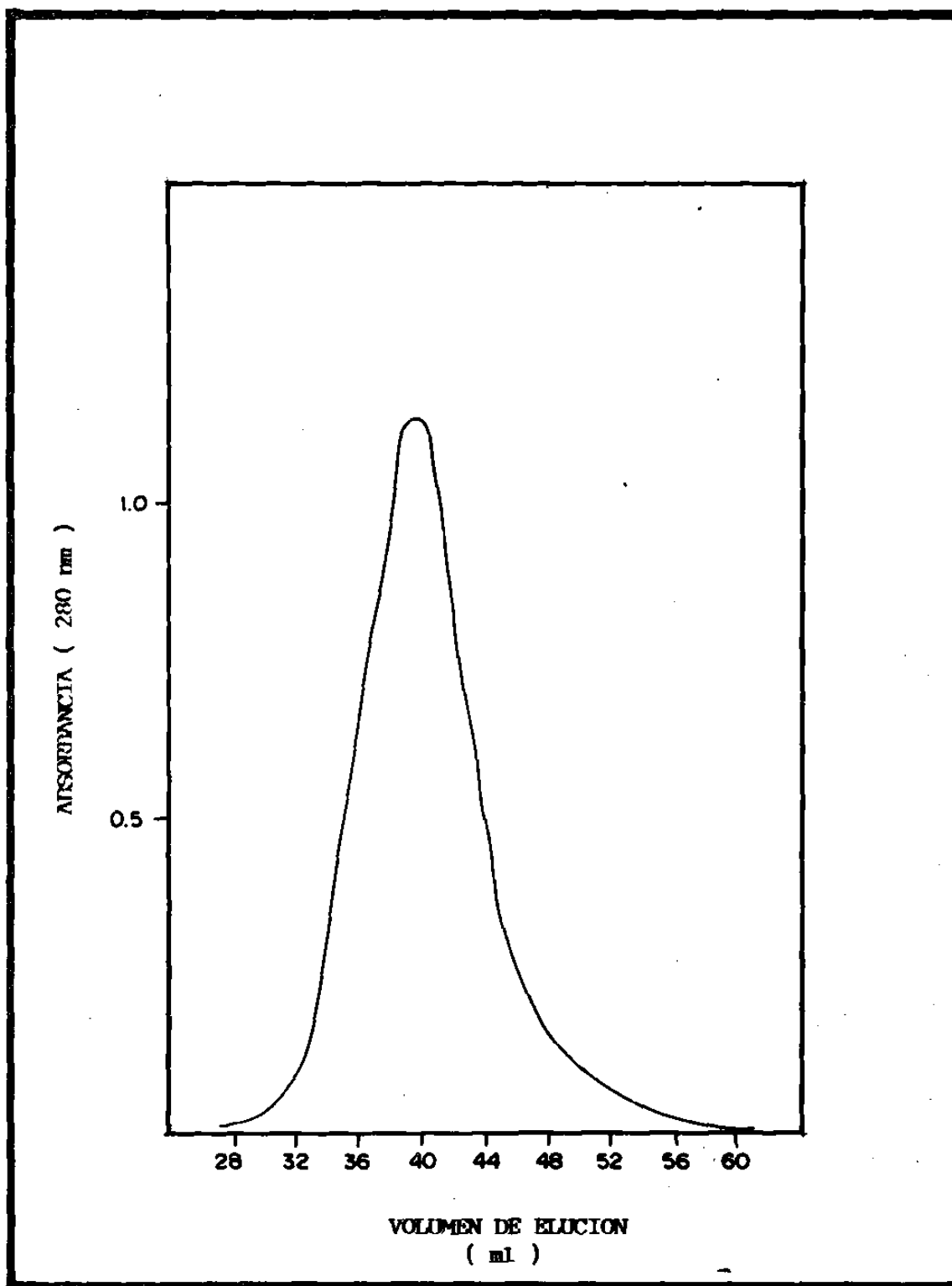


Fig. 13 Filtración en gel de cristales de *Bacillus thuringiensis* GM-2 sdlubilizados en 2-Mercaptoetanol al 4% NaOH 2N pH10 y separados en una columna de Sephacril S-300 (1.5 x 40 cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreada a 280 nm.

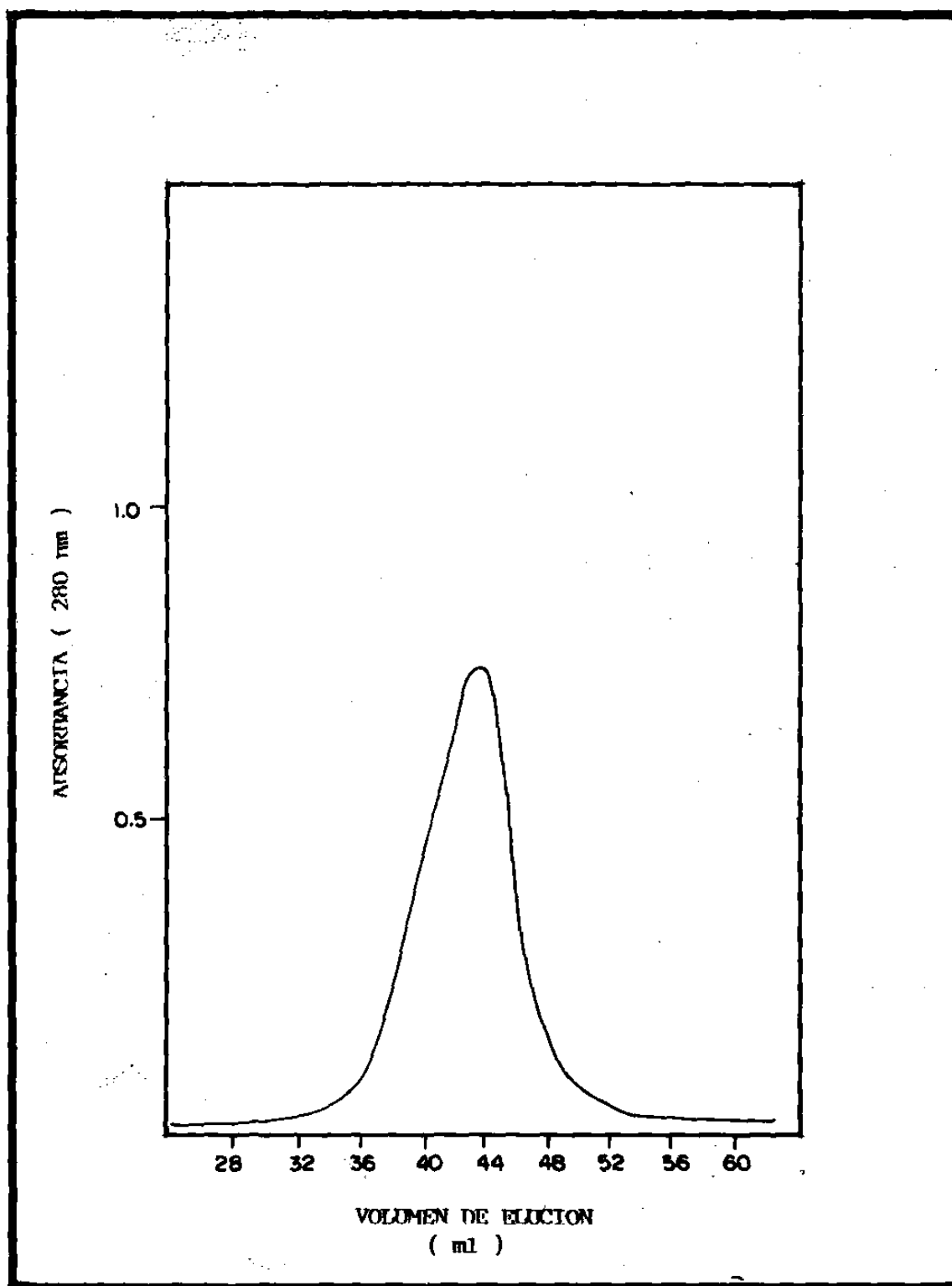


Fig. 14 Filtración en gel de cristales de *Bacillus thuringiensis* GM-2 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% KOH 0.1 M pH 11 y separados en una columna de Sephacril S-300 (1.5 x 40 cm) eluida con Tris-HCl 50 mM pH 8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreada a 280 nm.

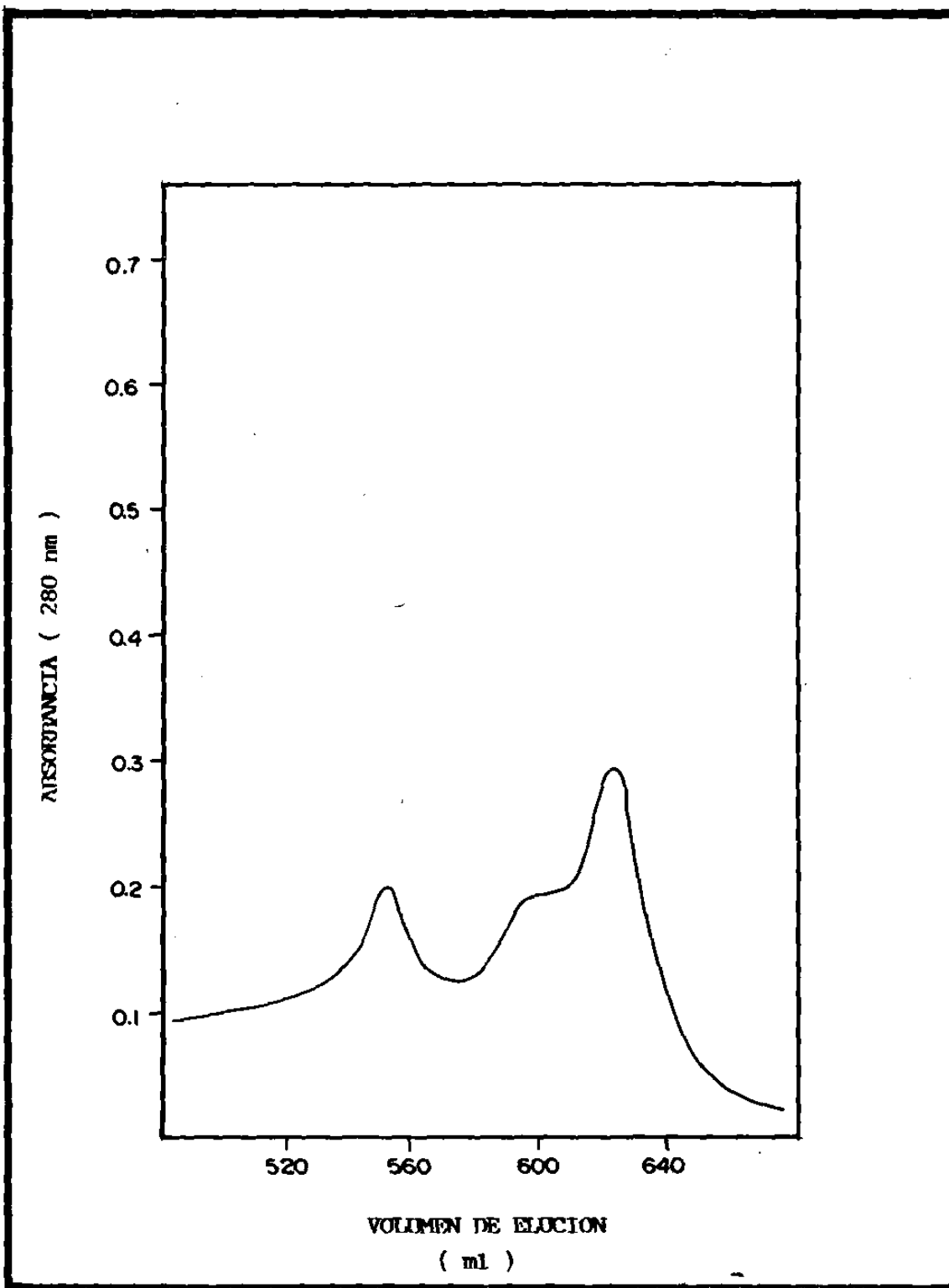


Fig. 15 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis GM-2 solubilizados en 2-Mercaptoetanol al 2% NaOH 2N pH10 1% SDS - y separados en una columna de Sephacril S-300 (2.5 x 90 cm) eluída con Tris-HCl 50 mM pH 8, 0.1% de 2 Mercaptoetanol y -- 1 mM y monitoreada a 280 nm.

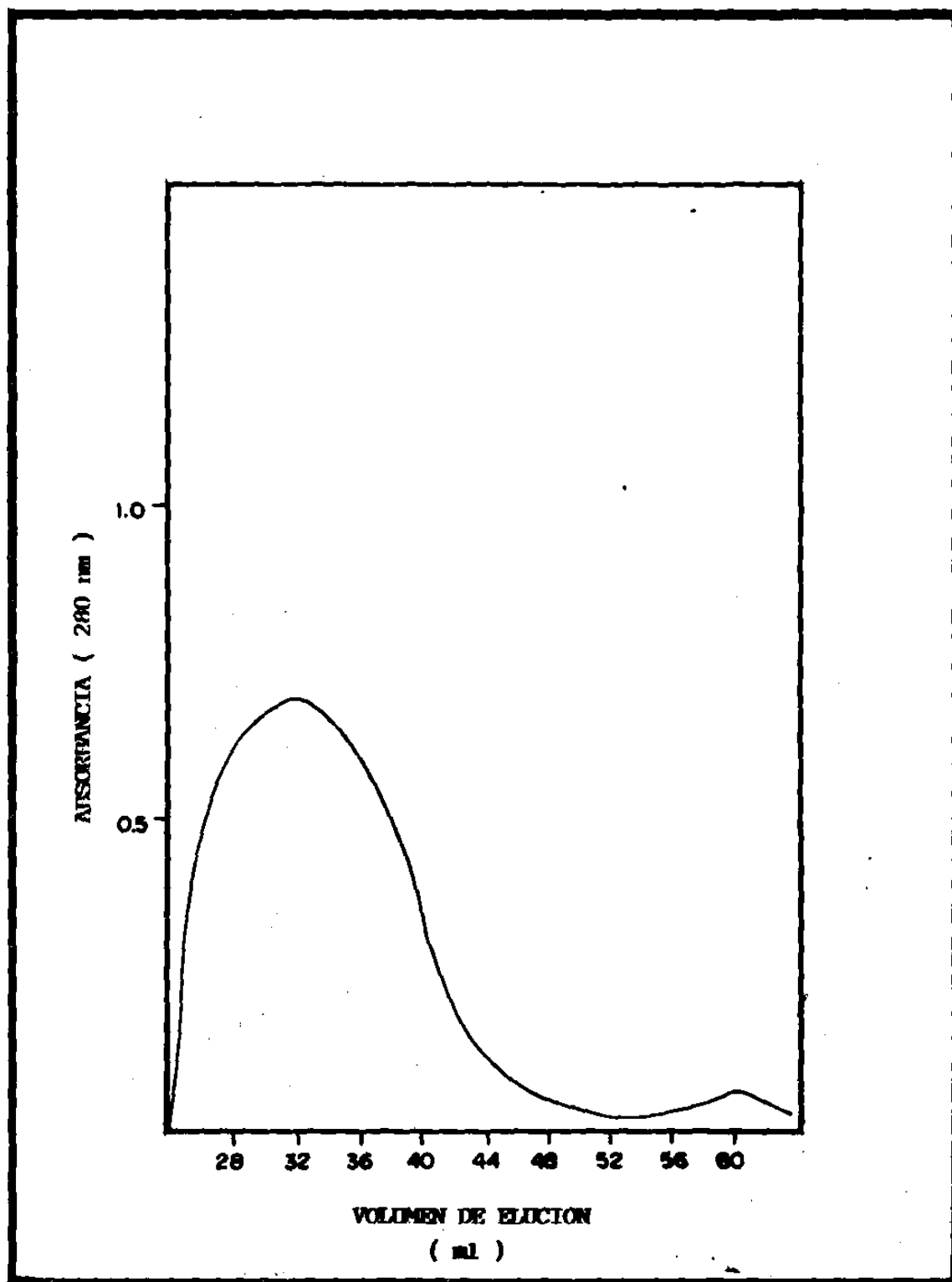


Fig. 16 Filtración en gel de cristales de Bacillus thuringiensis GM-2 solubilizados en 1% de SDS, DTT 0.05 M NaOH pH12 y separados en una columna de Sephacril S-300 (1.5 x 40 cm) éluida con Tris-HCl 50 mM pH 8. 0.1% de 2 Mercaptoetanol y EDTA 1 mM y monitoreado a 280 nm.

LITERATURA CITADA

- 1.- Andrews R.E. Jr., Faust R.M., Wabiko H., Raymond K.C., Bulla L. A. -- 1987. The biotechnology of Bacillus thuringiensis. Critic. Rev.- Biotechnol. 6:(2) 163-232.
- 2.- Ang B.J. & Nickerson K.W. 1978. Purification of the protein crystal - from Bacillus thuringiensis by zonal gradient centrifugation. -- Appl. Env. Microbiol. 36:(4) 625-626.
- 3.- Angus T.A. 1954. A bacterial toxin paralising silkworm larvae. Nature. 173: 545-546.
- 4.- Armstrong J.L., Rohrmann G.F. & Beaudreau G.S. 1985. Delta endotoxin of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. J. Bacteriol. 161: (1) 39-46.
- 5.- Arroyo Mata R. 1982. Producción de bioinsecticida a partir de medios con almidón usando Bacillus thuringiensis GM-2. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. (México). Tesis inédita.
- 6.- Barba Cabrera A. L. 1983. Identificación bioquímica y serológica de cinco cepas de Bacillus thuringiensis aisladas de suelo del -- estado de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. - Monterrey, N.L. (México). Tesis inédita.
- 7.- Buchanan R.E. & Gibbons N.E. 1974. Endospore-forming rods and cocci, in Bergey's manual of determinative bacteriology part 15. 8th edition R.E. Buchanan, N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, -- R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin & R.Y. Stanier, Eds. The -- Williams & Wilkins Baltimore, 535.
- 8.- Bulla L.A. Jr., Davidson L.I., Kramer K.J. & Jones B.L. 1979. Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Biochem. Biophys. Res. --

Commun. 91: (3) 1123-1130. 1020091389

- 9.- Bulla L.A. Jr., Kramer K.J. & Davidson L.I. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. 130: (1) 375-383.
- 10.- Claus D. & Berkeley, R.C.W., 1986. Genus Bacillus, in Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2, N.S. Mair, M.E. Sharpe, & J.G. Holt, Eds. Williams & Wilkins Baltimore, 1105.
- 11.- Cooksey K.E. 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biochemistry and mode of action chapter II, in Microb. contr of insects and mites. H.D. Burges & N.W. Hussey, Eds. London. 229-246.
- 12.- Chestukhina G.G., Kostina L.I., Zaulin I.A., Kotova T.S., Katrukha S.-P., Suznetsov Yu. S. & Stepanov V.M. 1977. Proteins of - - - - - Bacillus thuringiensis δ -endotoxin crystals. Biokhimiya. 42: (9). 1660-1667.
- 13.- Davidson, E.W. & Yamamoto T. 1984. Isolation and assay of the toxic -- component from the crystals of Bacillus thuringiensis var. - - - - israelensis. Curr. Microbiol. 11: 171-174.
- 14.- De Barjac H. 1983. Collection de Souches de Bacillus thuringiensis. -- Centre de References pour Bacillus thuringiensis de L' Organiza-- tion Internationale de Lutle Biologique. Laboratoire de Lutle Bio logique II. Institute Pasteur.
- 15.- De Barjac H. & Bonnefoi A. 1962. Essai de classification biochimique - et serologique de 24 souches de Bacillus du type - - - - - Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 8: (1) 5-30.
- 16.- De Barjac H. & Cosmao-Dumanoir V. 1975. Intéret de Certains Critères - Biochimiques Supplémentaires pour la Clasification des souches de Bacillus. Ann. Microbiol Inst. Pasteur. 126: 83-95.

- 26.- Hermstadt C., Soares G.G., Wilcox E.R. & Edwards D.L. 1986. A new strain of Bacillus thuringiensis with activity against coleopteran insects. Biotechnology 4: 305-308.
- 27.- Huber-Lukac M., Luthy P. & Braun D.G. 1983. Specificities of monoclonal antibodies against the activated δ -endotoxin of - - - - - Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. Infection and Immunity 40: (2) 608-612.
- 28.- Hurley M.J., Bulla L.A., Jr. & Andrews R.E. Jr. 1987. Purification of the mosquitocidal and cytolytic proteins of - - - - - Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl. Env. Microbiol. 53: (6) 1316-1321.
- 29.- Jaquet F., Hutter R. & Luthy P. 1987. Specificity of - - - - - Bacillus thuringiensis δ -endotoxin. Appl. Env. Microbiol. 53: - - (3) 500-504.
- 30.- Krieg A. 1980. The genus Bacillus: Insect pathogens, in: The Prokaryotes vol. 2, chapter 136. Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., - - - Balows A., Schlegel H.G. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. 1743-1755.
- 31.- Krieg V.A., Huger A.M., Langenbruch G.A., Schnetter W. 1983. - - - - - Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: Ein neuer, gegenüber Larven von coleopteren wirksamer pathotyp. Z. Ang. Ent. 96: 500-508.
- 32.- Krieg V.A., Schnetter W., Huger A.M. & Langenbruch G.A. 1987. - - - - - Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis, strain BI256-82: A - - third pathotype within the H-serotype 8a 8b. System Appl. Microbiol. 9: 138-141.
- 33.- Krywienczyk J. 1977. Antigenic composition of δ -endotoxin as an aid in identification of Bacillus thuringiensis varieties. Insect - - Pathology. Research Institute Department of Fisheries and the En-

vironment. Canadian Forestry Service Sault. Ste. Marie, Ontario,
1-11.

- 34.- Krywienczyk J. & Fast F.G. 1980. Serological relationships of the crystals of Bacillus thuringiensis var. israelensis. J. Invertebr. Pathol. 36: 139-140.
- 35.- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.
- 36.- Li J., Henderson R., Carroll J. & Ellar D., 1988. X-ray analysis of the crystalline parasporal inclusion in Bacillus thuringiensis var. tenebrionis J. Mol. Biol. 199: 543-544.
- 37.- Luthy P. 1980. Insecticidal toxins of Bacillus thuringiensis - FEMS Microbiol. Lett. 8: 1-7.
- 38.- Mahillon J. & Delcour J. 1984. A Convenient procedure for the preparation highly purified parasporal crystals of Bacillus thuringiensis J. Microbiol. Meth. 3: 69-76.
- 39.- Nickerson K.W. 1980. Structure & Function of the Bacillus thuringiensis protein crystal. Biotech. Bioeng. 12: 1305-1333.
- 40.- Norris J.R. & Burges H.D. 1963. Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects: Epizootiological applications. J. Insect. Pathol 5: 460-472.
- 41.- Ohba M., Yu Y.M., & Aizawa K. 1987. Non-toxic isolates of Bacillus thuringiensis producing parasporal inclusions with unusual protein components. Lett. Appl. Microbiol. 5: 29-32
- 42.- Padua L.E. 1988. Bacillus thuringiensis isolated from the Philippines

nes with vector control potential. International symposium on insecticide of Bacillus thuringiensis. Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, People's, Republic of China.

- 43.- Padua L.E., Ohba M. & Aizawa K. 1984. Isolation of a - - - - -
Bacillus thuringiensis strain (serotype 8a 8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 44: 12-17.
- 44.- Pendelton I.R. & Morrison R.B. 1966. Separation of spores and crystals of Bacillus thuringiensis. Nature 212: 728-729.
- 45.- Pfannestiel M.A., Couche G.A., Muthukumar G. & Nickerson K.W. - -
 1985. Stability of the larvidal activity of - - - - -
Bacillus thuringiensis subsp. israelensis: Amino acid modification and denaturants. Appl. Env. Microbiol. 50: (5) 1196-1199.
- 46.- Prasad S.S.S.V. & Shetha Y.I. 1976. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of Bacillus thuringiensis - -
 J. Scient. Ind. Res. 35: 626-632.
- 47.- Rao C.D. & Shethna Y.I. 1980. A simple technique for purification of the parasporal crystal (δ -endotoxin) of Bacillus thuringiensis - -
 var. thuringiensis J. Indian Inst. Sci. 62: 1-11.
- 48.- Sharpe E.S., Nickerson K.W., Bulla L.A. Jr. & Aronson J.N. 1975. Separation of spores and parasporal crystals of Bacillus thuringiensis in gradient of certain X-Ray contrasting agents. Appl. Microbiol. 30: (6) 1052-1053.
- 49.- Thiery I. 1987. Similarities between crystal protein subunits of - -
Bacillus thuringiensis strain 1884 serotype H 14 and strain PG-14 serotype H 8a 8b and their relationship with mosquitocidal activity. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138: 457-470.

- 50.- Tojo A. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay for the toxic fragment - of bipyramidal δ -endotoxin produced by Bacillus thuringiensis - - subsp. kurstaki strain HD-1. J. Sericult. Sci. Japan 54: - - - (4) 304-308.
- 51.- Tojo A., Aizawa K.: 1983. Dissolution and degradation of - - - - - Bacillus thuringiensis δ -endotoxin by gut juice protease of the - silkworm Bombix mori. Appl. Env. Microbiol. 45: (2) 576-580.
- 52.- Visser B., Workum M.V., Dulleman A. & Waalwijk C. 1986. The mosquito - cidal activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis is - - associated with Mr. 230,000 and 130,000 crystal proteins. FEMS- - Microbiol, Lett. 30: 211-214.
- 53.- Wakisaka Y., Masaki E., Koizumi K., Nishimota Y., Endo Y., Nishimura - M.S. & Nishitsutsuji-Uwo J. 1982. Asporogenous - - - - - Bacillus thuringiensis mutants producing high yields of δ -endo-- toxin. Appl. Env. Microbiol. 43: (6) 1498-1500
- 54.- World Health Organization, 1981. Annex 5, Tropical Dis. Res. Rpt. VEC- SWG(5)/81-3.
- 55.- Yamamoto T. 1983. Identification of entomocidal toxins of - - - - - Bacillus thuringiensis by high performace liquid chromatography. J.Gen. Microbiol. 129: 2595-2603.
- 56.- Yamamoto T. & Iizuka T. 1983. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystals of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. - - Arch. Biochem. Biophys. 227: (1) 233-241.
- 57.- Yamamoto T., Iizuka T. & Aronson J.N. 1983. Mosquitocidal protein of - Bacillus thuringiensis subsp. israelensis: Identification and - - partial isolation of the protein. Curr. Microbiol. 9: 279-284.
- 58.- Yamamoto T., García J.A. & Dulmage H.T. 1983. Immunological proper---

ties of entomocidal protein of Bacillus thuringiensis and its - -
insecticidal activity. J. Invertebr. Pathol. 41: 122-130.

- 59.- Yamamoto T. & McLaughlin R.E. 1981. Isolation of a protein from the -
parasporal crystal of Bacillus thuringiensis var. kurstaki toxic
to the mosquito larva, Aedes taeniorhynchus. Biochem. Biophys. --
Commun. 103: (2) 414-421.

ABREVIATURAS

subsp.	subespecie
var.	variedad
N	Normal
M	Molar
Da.	Daltons
mM	milimolar
mg/ml	miligramos por mililitro
μ g/ml	microgramos por mililitro
h	horas
d	días
rpm	revoluciones por minuto
cm	centímetros
mm	milímetros
°C	grados centígrados
%	por ciento
gr/lto	gramos por litro
nm	nanómetros
c/u	cada uno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
DTT	Dithiothreitol
PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida
ELISA	Análisis inmunoenzimático específico

FAC
N. I.