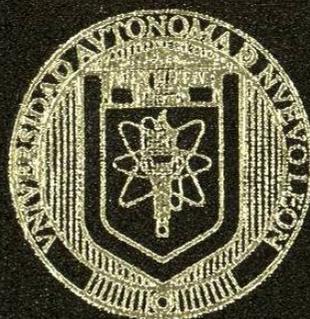


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE
DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES PARA
LA PRODUCCION DE DELTA-ENDOTOXINA
DE B. thuringiensis VAR. israelensis H-14

TESIS

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

PRESENTA

Q.B.P. MA. GUADALUPE MALDONADO BLANCO

MONTERREY; N. L.; MEXICO; NOVIEMBRE DE 1994

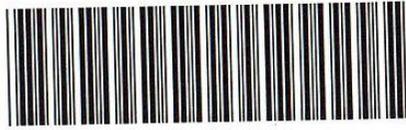
TM

Z5320

FCB

1994

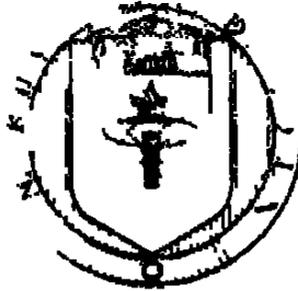
M3



1020091489

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE
DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES PARA
LA PRODUCCION DE DELTA-ENDOTOXINA
DE B. t. u. 'ngiensis VAR. is celensis H-14**

T E S I S

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

P R E S E N T A

○ B P MA. GUADALUPE MALDONADO BLANCO

MONTERREY, N. L. ; MEXICO; NOVIEMBRE DE 1994

TM
Z

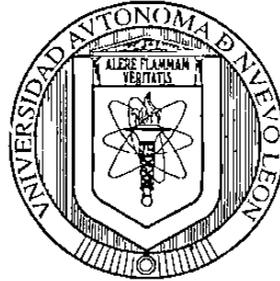
1 4
1 3



FONDO TESIS

166745

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



**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE SUBPRODUCTOS
AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCION DE δ -ENDOTOXINA DE
B. thuringiensis VAR. *israelensis* H-14**

TESIS

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

PRESENTA

Q.B.P. MA. GUADALUPE MALDONADO BLANCO

MONTERREY, N.L., MEXICO

NOVIEMBRE DE 1994

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

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE SUBPRODUCTOS
AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCION DE δ - ENDOTOXINA DE
B. thuringiensis VAR. *israelensis* H-14**

TESIS

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

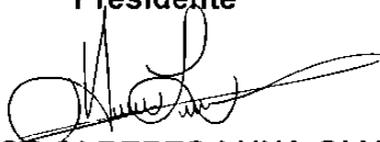
PRESENTA

Q.B.P. MA. GUADALUPE MALDONADO BLANCO

COMISION DE TESIS



DR. LUIS JESUS GALAN WONG
Director
Presidente



M.C. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA
Secretario



M.C. ALFONSO FLORES LEAL
Vocal

DEDICATORIA

A MIS PADRES: Sr. Román Maldonado González.(†) y Sra. Ma. Guadalupe Blanco Quiroz.

Por su cariño y esfuerzo en nuestra formación.

A MI ESPOSO: Ing. Juan Antonio Garza González.

Por el gran amor y apoyo que me ha brindado para el logro de mis metas.

A MIS HIJOS: Antonio Hefer y Orel Rodrigo.

Mis más grandes orgullos y estímulos para seguir adelante.

A MIS HERMANOS : Por todos los momentos que hemos pasado juntos

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, SUPREMO CREADOR DEL UNIVERSO, por todas las bendiciones que me ha concedido.

A todas las personas e instituciones que hicieron posible la terminación de esta obra, muy especialmente a :

CONACYT

Por la beca-crédito otorgada.

Dr. Luis J. Galán Wong

Por la ayuda inestimable prestada y sus valiosas recomendaciones y sugerencias.

M. C. Hugo A. Luna O.

Por sus contribuciones y trabajo de revisión.

M. C. Alfonso Flores L

Por sus sugerencias y las facilidades prestadas en el aporte del material para bioensayos.

M.C. Ma. Luisa Rodríguez T.

Por sus diversas aportaciones y sugerencias.

INDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS E HIPOTESIS	5
ANTECEDENTES	6
I. <i>Bacillus thuringiensis</i> .	6
1.- Control biológico.	6
2.- Desarrollo.	7
3.- Características de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .	12
a) Morfología celular y clasificación.	12
4.- Toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i> .	13
5.- La delta endotoxina.	15
6.- Mecanismo de acción de la toxina de <i>B.t.i</i> .	16
7.- Resistencia.	17
8.- Persistencia.	18
9.- Ventajas y desventajas del uso de <i>B. thuringiensis</i> .	19

10.- Productos comerciales a base de <i>B.t.i.</i> y compañías productoras.	21
II.- Biotecnología de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.	21
1.- Medios de producción:	21
2.- Condiciones de fermentación.	27
a) Inóculo.	27
b) Temperatura y pH.	28
c) Agitación y Aereación.	28
3.- Recuperación del bioinsecticida.	29
4.- Bioensayos y Estandarización.	30
5.- Genética.	32
MATERIAL Y METODOS	40
1.- Obtención de las cepas bacterianas.	40
2.- Activación y conservación de las cepas.	40
3.- Diseño de medios de cultivo.	40
4.- Preparación de cultivos para bioensayos preliminares.	44
5.- Bioensayos preliminares con cultivo total.	44
6.- Bioensayos para la determinación de la CL ₅₀ con cultivo total.	45
7.- Análisis de bioensayos.	46
8.- Fermentación a nivel de matraz Erlenmeyer.	46
9.- Parámetros de fermentación.	48

10.- Recuperación del complejo espora-cristal.	48
11.- Producción obtenida.	48
12.- Actividad del extracto insecticida de <i>B.t.i.</i>	49
13.- Actividades de algunos productos comerciales.	49
14.- Formulación del extracto más efectivo y determinación de su potencia.	50
RESULTADOS	51
1.- Cultivos totales utilizados en bioensayos preliminares.	51
2.- Resultados de bioensayos preliminares.	51
3.- Resultados de bioensayos para determinación de la CL ₅₀ con cultivos totales.	54
4.- Resultados de la fermentación a nivel de matraz.	54
a) Cinética de fermentación.	54
5.- Producción del extracto espora-cristal de <i>B.t.i.</i> 225.	67
6.- Actividad del Estándar IPS-82.	69
7.- Actividad de los extractos insecticidas producidos en las seis combinaciones del medio MPG.	70
8.- Actividad presentada por bioinsecticidas comerciales, ensayados a nivel de laboratorio.	72
9.- Actividad presentada por formulados a base de <i>B.t.i.</i> 225.	74

DISCUSION Y CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	85
LITERATURA CITADA	86

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B.t.i</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .	GRIEGAS
CL ₅₀	Concentración letal media	α Alfa
CL ₉₅	Concentración letal 95	β Beta
col.	Colaboradores	γ Gamma
DL ₅₀	Dosis letal media	δ Delta
g/l	Gramo(s) por litro(s)	
g/100 ml	Gramo(s) por 100 mililitros	
g/m ²	Gramo(s) por metro cuadrado	
h	Hora(s)	
Ha	Hectárea(s)	
KDa	Kilodaltones	
Kg/Ha	Kilogramos por Hectárea	
l	Litro(s)	
L.R.M.	Líquido de remojo de maíz	
mg	Microgramo(s)	
mm	Micrómetros	
mg/ml	Microgramo(s) por mililitro	
mg/l	Miligramo(s) por litro	
mg/100 ml	Miligramo(s) por 100 mililitros	
ml	mililitro(s)	
ml/M ²	mililitro(s) por metro cuadrado	
min	minuto(s)	
ng/ml	nanogramo(s) por mililitro	
nm	nanómetros	
p.p.m	Partes por millón	
p/p	Peso por peso	
p/v	Peso a volumen	
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones Hidrógeno	
r.p.m.	revoluciones por minuto.	
subsp.	Subespecie	
UFC/ml	Unidade(s) Formadora(s) de Colonia(s) por mililitro.	
UI	Unidades Internacionales	
UTI/mg	Unidades Tóxicas Internacionales por miligramo	
var.	Variedad	
v/v	Volumen a volumen	

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , con cultivos totales de <i>B.t.i.</i> propagados en diferentes medios de cultivo.	53
2	Toxicidad de cultivos totales de <i>B.t.i.</i> (dilución 10^{-6}) propagados en diferentes medios de cultivo sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	56
3	Concentraciones letales medias con cultivo total de <i>B.t.i.</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	57
4	Cinética de fermentación de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en la combinación 1 del medio MPG (1% melaza, 3% pasta en polvo)	59
5	Cinética de crecimiento de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en la combinación 2 del medio MPG (1% melaza, 5% pasta en polvo).	60
6	Parámetros de fermentación de <i>B.t.i.</i> cepa 225	62

	propagada en la combinación 3 del medio MPG (1% melaza, 7% pasta en polvo).	
7	Curva de crecimiento de <i>B.t.i.</i> cepa 225 cultivada en la combinación 4 del medio MPG (2% melaza, 3% pasta en polvo).	63
8	Cinética de crecimiento de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en la combinación 5 del medio MPG (2% melaza, 5% pasta en polvo).	65
9	Cinética de fermentación de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en la combinación 6 del medio MPG (2% melaza, 7% pasta en polvo).	66

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página
1	Clasificación de las proteínas del cristal producido por <i>B. thuringiensis</i> .	14
2	Productos comerciales a base de <i>B.t.i</i> disponibles en el mercado.	21
3	Evaluación y comparación de seis cepas bacterianas potenciales para expresión de proteínas tóxicas a mosquitos.	39
4	Cepas de <i>B.t.i.</i> evaluadas .	40
5	Análisis bromatológico de materias primas y subproductos utilizados en el diseño de medios de cultivo para <i>B.t.i.</i>	42
6	Composición de los medios de cultivo utilizados para producción de la δ -endotoxina de <i>B.t.i.</i>	43
7	Combinaciones del medio de cultivo MPG (melaza y pasta en polvo) para producción del complejo	47

	insecticida de <i>B.t.i.</i>	
8	Porcentajes de mortalidad de bioensayos preliminares realizados con las diluciones 10^{-6} de 42 cultivos totales de <i>B.t.i.</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> de tercer estadio tardío.	52
9	Porcentajes de mortalidad presentados por la dilución 10^{-6} de cultivos totales de cinco cepas de <i>B.t.i.</i> propagadas en tres diferentes medios de cultivo y CL_{50} sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> de tercer estadio tardío.	55
10	Cinética de fermentación de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en la combinación 1 del medio MPG.	59
11	Cinética de crecimiento de <i>B.t.i.</i> cepa 225 cultivada en la combinación 2 del medio MPG.	60
12	Parámetros de fermentación de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en la combinación 3 del medio MPG.	62
13	Curva de crecimiento de <i>B.t.i.</i> cepa 225 cultivada en la combinación 4 del medio MPG.	63
14	Cinética de crecimiento de <i>B.t.i.</i> cepa 225	65

	cultivada en la combinación 5 del medio MPG.	
15	Cinética de fermentación de <i>B.t.i.</i> cepa 225 cultivada en la combinación 6 del medio MPG.	66
16	Crecimiento máximo, azúcares residuales y pH mínimo presentado en una fermentación de 72 horas de <i>B.t.i.</i> cepa 225 propagada en seis combinaciones del medio MPG.	67
17	Producción, concentraciones letales medias y potencia de los extractos espora-cristal de <i>B.t.i.</i> cepa 225 obtenidos en seis combinaciones del medio MPG.	68
18	Porcentajes de mortalidad presentados por distintas concentraciones del estándar IPS-82, sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	70
19	Cifras estadísticas del bioensayo con el estándar IPS-82 contra <i>Aedes aegypti</i> .	70
20	Cifras estadísticas de los bioensayos realizados con los extractos espora-cristal de <i>B.t.i.</i> cepa 225 obtenidos en seis combinaciones del medio MPG	72

	sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	
21	Concentraciones letales medias y actividades comparativas de bioinsecticidas comerciales determinadas sobre <i>Aedes aegypti</i> a nivel de laboratorio.	73
22	Cifras estadísticas de bioensayos realizados con bioinsecticidas comerciales, a base de <i>B.t.i.</i> , contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	74
23	Actividad insecticida presentada por formulados preparados al 10% de ingrediente activo de <i>B.t.i.</i> cepa 225 + 90% de ingrediente inerte.	75
24	Cifras estadísticas de bioensayos con formulados a base de <i>B.t.i.</i> cepa 225 contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> , a las 24 horas de exposición.	76
25	Concentraciones letales medias y actividades comparativas de bioinsecticidas comerciales y formulados preparados a base de ingrediente activo de <i>B.t.i.</i> 225, sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	77

Dentro de los agentes de control biológico utilizados en la erradicación de insectos vectores de enfermedades, como mosquitos y moscas negras, *B. thuringiensis var. israelensis* ha demostrado ampliamente su efectividad, que aunado a sus ventajas de seguridad, especificidad y bajas expectativas de desarrollo de resistencia en los insectos, con respecto a los agentes químicos, hacen atractiva la investigación en el desarrollo de nuevas cepas y/o mejoramiento genético de las mismas, optimización de la producción y formulaciones. Por lo anteriormente expuesto, con el objeto de seleccionar una cepa efectiva de *B.t.i.*, en base a su toxicidad obtenida en medios compuestos de sustratos agroindustriales y subproductos locales, disponibles en el Noreste de México, tales como harina de soya, harinolina, harina de pescado, gluten de maíz, pasta en polvo, pasta de soya y melazas, se propagaron siete cepas de *B.t.i.* en seis medios diseñados con dichos subproductos de la región, se evaluaron los cultivos totales obtenidos mediante bioensayos contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío, y mediante análisis Probit se obtuvieron las concentraciones medias letales cuyas cifras mínimas fueron de 4.7593×10^{-7} y 4.8743×10^{-7} diluciones de cultivo total, correspondientes a las cepas de *B.t.i.* claves 001 y 225 respectivamente, ambas cultivadas en el medio MPG (melaza y pasta en polvo), el cual, posteriormente, con el propósito de optimizar rendimiento y actividad del complejo insecticida, se preparó en seis combinaciones diferentes, variando las concentraciones de los componentes ya mencionados, y en ellas se propagó la cepa de *B.t.i.* clave 225, que alcanzó niveles de crecimiento de entre 0.3 a 7.3×10^9 UFC/ml de cultivo, y al término de 72 a 96 horas de fermentación produjo el complejo insecticida, que una vez extraído del medio de fermentación, se probó contra larvas de *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano y los porcentajes de mortalidad obtenidos se registraron a las 24 horas de exposición, y así determinaron que el extracto insecticida más potente fue el obtenido en la combinación 1 del medio MPG, compuesta por 1 % de melaza y 3 % pasta en polvo, que produjo 13.05 g de extracto/l en promedio, una CL_{50} de 0.0317 mg/l y una potencia de 4,400.6 UTI/mg, mientras que el estándar IPS-82 mostró una CL_{50} de 0.0093 mg/l. Al formular el extracto más potente, con un 10 % de ingrediente activo + 90 % de ingrediente inerte (talco ó tierra de diatomeas) además de 1 % de Tritón X-114, y probarlo contra el mismo insecto ya mencionado y en las mismas condiciones que para los extractos, se obtuvieron valores de CL_{50} de 1.3213 y 1.9073 mg/l, para el formulado con talco y con tierra de diatomeas respectivamente, por lo que la potencia obtenida fue de 105.68 y 73.42 UTI/mg para cada uno de los formulados descritos en el mismo orden. Al compararlos con los bioinsecticidas comerciales probados, resultaron inferiores en potencia a Bactimos®, que mostró 1,809 UTI/mg, a Teknar®, que resultó con 1,508 y a ABG®-6168, con 270 UTI/mg; y fueron superiores a Vectobac®, que presentó solo 18 UTI/mg.

Within biological control agents utilized on eradication of disease vectors, which mosquitoes and blackflies, *B. thurigiensis* var. *israelensis* has demonstrated efficacy along worldwide, in addition to advantages of safety, specificity, and low expectation of development of resistance on insects, compared to chemical agents, that make attractive the research on development of new strains, and/or their genetic improvement, optimal conditions for δ -endotoxin production and formulations. Due to above mentioned, with objet to select a active strain of *B.t.i.*, based on toxicity obtained on media composed for substrates and byproducts cheap, locally available, in Northeast of Mexico, such as soybean flour, cottonseed meal, fish meal, corn gluten, soup paste powder, soybean paste, and molasses, seven strains of *B.t.i.* were propagated on six media designed with above raw materials, subsequent, the whole cultures were evaluated by means bioassays against late third instar larvae *Aedes aegypti* Linneo; the results were analyzed with Probit analysis which showed lowest mean concentrations letals (LC_{50}) were 4.7593×10^{-7} and 4.8743×10^{-7} dilutions of whole culture correspondent to *B.t.i.*'s strains keys 001 and 225 respectively, both cultivated on media MPG (molasses and soup paste powder) which, for purpose increasing yields and insecticide activity, was prepared in six different combinations, with variable concentrations of constituents above mentioned, and there was cultivated the strain of *B.t.i.*225, who reached a viable cell count of $0.3-7.3 \times 10^9$ CFU/ ml of cultive, and after fermentation of 72-96 h, yielded insecticides complexes, that were extracted of media fermentation, and were tested against early fourth instar larvae *Aedes aegypti*; the mortality percentajes were recorded at 24 h and proved the most toxic extract spore-crystal was obtained on the medium MPG combination 1, composed by 1 % molasses and 3 % soup paste powder, yielded a mean of 13.05 g extract/l, a LC_{50} 0.0317 mg/l, and potency of 4,400.6 ITU/mg of extract, whereas standard IPS-82 showed a LC_{50} 0.0093 mg/l. When the extract most toxic was formulated, with 10 % active ingredient, besides 90 % inert ingredient (talc or Diatomaceous Earth) more Triton X-114, and tested against same insect, under same conditions, were found LC_{50} of 1.3213 and 1.9073 mg/l, for formulate with talc and with Diatomaceous Earth, respectively, therefore the potency obtained was 105.68 and 73.43 ITU/mg for both formulates, that compared with commercial bioinsecticides resulted lower than Bactimos®, who showed 1,809 ITU/mg, Teknar®, with 1,508 and ABG®-6168 with 270 ITU/mg, only was higher than Vectobac®, who showed 18 ITU/mg.

INTRODUCCION

Los mosquitos son insectos que se encuentran distribuidos en todo el mundo, donde las larvas y pupas siempre son acuáticas, (Faust y col. 1974), figurando entre los vectores de enfermedades importantes miembros de las subfamilias *Anophelinae* y *Culicidae*, (Porter y col. 1993). Los mosquitos *Anopheles* transmiten malaria, filariasis y unos cuantos Arbovirus, (Service 1986) mientras que dentro de la subfamilia *Culicidae* destacan cuatro géneros de importancia médica, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* y *Armigeres*; *Culex quinquefasciatus* es un vector importante de filariasis, *C. tritaeniorhynchus* transmite la encefalitis japonesa, en tanto que miembros del género *Aedes* transmiten virus de la fiebre amarilla y dengue, también como filariasis en algunas partes del mundo (Service 1986).

El ataque contra el mosquito quizá sea la única esperanza de erradicación de estas enfermedades, (Miller 1992) que se ha llevado a cabo en los últimos 45 años mediante el uso de plaguicidas químicos tales como DDT, Malathión, Clordano, carbamatos y piretrinas (Fontaine 1980). Sin embargo, su uso indiscriminado está repercutiendo en el ambiente, la economía y la sociedad; además, la aparición de resistencia por parte de los insectos a tales sustancias de origen sintético, se incrementa constantemente, de tal forma que se prevé que para el año 2000, casi todas las especies de insectos tendrán resistencia a alguna sustancia en particular, (Metcalf 1989). De ahí la necesidad de búsqueda de métodos alternos de control de plagas, como lo es el control biológico, que incluye el uso de depredadores, parásitos, y patógenos, (Rodríguez-Monroy y col. 1991).

Ciertas bacterias entomopatógenas, particularmente miembros del género *Bacillus*, tales como *Bacillus thuringiensis*, (*B.t.*) y *Bacillus sphaericus*, (*B.s.*), producen protoxinas o cristales tóxicos durante la esporulación, (Angus 1954, Davidson y Myers 1981). Estas proteínas también llamadas δ -endotoxinas, son depositadas como inclusiones junto con la espora y son altamente tóxicas a los insectos susceptibles, los cuales las ingieren, posteriormente estas protoxinas se disuelven en el pH alcalino del intestino medio del

insecto, son protelíticamente activados y se unen a las membranas de las células epiteliales, (Aronson 1986, Baumann y col., 1991, Höfte y Whiteley, 1989). Como consecuencia, las células se destruyen, la larva cesa de alimentarse y muere. Así, dependiendo de la cepa particular de *B. thuringiensis*, las proteínas tóxicas pueden ser específicas para miembros de *Lepidóptera*, *Coleoptera* o *Díptera*, y también se han descubierto cepas activas contra otros invertebrados, tales como Protozoarios y Nemátodos, (Feitelson y col. 1992).

Este potencial de *B.t.* actualmente se ha reconocido ampliamente alrededor del mundo, de tal forma que las industrias en muchos países producen una o más formulaciones, principalmente con la subespecie *kurstaki* (HD-1), usada en el control de insectos lepidópteros, y la subespecie *israelensis* (*B.t.i.*) contra mosquitos y moscas negras, (Dulmage 1989). La gran potencia y especificidad de esta última, su velocidad de acción, su ausencia de efectos sobre otros organismos no blanco, ha fortalecido el control microbiano de insectos vectores de enfermedades humanas, en los últimos años, (De Barjac 1989).

A nivel local se ha estado implementando la tecnología de producción de *B.t.*, principalmente para control de Lepidópteros, por lo que con este trabajo, tratamos de contribuir a complementar nuestro conocimiento en esta línea de investigación, orientada hacia el control de mosquitos, en particular *Aedes aegypti* Linneo.

Tomando en cuenta que en nuestro país, existe muy poca información relacionada con la biotecnología de producción de *B.t.i.* y con la esperanza de desarrollar medios de cultivo económicos, convenientes para la producción de la δ - endotoxina de esta bacteria, nos propusimos los siguientes:

OBJETIVOS

Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14, tóxicas a mosquitos, existentes en la Colección del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Fac. de Ciencias Biológicas, de la U.A.N.L.

Diseño de medios de cultivo con diferentes subproductos agroindustriales de la región.

Evaluación de los productos espora- cristal recuperados de los medios diseñados, contra larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, a nivel de laboratorio.

HIPOTESIS

Nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

Suponemos que los productos que contienen la delta (δ) endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 obtenidos en medios de cultivo basados en subproductos agroindustriales, mantendrán una eficacia y eficiencia igual o mejor a nivel de laboratorio, que los de algunos productos comerciales.

ANTECEDENTES

I. *Bacillus thuringiensis*

1.- Control Biológico.

Este existe desde hace varios siglos en el Lejano Oriente y desde hace más de 100 años en Europa y Estados Unidos (Frost y Sullivan, 1990) y puede definirse como la acción de parásitos, predadores o patógenos, para mantener la densidad de población de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia, según el concepto de Paul DeBach, 1964; posteriormente, en 1987, Gabriel y Cook redefinen este concepto, como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente, genes o sus productos, para reducir los efectos de organismos plaga.

Los insectos son susceptibles al ataque de una gran variedad de microorganismos, incluyendo virus, (Stairs, 1971), bacterias (Aizawai y col., 1975 y Reardon, 1990), hongos, (Soper y LacLeod, 1981 y Steinkraus, 1990) y protozoarios (Henry, 1971 y Sprenkel y col., 1979).

Actualmente se conocen cerca de 100 especies de bacterias entomopatógenas, entre las que sobresale *Bacillus thuringiensis*, quien ha sido estudiada con más detalle y empleada contra plagas de importancia agrícola, forestal, ornamental y salud pública (Galán Wong, 1993) y algunas de las variedades de esta bacteria han llegado hasta su desarrollo comercial.

La actividad biológica de *Bacillus thuringiensis* abarca distintos órdenes de insectos, entre los que se encuentran Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros, y más recientemente se ha encontrado actividad contra otros invertebrados tales como Nematodos (Bonne y col., 1985) y Protozoarios patógenos (Thompson, 1992). Hasta la fecha, el proceso continúa, ya que entre los insectos, Feitelson y col., (1992), han encontrado actividades contra

algunas especies de Dípteros, incluyendo moscas del tipo Agromyzidae y mosca doméstica adulta (*Musca domestica*).

De las distintas serovariedades existentes de *B. thuringiensis* (*B.t.*) destaca la variedad *israelensis*, (*B.t.i.*) que según numerosos estudios y reportes, resulta muy activa contra larvas de mosquitos (72 especies) y moscas negras (22 especies), Margalit y Dean, (1985), citados por Rowe y Margaritis, (1987).

El uso de este organismo para control de vectores de enfermedad se ha expandido rápidamente bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud. Algunas compañías han desarrollado productos comerciales de *B.t.i.*, aunque su mercado es considerado de tamaño restringido comparado a los insecticidas agrícolas. Mientras que los productos en venta iniciales con esta bacteria fueron mayormente formulaciones de polvo humectable, más recientemente se han desarrollado concentrados líquidos y formas granulares, Lacey y Heitzman, (1985) y Lacey y Inman, (1985).

2. Desarrollo.

Aunque *B.t.* fue aislada desde principios de este siglo, por Ishiwata, quien descubrió su acción patogénica en larvas del gusano de seda, (Norris, 1978), hasta 1970 solamente se conocía actividad contra insectos lepidópteros, sin embargo, fue hasta el año 1977, cuando se descubrió, en Israel, una nueva serovariedad de esta bacteria que tenía efecto larvicida sobre especies de mosquitos y moscas negras (Goldberg y Margalit, 1977).

En 1968, De Barjac y Bonnefoi habían propuesto un sistema de clasificación de las cepas de *B. thuringiensis* en base a sus antígenos flagelares H, ya que estos son estables y específicos, así que al caracterizar a la nueva cepa tóxica para dípteros le dieron el nombre de *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14 ,(De Barjac 1978a). Posteriormente, De

Barjac (1978b), presentó evidencia histopatológica de que el epitelio del intestino era el blanco primario de acción de la toxina para estos insectos.

Más tarde, en 1983, Thomas y Ellar, determinaron los efectos del cristal nativo y en su forma solubilizada con álcali sobre diversas líneas celulares de invertebrados y mamíferos, *in vitro* e *in vivo* y encontraron evidencia de que la toxina solubilizada con álcali causó cambios citológicos y citopatológicos, en *Aedes albopictus*, *Choristoneura fumiferana* 63 CF1, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*, no así los cristales nativos; además la toxina solubilizada mostró una respuesta similar a la presentada en insectos, en varios tipos celulares de mamíferos, como fibroblastos de ratón, linfocitos primarios de cerdo y tres tipos celulares de carcinoma epitelial de ratón, causando también hemólisis en eritrocitos de ratón, cordero, caballo y humanos.

A partir de 1978, se hicieron diferentes pruebas de laboratorio y de campo, para determinar su efectividad hacia diversas especies de dípteros, en muchas partes del mundo, como las siguientes :

En 1978, Guillet y Escaffre, citados por Lépine, (1979), realizaron estudios con un producto llamado R-153-78, distribuido por el Instituto Pasteur; este complejo de esporas y cristales fue probado contra larvas de simúlidos vectores de la Oncocercosis, obteniendo un 100 % de mortalidad a las 24 horas con concentraciones de 0.2×10^{-5} / 10 min, también se comparó con compuestos orgánicos sintéticos como Temephos y Chlorphoxim, logrando resultados favorables.

En el reporte de Tyrell y col., (1979), determinaron la toxicidad de los cristales de *B.t.i.*, sobre tres especies de mosquitos, *Aedes aegypti* (Linneo), *Culex pipiens*. var. *quinquefasciatus* (Say) y *Anopheles albimanus* (Wiedemann) y encontraron concentraciones letales medias de 1.9×10^{-4} , 3.7×10^{-4} y 8×10^{-3} m g / ml, respectivamente, a las 48 horas de exposición, demostrando con esto que el grado de susceptibilidad es de mayor a menor en las especies enumeradas aquí.

En el trabajo realizado por Ignoffo y col. (1981), compararon la actividad de las toxinas de *B.t.i.* y *B. t. var. kurstaki (B.t.k)*, sobre las especies de mosquitos *Aedes aegypti* (Linneo) y *Culex quinquefasciatus* (Say), después de una exposición de 24 horas a la toxina, encontraron CL_{50} sobre *Aedes* de 0.054 y 210 mg / ml, para *B.t.i.* y *B.t.k.*, respectivamente, mientras que en los bioensayos contra *Culex*, las CL_{50} fueron de 0.11 y 2.2 mg/ml para *B.t.i.* y *B.t.k.* respectivamente, y así quedó demostrada la mayor eficiencia de *B.t.i.* sobre larvas de mosquito.

Diversos estudios conducidos a nivel de laboratorio con tres diferentes formulados de *B.t.i.*, IPS- 78, SAN -402- 1 y Bactimos®, sobre cuatro especies de mosquitos de Malasia, mostraron que las sensibilidades de las especies probadas fueron diferentes, *Aedes aegypti* el más sensible, seguido de *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles balabacencis* y por último *Mansonia indiana* y la eficacia de los formulados varió en relación a los hábitos alimenticios, hábitat y tipo de formulación,(Foo y Yap, 1982).

Mulla y col (1982), probaron cuatro formulaciones comerciales, a nivel de campo, contra larvas de mosquito *Aedes nigromaculis* y *Psorophora columbiae*, con métodos de aplicación aérea, con los cuales obtuvieron reducciones de las poblaciones de 2do. y 3er estadio desde un 83- 100 %; presentó una mayor efectividad la formulación de Bactimos®.

También en 1982, Lacey y col, utilizaron una formulación producida por Sandoz®, y lograron una mortalidad completa de las larvas de *Simulium damnosum*, en las riveras del Río Marahoué en la Costa de Ivory, después del tratamiento con 1.5 p.p.m. / 10 min.

Asimismo Guillet y col., (1982), probaron una formulación también de Sandoz®, contra el vector de la Oncocercosis en Africa, *Simulium damnosum*, y lograron el 100 % de control aplicando dosis de 1.6 mg/l/10 min, en aplicación aérea.

García y col., (1983), emplearon dos formulaciones comerciales en el campo, contra diversas especies de *Aedes spp* y *Culex spp* y lograron reducciones de las poblaciones desde un 33- 92 % con diversas tasas de dosis de 0.25, 0.50 y 0.75 Kg / Ha.

Majori y Ali, (1984), a nivel de laboratorio y campo, emplearon formulaciones comerciales de *B.t.i.*, lograron el control de poblaciones de mosquitos de tres especies, *Culex pipiens*, *Aedes caspius* y *Aedes detritus*, con rango de dosis, desde 0.15 Kg/Ha, con Bactimos®, hasta 1 Kg/Ha con Vectobac®; así como también con Teknar® con dosis de 2.5 l/Ha, la susceptibilidad mayor fue para *Aedes detritus*, después *Aedes caspius* y por último, *Culex pipiens*.

Riley y Fusco (1990), realizaron pruebas de campo, en New Brunswick, al Este de Canadá, con dos formulaciones de *B.t.i.*, contra larvas de moscas negras, en seis campos de prueba; en estos, las aplicaciones equivalentes a 25 p.p.m de Vectobac®-12 AS ó 12.5 p.p.m de Vectobac® 24 AS, sobre un período de 1 min, resultaron en el 100 % de control de las larvas.

Knepper y col., en 1991, en su trabajo realizado sobre mosquitos de diversas especies de *Aedes*, en el área de Saginaw, Michigan, que emergen en primavera y verano, usaron Vectobac® 12 AS mezclado con agua a una tasa de 1:3 y aplicado con helicóptero en cantidades de 1.17 l/Ha, fue efectivo en un 99 % a tamaño de gota pequeño (178 mm), sin embargo, resultó inefectivo, (65 %) a un tamaño de gota grande (553 mm) contra larvas de *Aedes* en lagunas que se forman con la nieve derretida.

Zaim y col. (1992), aplicaron un concentrado fluido de *B.t.i.*, el Bactimos® FC y también un concentrado emulsificable de Abate®, en estanques simulados y sitios de alimentación naturales de mosquitos, en el Sureste de Irán. El Bactimos® FC, aplicado a una tasa de 0.2 ml / M², causó 93-96 % de mortalidad en anofelinos y 97 % en Culicinos, mientras que el Abate® en concentración de 0.015 ml / M², causó la muerte del 98.1 % de anofelinos y 100 % de Culicinos a las 24 horas de aplicación.

En México, hay pocos reportes relacionados al control microbiano de mosquitos, entre ellos se encuentra el realizado por Pérez- Orona y col, (1985), en el cual usaron tres cepas de *B.t.* aisladas de suelo, GM-1, GM-7 y GM-13, Los extractos obtenidos fueron probados contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio y *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus*; las concentraciones letales medias obtenidas a las 72 horas fueron de 1410 mg/l y de 316 mg/l para *Aedes* y *Culex* respectivamente, con la cepa GM-1, mientras que GM-7 mostró solo actividad contra *Culex*, con una CL_{50} de 125.89 mg/l, en tanto que GM-13 no tuvo efecto en ninguna de las especies probadas.

En el reporte presentado por Arredondo-Jiménez y col (1990) evaluaron la eficacia de dos formulaciones comerciales de *B. sphaericus*, cepa 2362 contra *Anopheles albimanus* y Culicinos, principalmente *Culex coronator* y *Cx. quiquefasciatus*, que son larvas de mosquito comunes del Sureste de México. Aplicaron seis dosis de cada formulación granular y líquida. Las concentraciones óptimas de cada formulación para el control efectivo de las poblaciones larvales sobre períodos de 3-4 meses fueron de 0.125 ml/M² del producto líquido para *Culex spp* y 2 g/M² del producto granular para *A. albimanus*.

Rodríguez y col (1991), en su trabajo realizado sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Culex sp*, probaron un formulado obtenido a partir de la cepa de *B.t.i.* recuperada del estándar internacional IPS-82 y producida a nivel local en un medio con melaza y Líquido de remojo de maíz. La potencia del ingrediente activo determinada en larvas de *A. aegypti* fue de 3,571.42 UTI/mg, resultó cinco veces menos potente que el estándar, en tanto que la potencia del formulado preparado, contra *Aedes aegypti* fue de 109.1 UTI/mg a nivel de laboratorio, y contra *Culex spp* a nivel de campo fue de 77.92 UTI/mg.

Lozano- González y López- Barbosa, (1992) evaluaron el formulado de *Bacillus sphaericus* 2362 (BSP-2) a nivel de laboratorio contra *Culex quinquefasciatus*, para determinar persistencia y viabilidad, encontraron una CL_{50} equivalente a 818 ng/ml, mientras que en la prueba de persistencia y viabilidad de esporas del formulado ABG-

6185, detectaron una mortalidad del 100 % en *Culex quinquefasciatus* hasta los 25 días, que disminuía a 19 días en una segunda prueba.

Rodríguez y col, (1992) reportaron los resultados de evaluaciones de laboratorio y de campo empleando formulados comerciales y preparados locales de *B.t.i.* y *B. sphaericus* contra especies de Culicidos de Nuevo León. Las formulaciones comerciales de *B.t.i.* (Bactimos® y ABG®-6168) y una formulación diseñada localmente(*B.t.i.* FDL 91) fueron más activas contra larvas de *Aedes aegypti* criadas en el laboratorio que *Culex quinquefasciatus* en iguales condiciones. Las larvas de *Culex quinquefasciatus* colectadas del campo fueron más susceptibles a la formulación local de *B.t.i.* (FDL-91) que aquellas criadas en laboratorio. La formulación comercial de *B. sphaericus* dió resultados satisfactorios con *Cx quinquefasciatus* de laboratorio, mientras que la formulación local fue ligeramente más efectiva en las muestras colectadas en el campo.

De todo lo anterior, hemos de señalar que en distintas partes del mundo ya estan debidamente demostrados los beneficios del control microbiano de mosquitos, y su uso está auementando, como consecuencia de la mayor conciencia ambiental, en nuestro pais apenas empieza a vislumbrarce su uso, por lo que hace falta más investigación, pruebas tanto de laboratorio como de campo, formulaciones mejoradas,disminución de costos, junto con mayor difusión de los beneficios del control microbiano. Creemos que esto debe de ir cambiando poco a poco y.que debido a los problemas de contaminación y resistencia que iran apareciendo, se volteea la vista hacia otras alternativas de control y que esto nos lleve a una mayor investigación y afluencia de recursos para ello.

3. Características de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

a) Morfología Celular y Clasificación.

B. thuringiensis en general es un miembro del grupo I del género *Bacillus*, el cual incluye *B. subtilis*, *B. licheniformis*. *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. anthracis*, muy

estrechamente relacionado a *B. cereus*, distinguible de este por la presencia de un cuerpo parasporal y por antígenos flagelares específicos. Las células vegetativas son bacilos gram (+), de 2-5 X 1 μm , con flagelos peritricos. Se dividen por fisión binaria y frecuentemente ocurren en cadenas, las esporas son ovals y producidas en posición subterminal, sin hinchamiento, tanto la espora como el cristal de proteína son formados al mismo tiempo en la mayoría de las variedades, usualmente fuera de la membrana de la espora, (Rowe y Margaritis, 1987).

El esquema de clasificación de las distintas variedades o serotipos, está basado en el tipo de antígeno de las proteínas flagelares, desarrollado inicialmente por De Barjac y Bonnefoi en 1962, y es suplementado por las pruebas bioquímicas iniciales para diferenciar ciertas variedades (De Barjac y Frachon, 1990).

Hasta 1992 se han conocido 34 serotipos diferentes, según la clasificación del Instituto Pasteur de París (De Barjac y Frachon, 1990).

Asimismo, Höfte y Whiteley, (1989), hicieron un esquema de clasificación en base a las proteínas del cristal. Dicho esquema, adaptado por Galán- Wong,(1993) es el siguiente de la Tabla 1.

Recientemente, Shevelev y col, (1993) detectaron una nueva secuencia estrechamente relacionada al gene *CryIG* de *B. thuringiensis* spp. *galleriae*, que denominaron *Cry X* , determinaron su carácter críptico y su tamaño aproximado de 4.5 kb.

4.- Toxinas producidas por *B. thuringiensis*.

Hay siete diferentes toxinas descritas para las cepas de *B.t.* :

1) Fosfolipasa C (α exotoxina), 2) Una exotoxina termostable(β exotoxina), 3) Una enzima no identificada que puede no ser tóxica, (τ exotoxina), 4) Proteína del cristal

Tabla 1.- Clasificación de las proteínas del cristal producido por *B. thuringiensis* de acuerdo a su organización proteica y rango de huésped*.

Tipo de Proteína	Peso Molecular(KDa)	Huésped*
Cry IA (a)	133.2	L
CryIA (b)	131.0	L
Cry IA (c)	133.3	L
Cry IB	138.0	L
Cry IC	134.8	L
Cry ID	132.5	L
Cry IF	133.2	L
Cry IG	133.6	L
Cry IIA	70.9	L
Cry IIB	70.8	L-D
Cry IIIA	73.1	C
Cry IIIB	74.237	C
Cry IIIB2***	74.393	C
Cry IIIC	129.4	C
Cry IIID	73.3	C
Cry IVA	134.4	D
Cry IVB	127.8	D
Cry IVC	77.8	D
Cry IVD	72.4	D
Cry V ?	81.2	L-C
Cry VA (a)**		N
Cry VA (b)**		N
Cry VIA**		N
Cry VIB**		N
CytA	27.4	Citotóxica

*L= Lepidópteros, C= Coleópteros, D= Dípteros, N= Nemátodos; ** El peso molecular no se ha reportado; ***Donovan y col(1992) ? Apareció después de Feitelson y col.(1992).

parasporal (δ endotoxina) 5) toxina lábil, 6) Toxina soluble en agua, 7) Exotoxina factor ratón (Faust y Bulla, 1982, citados por Rowe y Margaritis, 1987).

5.- La Delta endotoxina.

La δ -endotoxina de *B.t.i.*, o cristal de proteína, es el componente mayor del cristal parasporal formado durante la esporulación. Los cristales de *B.t.i.* son esferoovoides o cuadrados, en un rango de 700 a 1200 nm en diámetro, aunque también han sido descritos como heterogéneos en su forma y en su composición (Charles y De Barjac, 1982, citados por Rowe y Margaritis, 1987).

En general, se forma un cristal por célula, en las diferentes variedades de *B.t.*, aunque la var. *israelensis* produce en promedio tres inclusiones semicristalinas por célula (Insell 1983, Lee y col, 1985 y Armstrong 1985).

El cristal parasporal de *B.t.i.* está compuesto de subunidades de glicoproteína (5% de carbohidratos), con distintos pesos moleculares, que han sido deducidos de la secuencia de nucleótidos del gen; así, se determinaron cuatro componentes principales, con masas moleculares de 134, 128, 72 y 27 Kda. Las mitades carboxi-terminal de los polipéptidos de 134 y 128 Kda son homólogos y pertenecen a la familia de proteínas de 130 Kda encontrados en las cepas activas para lepidópteros y no son antigénicamente relacionados a ninguno de los polipéptidos de 72 y de 27 Kda (Pfannenstiel y col 1986, citados por Lereclus y col (1989).

Los genes y su respectiva clonación que codifican cada uno de estos polipéptidos permitió descubrir que los de 134, 128 y 72 Kda son mosquitocidas, mientras que la proteína de 27 Kda es responsable de actividad citolítica no específica. Las proteínas de 134 y 128 Kda poseen diferentes especificidades contra larvas de mosquito, (Bourgouin y col, 1988, Delécluse y col, 1988, citados por Lereclus y col, 1989). El polipéptido de 72 KDa, activo también contra larvas

de mosquitos, fue identificado como el producto ORF1 por Thorne y col (1886), y hay evidencia de que este polipéptido, actúa en forma sinérgica con la proteína de 128 Kda, contra larvas de ciertas especies de mosquito, (Delécluse y col 1988).

6.- Mecanismo de acción de la toxina de *B.t.i.*

Según estudios realizados por De Barjac, (1978 b) y posteriormente Charles y De Barjac, (1981), la típica patología y los síntomas en el insecto inducidos por la δ - endotoxina del cristal de *B.t.i.*, eran muy similares a los efectos en larvas de lepidópteros, causados por cepas activas contra ellos, tales como parálisis del intestino, cesación de la alimentación y subsecuente muerte del insecto. De Barjac también presentó evidencia histopatológica de que el epitelio del intestino era el blanco primario, ya que mostró el típico hinchamiento, seguido por lisis general del tejido.

Una vez que es ingerido el cristal por las larvas de insectos susceptibles, sobreviene la activación de la toxina por las proteasas del intestino larval, dando polipéptidos activos de 60 a 70 Kda, estos polipéptidos han sido identificados como las mitades N terminal de las moléculas de protoxina, (Chestukhina y col., 1982, Nagamatsu y col., 1984 y Schnepf y Whiteley, 1985). Las proteínas de 72 Kda de *B.t.i.* dan igualmente polipéptidos activos de 30- 35 Kda, Pfannestiel y col., (1986) mientras que la proteína de 27 kda no requiere activación para manifestar actividad *in vitro* (Chilcott y Ellar, 1988). Esta activación proteolítica es el primer paso del proceso de intoxicación que sigue a la ingestión de los cristales nativos, subsecuentemente ocurre una serie de eventos, tales como parálisis del intestino y de las partes de la boca y cambios en la permeabilidad del intestino (Fast, 1981, Lecadet, 1970, Lüthy y Ebersold, 1981).

A pesar de las diferencias en las manifestaciones de toxemia entre los diferentes grupos de insectos, los estudios histológicos *in vivo* revelaron que las células epiteliales del intestino medio larval, particularmente las de la membrana ciliar, son el blanco primario de las toxinas (Charles y De Barjac, 1981, 1982, Lüthy y Ebersold, 1981, Percy y Fast, 1983).

El daño importante consiste de hinchamiento celular y destrucción microvillar, progresiva desintegración de los organelos celulares y una vacuolización intracelular general.

La mayoría de los estudios están de acuerdo en el hecho de que después de que la protoxina ha sido activada, la toxina liberada se une a receptores específicos localizados sobre la superficie de la célula, como podría ser una proteína de membrana, (Knowles y Ellar, 1986). Sin embargo, estos últimos estudios han sido realizados solo para las toxinas activas para lepidópteros y coleópteros pertenecientes a las clases *Cry I* y *Cry III*, y en menor extensión, para la clase *Cry II* específica para lepidópteros y dípteros; pero también es cierto, que las clases *Cry IV A* y *Cry IV B*, activos contra dípteros muestran homología significativa en la secuencia de aminoácidos y estructura secundaria, con los productos del gene *Cry I* y *Cry III* y probablemente sus mecanismos de acción sean similares, (Porter y col 1993).

7.- Resistencia

Es un hecho que en los principios biológicos fundamentales la existencia de una capacidad de los insectos para desarrollar resistencia a los agentes de control microbiano es innegable, la resistencia sustancial al complejo espora- cristal de *B. thuringiensis*, no se espera que se desarrolle bajo condiciones de campo, (Boman, 1981). Algunos factores independientes contribuyen a esta conclusión. Debido a que los agentes insecticidas persistentes favorecen el desarrollo de resistencia a través del mantenimiento de una presión selectiva para cepas resistentes, *B. thuringiensis* no debería fácilmente promover resistencia debido a su baja persistencia en el medio ambiente. También debido a que esta bacteria produce algunas toxinas, dos hemolisinas, una metaloproteasa, y dos diferentes inhibidores del sistema inmune de los insectos (Dalhamner y Steiner, 1984) además de tener una resistencia pasiva alta al sistema inmune del hospedero, el desarrollo en un insecto individual de mutantes resistentes simultáneos a todos estos agentes letales potenciales es extremadamente improbable.

Hasta la fecha hay dos especies de mosquitos reportadas que desarrollaron resistencia a *B.t.i.*:

1) *Culex quinquefasciatus* incrementó 11 veces su resistencia después de 32 generaciones a una presión selectiva CL_{95} (Georghiou y col. 1983).

2) *Aedes aegypti*, aumentó su resistencia en menos de dos veces después de 14 generaciones a una presión selectiva de CL_{50} (Goldman y col. 1986). El mismo estudio no encontró desarrollo de resistencia en dos cepas relacionadas. Estos autores concluyeron que la resistencia a insecticidas microbianos probablemente involucra cambios genéticos en dos o más loci.

Becker, (1990), describe que entre 1981- 1989, más de 40,000 Ha de criaderos de mosquitos en Alemania Federal fueron tratados con 17,000 l y 17 toneladas de formulados de *B.t.i.*, y resultaron con más del 90% de control, sin reportes de resistencia.

8.- Persistencia.

La persistencia limitada es una desventaja y está calculada para *B.t.* de 1 a 2 días en el campo y de 2 semanas si se aplica forestalmente, debido a que se destruye la toxina por la luz ultravioleta, (Pusztai y col. 1991).

El incrementar el uso combinado de *B.t.* con nuevas formulaciones e ingeniería genética para mejorar persistencia podría inducir resistencia, de tal forma que el incrementar la potencia es considerado más importante que aumentar la persistencia como estrategia de mejora. Una vez liberada la spora y el cristal en el medio acuático, donde generalmente se aplica el insecticida, los cuerpos lentamente se hundirán al fondo, y la tasa a la cual esto ocurre y el grado que permanezcan en el fondo son factores en determinar la persistencia del efecto larvicida. Los datos indican que la tasa de hundimiento depende en parte de la naturaleza de los materiales particulados en el agua (Yousten y col. 1992). Estos mismos

autores, en su trabajo, señalan que *B.t.i.* tuvo una tendencia más alta a adherirse a partículas como arcilla y carbón activado y sedimentar junto con ellas, que las parasporas de *B. sphaericus*, y pretenden que esto pueda explicar, en parte, la mayor persistencia de este último en pruebas de campo.

En el estudio realizado por Leal- Castillo, (1993), con el propósito de determinar la sobrevivencia y actividad tóxica de *B.t.i.* , en condiciones de laboratorio usando agua de río, los resultados indicaron que *B.t.i.* tiene capacidad para sobrevivir hasta por 10 días, conservando parte de su toxicidad.

9.- Ventajas y desventajas del uso de *B. thuringiensis*.

Entre las ventajas más importantes se mencionan las siguientes:

- i) Alta especificidad, por ej. ausencia de efectos tóxicos en organismos no blanco y mamíferos.
- ii) Bajas expectativas a desarrollar resistencia en los insectos observados.
- iii) Adaptables a múltiples tipos de formulaciones, con potencial de incorporarle estimulantes para el apetito, cebos para hacerlos más atractivos en las formulaciones contra insectos.
- iv) Probabilidad de producir más potentes formulaciones y reducir los costos de producción a través de tecnología de fermentación mejorada.

Y como desventajas se cuentan :

- i) Espectro de huésped estrecho.
- ii) Falta de protección de las patentes en las cepas nuevas.
- iii) Requerimiento de un tiempo cabal de aplicación debido a los efectos más lentos que los insecticidas químicos.
- iv) La actividad tóxica depende de la ingestión, y esta está sujeta a las condiciones ambientales.
- v) Costos relativamente más altos comparados con los insecticidas químicos, lo cual lleva a que su distribución y uso esté limitado.
- vi) Baja persistencia en el medio ambiente

(Tomado de Rowe y Margaritis, 1987 y Galán-Wong, 1993).

10.- Productos comerciales a base de *B.t.i.* y compañías productoras.

Actualmente se encuentran en el mercado mundial diversos productos comerciales, en sus diferentes presentaciones como polvos humectables, concentrados líquidos, formas granulares, briquetas y formas encapsuladas, (Berry y col. 1991, Mulla, 1990, Yap, 1990, citados por Porter y col. 1993). Algunos de ellos se muestran en la siguiente tabla No. 2.

Tabla 2.- Productos comerciales a base de *B.t.i.* disponibles en el mercado.

PRODUCTO	COMPAÑIA PRODUCTORA
BACTIMOS	DUPHAR
ABG	ABBOTT
VECTOBAC	ABBOTT
TEKNAR	SANDOZ
BACTI SAND	SUMMIT CHEM
MOSQUITO DUNKS	SUMMIT CHEM
BACTIMOS BRIQUETAS	SUMMIT CHEM
BACTIMOS PELLETS	SUMMIT CHEM
SKEETAL	NOVO
BACTIS	C. DI RICERCA CHIM
MOSQUITOCID	RADONJA

(Tomado de Galán- Wong, 1993 con algunas modificaciones).

II. BIOTECNOLOGIA DE *B. thuringiensis var. israelensis*.

En los últimos años ha sido extenso el trabajo relativo a la optimización de la producción del bioinsecticida, también como reducción de los costos y nuevas formulaciones mejoradas, así como considerable investigación en ingeniería genética.

1.- Medios de producción.

La producción de bioinsecticidas requiere del diseño de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento, esporulación y formación de la δ -endotoxina. Obviamente se tendrá

que satisfacer el suministro de una fuente de Carbono adecuada, una fuente de Nitrógeno y requerimientos minerales.

Cuando se descubrió la primera cepa de *B.t.i.*, ya existían multitud de reportes de medios de fermentación para las variedades conocidas de *B.t.*, señalaremos primero los trabajos que se han hecho específicamente con la variedad *israelensis* H-14. Así tenemos que en el reporte de la OMS, (1979), se refiere a la preparación del estándar de referencia IPS- 78, en un medio compuesto por los siguientes ingredientes, (en g/l) : Harina de trigo 15, glucosa 10, peptona 5, extracto de levadura 5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 3, FeSO_4 0.1.

Por otra parte Smith, (1982), cultivó tres cepas de *B.t.i.* en seis medios de fermentación, en casi todos usó glucosa como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno, diversos productos como harina de soya, harina de maíz, extracto de levadura, caldo nutritivo, casaminoácidos y proflo, adicionados todos con sales minerales como KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , CaCl_2 , K_2HPO_4 , CaCO_3 , FeSO_4 y ZnSO_4 , citrato de sodio, fosfato de sodio y amonio, . Las cuentas de esporas/ ml obtenidas variaron en el rango de 1×10^4 a 8.9×10^8 , y los medios que mostraron las cifras mayores, así como también mayor toxicidad, fueron los que contenían casaminoácidos, después los constituidos por proflo y extracto de levadura ; sin encontrar diferencia en toxicidad en los medios con reguladores que sin reguladores de fosfatos; sin embargo, concluyó que es necesario hacer bioensayos para evaluar un producto y evitar hacer solamente cuentas de esporas.

La OMS, como parte de uno de sus programas en países tropicales, auspició el delineamiento de las bases para la producción local de *B.t.i.* en países en desarrollo; de acuerdo con esto, Vandekar y Dulmage, (1983), junto con otros investigadores prepararon un documento, donde señalaron los procedimientos para el cultivo, producción, recuperación, control de calidad y bioensayos de bioinsecticidas a base de *B.t.i.* Entre los ejemplos de materiales potenciales baratos disponibles en diversos países, para la producción de *B.t.i.* contamos el agua de coco, suero de leche, melazas, líquido de remojo

de maíz, entre los líquidos, y también semillas de leguminosas secas y molidas, como chícharo, cacahuate, haba, soya, frijol, garbanzo, otros materiales, como maíz, papa y levadura seca, levadura húmeda, y materiales de origen animal como harina de pescado y harina de sangre. Recomiendan también usar las fuentes de carbono y nitrógeno balanceadas, de tal forma que el pH de la fermentación se mantenga en niveles no muy extremos. También resaltan las propiedades nutritivas del líquido de remojo de maíz, como un importante aditivo a estos medios. En cuanto a los minerales mencionan cinco iones particularmente importantes en el crecimiento y esporulación de *Bacillus*: Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} , de tal forma que aunque estén normalmente presentes en las fuentes de carbono y nitrógeno usadas, es conveniente agregar a los medios en las cantidades siguientes, en g/l : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 y $CaCO_3$ 1.0.

Posteriormente, Pearson y Ward, (1988), en sus estudios de fermentación con *B.t.i.* evaluaron distintos medios tanto para la obtención del inóculo, como para la producción. Usaron un sistema de dos pasos para la preparación del inóculo, en el primero de los cuales un medio compuesto por agua triptonada y sales y para el segundo el medio empleado contenía , en g/l : extracto de levadura 2.5, líquido de remojo de maíz 5, y melazas, 5; exhibiendo este último densidades celulares superiores a 31×10^7 /ml. Para la producción usaron cinco medios ya previamente descritos por Drake y Smith, (1963), Megna, (1963), Dulmage, (1971) y CRC (1978), con estos medios obtuvieron cuentas viables dentro del rango de $0.3 - 2.5 \times 10^9$ / ml, con 90 % de lisis celular. Cabe hacer notar que todos estos medios contenían un exceso significativo de carbohidrato: proteína. Para el proceso de selección hicieron variaciones de los medios de producción anteriores y determinaron que el medio P3 (a) de Dulmage, (1971), en g/l, compuesto de harina de soya 15, melazas 10, almidón 10 y $CaCO_3$ 1.0, les dió el mejor rendimiento y actividad, con una población de 3×10^9 células viables / ml y más del 90 % de lisis celular en una fermentación de 48 horas, alcanzando una actividad insecticida de $11.5 - 13.0 \times 10^4$ UTI / ml, a nivel de matraz, posteriormente, al escalar el proceso a nivel de planta piloto obtuvieron 6.5×10^9 células viables / ml con más del 95% de esporulación. Concluyeron

señalando que los medios ricos en contenido de proteína inhibieron la esporulación y los medios convenientes para esporulación y formación de bioinsecticida contenían tasas altas de carbohidrato a proteína, y en general existió buena correlación entre las cuentas de esporas y la actividad insecticida.

Sikdar y col. (1991), en su trabajo realizado para determinar los requerimientos minerales de *B.t.i.* en la producción de la δ - endotoxina , probaron un rango de concentraciones desde 0 - 1.5 g/l; las óptimas encontradas fueron de 1 para K_2HPO_4 , 0.3 para $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, y 1.0 para $CaCO_3$, estas dos últimas sustancias, en concordancia con Vandekar y Dulmage, (1983). También encontraron que el $CaCl_2$ dió el mismo rendimiento de toxina que el $CaCO_3$, solo que hay ventaja al utilizar este último, por que puede usarse como fuente de calcio y como agente neutralizante, sin encontrar relación directa entre el crecimiento celular y la producción de δ - endotoxina.

Abdel-Hameed y col., (1991), en su estudio sobre la caracterización de las condiciones de fermentación para la producción de δ - endotoxina de *B.t.i.*, con cepas aisladas en Egipto, usaron seis medios de fermentación combinando tres ingredientes principales: melaza, harina de soya y Proflo, en un rango de concentraciones de 2-5% las dos últimas y la primera de 0 - 2%. Aunque las seis combinaciones de medios dieron buen crecimiento y esporulación, la combinación 1, compuesta por 1% de melaza y 3% de harina de soya, dió el mejor rendimiento de toxina; concluyeron que la producción de toxina fue más afectada por la concentración de melazas que por la concentración de harina de soya en los rangos probados, ya que el medio sin melazas dió un rendimiento de 55% de aquel obtenido con 1% de melaza.

Además de los reportes anteriores de medios de producción para *B.t.i.* existe una extensa información sobre medios de fermentación para *B.t.* en general, que también pueden utilizarse para *B.t.i.*, tales como los siguientes :

En 1970, Dulmage reportó el aislamiento de la cepa HD-1 de *B.t. var kurstaki*, la cual produjo en fermentación altos niveles de δ - endotoxina, en un medio que contenía, en g/l: dextrosa 5.0, extracto de levadura 2.0, K_2HPO_4 1.0, KH_2PO_4 1.0 y recomienda el uso de sustratos baratos como harina de semilla de algodón (Proflo) y harina de soya.

Posteriormente, en 1971, Dulmage cultivó 16 cepas de *B.t. var. alesti* y dos cepas de var. *kurstaki* en tres diferentes medios de fermentación, usando sales minerales y con distintas fuentes de carbono y nitrógeno tales como triptona, proflo, harina de soya, almidón de maíz, extracto de levadura y bactopectona. Demostró que la cantidad de δ -endotoxina producida por las diferentes cepas varía ampliamente en función, tanto del medio de fermentación, como de la cepa usada y señaló también que la actividad de la δ - endotoxina no estaba relacionada con las cuentas de esporas o nivel de crecimiento.

En tanto, Dulmage y De Barjac, (1973), trabajaron con el aislado HD-187, serotipo 5a 5b, el cual produjo rendimientos altos de δ - endotoxina, en tres medios de fermentación; B-4, que contenía harina de semilla de algodón al 1%, B-4b al 2% y B-8 al 2% adicionado con líquido de remojo de maíz al 1%, aparte de llevar todos por igual peptona 0.2%, glucosa 1.5%, extracto de levadura 0.2% y sales minerales. El producto presentó una potencia de alrededor de 200×10^3 UI/mg.

Scherrer y col., (1973), investigaron el efecto de la concentración de glucosa y la aereación, en un medio que contenía dicho carbohidrato, extracto de levadura y sales y encontraron que la concentración de glucosa afectó la longitud del cristal, sin encontrar variación en el grado de toxicidad.

Goldberg y colaboradores, (1980), describieron un medio de fermentación para la producción del complejo espora δ - endotoxina, a escala piloto, en un medio compuesto en g/l, de glucosa 30, peptona de soya 20, extracto de levadura 4.5, líquido de remojo de maíz 5.0 ml, KCl, 3.0, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0, H_2PO_4 7 ml, $MgSO_4$ 2.0, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 36 mg, $FeSO_4$. 7

H₂O 13.5 mg, CuSO₄ · 5 H₂O 7.5 mg, ZnSO₄ · 7 H₂O 7.5 mg, MnSO₄ · 4 H₂O, 40 mg. Con él obtuvieron 4 X 10⁹ UFC / ml en 60 horas de operación aproximadamente.

Lüthy y Ebersold (1981), emplearon un medio complejo con la siguiente composición en g/l : harina de soya 35, almidón de maíz, 12, extracto de malta 2.0, K₂HPO₄ · 2H₂O 1.3, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, CaCl₂ · 2 H₂O 0.08, MnSO₄ · 7 H₂O 0.08 y en menos de 48 horas de fermentación obtuvieron una total esporulación.

En el trabajo realizado por Salama y col. (1983), evaluaron una variedad de subproductos agroindustriales como ingredientes del medio de fermentación para *B.t.* var. *entomocidus* y var. *kurstaki* HD-1; emplearon harina de semilla de algodón, harina de pescado, forraje de levadura, sangre seca de res, residuos secos de rastros de pollos; también probaron semillas de leguminosas secas y molidas tales como soya, haba, chícharo, garbanzo, cacahuate y lenteja, todos estos productos incorporados a una concentración de 2 % P/V cada uno, en un medio base compuesto de MgSO₄ · 7H₂O 0.03 %, MnSO₄ · H₂O 0.003 %, FeSO₄ y ZnSO₄ al 0.002 % c/u. El mejor crecimiento obtenido fue en el medio base + 2 % de harina de semilla de algodón, aunque también en los medios que contenían mezclas de subproductos, como forraje de levadura, sangre seca de res y residuos de rastros de pollos dió rendimientos comparables al de harina de semilla de algodón. En lo referente a medios con semillas de leguminosas, los menos eficientes resultaron ser los de soya.

Dharmsthini y col. (1985) diseñaron dos medios de cultivo con un subproducto hidrolizado de una factoría de glutamato monosódico al 4 y 7 % suplementado con K₂ HPO₄ al 0.05 % para comparar la esporulación y toxicidad de *B.t.* y *B. sphaericus*, contra larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*; obtuvieron una buena esporulación y toxicidad y sugirieron la utilización de un medio de cultivo fácil de preparar y sin requerir pretratamiento de ninguno de sus constituyentes.

Así, encontramos que la melaza es el común denominador de casi todos los medios reportados, tanto para *B.f.* en general como para *B.t.i.* En cuanto a la concentración necesaria, Pearson y Ward, (1988) y Hameed y col. (1991) mencionan que el 1% es adecuado, quizá así sea, por nuestra parte vamos a usar 1 y 2 %; en relación a las fuentes de nitrógeno empleadas, la harina de soya resulta una de las más convenientes, y forma parte de muchos de los medios reportados, junto con el líquido de remojo de maíz, por lo tanto estas sustancias serán de primera elección en cualquier diseño de medios de cultivo, también podría usarse esta última sustancia como un complemento a las fuentes de nitrógeno baratas y disponibles en la región. Un punto a tomar en cuenta es la tasa Carbono:Nitrógeno, ya que en medios convenientes para esporulación y formación de toxina debe haber un exceso significativo de carbohidrato a proteína, y lo contrario, exceso de proteína a carbohidrato, en medios convenientes para inóculo.

2.- Condiciones de fermentación.

a) Inóculo.

Vandekar y Dulmage (1983), propusieron un procedimiento estándar para estudios de fermentación en matraces agitados, que consiste en un inóculo de dos pasos que se prepara en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de caldo- triptosa- fosfato, se incuba en agitación a 340 r.p.m. y a una temperatura de 30 ± 1 ° C durante 12 horas. Después se toma un volumen de 2 % para inocular un matraz similar, incubar bajo las mismas condiciones y finalmente tomar un 2 % de volumen de inóculo para las series de fermentaciones ; mientras que Pearson y Ward,(1988), también emplearon un inóculo de dos pasos, en un medio alto en contenido de proteína , con células vegetativas de 24 horas de edad, propagado a 30°C de temperatura y una agitación de 150 r.p.m., de este tomaron un 5 % v/v para las series de fermentación. Posteriormente, Abdel-Hameed y col., (1991) usaron un inóculo de tres pasos, cultivado en caldo TYG (triptona, extracto de

levadura y glucosa) con células de seis horas de edad en cada paso, incubados a temperatura de 28°C y agitación de 180 r.p.m.; después usaron un 2 % de este inóculo en TYG para sembrar en el medio de producción, el cual incubaron por 15 horas a las mismas condiciones anteriores.

b) Temperatura y pH.

Los rangos de temperatura para crecimiento de *B.f.* están en los límites de 20-42°C, pero el crecimiento cercano a esta última cifra generalmente resulta en pérdida de la producción de δ^+ endotoxina, (Insell, 1983). La producción óptima de endotoxina ocurre a 28-32°C, siendo la temperatura normal de fermentación de 30°C. Vandekar y Dulmage (1983), señalan que la temperatura debe estar en un rango de 28-30°C, mientras que Pearson y Ward, (1988) emplearon exactamente 30°C en todos sus experimentos. Más adelante Hameed y col. (1991) probaron un rango de temperatura de 28-33°C y vieron el efecto sobre la producción de toxina; encontraron que ésta se afectó grandemente, ya que disminuyó a un 90 y 45%, comparado con el rendimiento a 30°C cuando las temperaturas de incubación se mantuvieron a 28 y 33°C respectivamente.

En lo referente a pH, el crecimiento de esta bacteria ocurre entre 5.6 a 8.5, generalmente el pH inicial usual es de 6.8 a 7.2, disminuye típicamente a 5.8 cuando se libera el acetato, sin embargo, se eleva a 7.5-8.0 cuando se consume este último, (Dulmage 1981). Abdel-Hameed y col. (1991) determinaron también el efecto del pH en la producción de toxina de *B.f.i.*, en un rango de 6.5 - 8.0 y encontraron que la producción no fué afectada por cambios en el rango de 6.5 - 7.5, pero cuando se incrementó a 8.0 el rendimiento fue de un 50% menos que a pH de 7; cuando no usaron ningún control de pH el rendimiento fue de un 80% del óptimo.

c) Agitación y Aereación.

Para el crecimiento se requiere el oxígeno, (Jarai 1972). La demanda de oxígeno de un proceso de fermentación se satisface normalmente mediante aireación y agitación del caldo de fermentación, (Karow y col. 1953, Linek y col. 1988); sin embargo, la productividad de la mayoría de las fermentaciones está limitada por la disponibilidad de oxígeno. Algunos autores han mencionado que son esenciales velocidades de aireación altas para la formación de espora y toxina, (Dulmage, 1981, Lüthy y col. 1982, Zamola y col. 1981). En experimentos con matraces, Vandekar y Dulmage (1983) recomiendan una agitación de 340 r.p.m., mientras que Pearson y Ward (1988), emplearon solo 150 r.p.m. y obtuvieron buena esporulación y producción de α -endotoxina de *B.t.i*. En su trabajo también con esta variedad, Abdel-Hameed y col. (1991) emplearon varios niveles de agitación, en sus estudios realizados con fermentador de 8 l de volumen de trabajo; concluyeron que la óptima fue de 200 r.p.m., ya que tasas de agitación mayores causaron un decremento gradual en el rendimiento de toxina, mismo efecto logrado con tasas de agitación menores a la óptima.

En relación a pH y temperatura, es generalizado entre los investigadores, usar pH de 7.0 y temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y terminar con un pH no mayor de 8.0, niveles que estamos de acuerdo. Lo diferente sería la cantidad de aereación empleada, ya que unos recomiendan niveles altos, como Vandekar y Dulmage (1983), de 340 r.p.m., mientras que otros, como Pearson y Ward, (1988) usaron 150, el otro nivel empleado fue de 200 por Abdel-Hameed y col (1991), así que creemos que este último valor es apropiado para nuestros experimentos.

3.-Recuperación del bioinsecticida.

Para la obtención del complejo estable y seco un método clásico fue la liofilización, pero se tenían las desventajas de pérdidas significativas de esporas y cristales, así como un aglomeramiento del complejo, además de resultar un volumen considerable de líquido

involucrado, con la consecuencia de resultar más costoso, (Vandekar y Dulmage 1983). Después se pensó en la utilización de acetona como agente precipitante de proteínas, pero el producto se apelmazaba y era difícil de resuspender, por lo que se modificó el proceso utilizándose lactosa, que precipitaba junto con el complejo espora-cristal, logrando una preparación seca y estable y sin dificultad para resuspender en agua, (Dulmage y col. 1970). Este proceso se utiliza para recuperar pequeñas cantidades del complejo insecticida, ya que para cantidades mayores se usa el proceso de secado por aspersion "Spray-drying", (Vandekar y Dulmage 1983).

Otro proceso empleado por Balaraman y Hoti (1988) fue mediante sedimentación del complejo con sulfato de aluminio y potasio a la proporción de 10 g/l seguida de decantación y "freeze-drying".

4.- Bioensayos y Estandarización.

Antes de los 70's, los productos de *B.t.* activos contra lepidópteros eran estandarizados sobre las bases de cuentas de esporas y su potencia medida en términos de DL_{50} , la dosis que mata el 50 % de las larvas de prueba de una especie de insecto dado, pero debido a la baja correlación entre las cuentas de esporas y la DL_{50} , eso no funcionaba. Fue hasta 1971, en el cual un sistema más confiable llegó a ser generalmente aceptado por las compañías productoras de las formulaciones de *B.t.* y el artículo de Dulmage y col. (1971) legitimizó un ensayo de actividad basado en la Unidad Internacional (IU) en la que además comparaba contra una preparación estándar primaria, las preparaciones obtenidas. Ya que *B.t.* actúa primariamente como un veneno estomacal, el bioensayo involucra incorporar varios niveles o concentraciones de la preparación que va a ser probada en la dieta de las larvas de insectos. Los datos así obtenidos son usados para determinar la DL_{50} de la muestra de prueba. Debido a que la DL_{50} puede variar de día a día, dependiendo del vigor de la colonia de insectos o cambios en su medio ambiente, la DL_{50} de la muestra de prueba es comparada con aquella de un polvo estándar, ensayada en paralelo y con la misma población de insectos. Debido a que el estándar tiene una potencia asignada en

unidades internacionales por miligramo, la potencia de la muestra de prueba puede ser expresada, mediante la ecuación siguiente :

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

DL₅₀= Dosis letal media

UI = Unidades Internacionales

mg = miligramo

En base a lo anterior, en 1978, el Instituto Pasteur, en colaboración con la OMS, elaboraron un estándar, el IPS-78, asignándole una potencia de 1,000 UI/mg contra *Aedes aegypti*, (Vandekar y Dulmage, 1983). Posteriormente, en 1979, De Barjac y Larget-Thierry, propusieron el sistema de bioensayo para la evaluación de las formulaciones derivadas de *B.t.i* H-14. Más adelante, en 1982, elaboraron otro estándar, que sustituía al anterior, llamado IPS-82, el cual posee una potencia de 15,000 Unidades Tóxicas Internacionales por mg, (UTI/mg) contra *Aedes aegypti* cepa Bora Bora, basado en el IPS-78 y al mismo tiempo dieron a conocer el método de bioensayo, que consiste en pesar 50 mg del polvo estándar y homogenizarlo con perlas de vidrio en 10 ml de agua desionizada, de este homogenado, se hace una solución stock adicionando 0.1 ml del homogenado a 9.9 ml de agua desionizada, entonces esta solución stock contendrá 50 mg/l y de allí se hacen diluciones subsecuentes, directamente preparadas en vasos plásticos, previamente llenados con 148 ml de agua desionizada. A cada vaso se colocan 25 larvas de 4o. estadio de *Aedes aegypti* en 2 ml de agua por medio de una pipeta Pasteur. Después con micropipeta se añaden 120, 90, 60, 30, 24 y 15 ml de solución stock para obtener concentraciones finales de 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008 y 0.005 mg/l respectivamente, de IPS-82. Se usan 2 ó 4 vasos para cada concentración y para el control, el cual contiene 150 ml de agua desionizada solamente, (De Barjac 1982).

Algunas de las recomendaciones para la realización de este bioensayo son las siguientes :

- 1) Cada serie de bioensayo deberá preferiblemente involucrar al menos 400 larvas para el estándar IPS-82 y 100 para el control, en tanto que para las preparaciones de actividad desconocida se deberán usar 500 - 1000 larvas de 4o. estadio temprano.
- 2) Las pruebas deberán ser conducidas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 3) La mortalidad se determina a 24 y 48 horas basada primariamente en el conteo de larvas vivas.
- 4) Cuando la mortalidad del control excede el 5% deberán ser corregidas las mortalidades de los grupos tratados de acuerdo a la fórmula de Abbott.
- 5) Las pruebas cuya mortalidad del control sea mayor del 10 % deberán ser descartadas.

5.- Genética.

La investigación reciente se ha enfocado sobre tres áreas generales: localización de genes codificando para la estructura proteica de la δ - endotoxina, la secuencia de bases de este gene y los mecanismos que controlan la expresión del gene del cristal de proteína.

Numerosos reportes han especificado que el gene estructural del cristal en las variedades *thuringiensis*, *kurstaki* e *israelensis* han sido localizados en un plásmido, (Whiteley y col. 1982; González y Carlton, 1984; Ward y col. 1984), estos últimos autores clonaron y expresaron el gene de *B.t.i.* en *E. coli*. Un solo reporte, Held y col. (1982), localizó el gene del cristal en el cromosoma de var. *kurstaki*, aunque los mismos autores señalaron que genes idénticos o similares estuvieron también presentes en un plásmido.

Thorne y col., (1986), clonaron el gene *Cry IV C*, que codifica para el polipéptido tóxico a mosquitos de 72 Kda de *B.t.i*. A este gene se le denominó previamente como ORF1, y es adyacente a un segundo ORF, ORF 2; ambas secuencias de aminoácidos deducidas de estos dos genes contiguos presentan significativa similaridad a las δ - endotoxinas de 130 kDa. También otros dos genes de *B.t.i*. (*cry IV A* y *cry IV B*) que codifican para los polipéptidos de 134 y 128 kDa, respectivamente, activos contra larvas de *Aedes aegypti*, fueron clonados y sus secuencias de nucleótidos fueron determinadas, (Chungjatupornchai y col. 1988; Sen y col. 1988; Tungpradubkhul y col. 1988; Ward y Ellar 1987). La comparación de estas secuencias indicó que las dos toxinas son muy similares en las regiones carboxi- terminal, (Sen y col. 1988; Ward y Ellar 1988) y además se encontró 42 % de identidad entre el dominio carboxi terminal de estas proteínas y las regiones equivalentes de las δ - endotoxinas específicas de Lepidópteros, (Chungjatupornchai y col. 1988, Ward y Ellar 1988).

Sin embargo, las mitades aminoterminal de estas proteínas son menos similares. Las similaridades son localizadas en cinco regiones conservadas, como se estableció por Sanchís y col. (1989) y precisamente reside allí el dominio tóxico de los cuatro genes *cry IV, A, B, C* y *D*, mientras que la mitad carboxi- terminal, más altamente conservada de cada protoxina no es requerida para toxicidad o rango de hospedero, (Chungjatupornghai y col., 1988; Délecluse y col. 1988; Pao- Intara y col. 1988; Thorne y col. 1986), esto es, es probable que las secuencias de aminoácidos carboxi- terminal sean requeridas para alguna otra función tal como la formación de inclusiones cristalinas. La toxina *Cry IV D* tiene homología extensiva con las otras clases de toxinas para mosquitos, incluyendo *Cry II*, solamente dentro de una región (# 1) (Porter y col. 1993).

El gene *cyt A* codifica el polipéptido de 27 kDa contenido en el cristal parasporal de *B.t.i*. El producto del gene clonado no despliega una actividad tóxica específica para mosquitos pero si propiedades citolíticas, las cuales podrían actuar sinérgicamente con otros componentes del cristal y mejorar su toxicidad hacia larvas de dípteros, (Bourgouin y col. 1986; Ward y col. 1984). La secuencia de nucleótidos de este gene *cyt A* fue determinada, (Waalwijk y col. 1985; Ward y Ellar 1986) y la secuencia de aminoácidos deducida no muestra ninguna similaridad

significativa a aquellas de los otros tipos de δ -endotoxinas, (Lereclus y col. 1989).

Las principales limitaciones de cepas naturales de *B.t.i.* así como de *B. sphaericus*, los costos altos de fermentación, la falta de persistencia debido a una rápida sedimentación del complejo spora-cristal y el rango de hospedero estrecho comparado a los insecticidas químicos, han desestimulado su desarrollo, por lo que parte de estos problemas podrían resolverse mediante ingeniería genética de cepas expresando combinaciones de toxinas existentes y nuevas. Algunos de los trabajos más relevantes a este respecto son los siguientes :

Los genes *Cry IV A*, *Cry IV B*, *Cry IV C*, *Cry IV D* y *Cyt A* de *B.t.i.* han sido individualmente expresados en *E. coli*. Los rendimientos altamente variables de proteína obtenidos fueron probablemente debidos a diferentes cepas hospederas, estabildades de polipéptidos disímiles, rango del promotor y sitios de unión a ribosomas, (Angsuthanasombat y col. 1987, 1992; Chungjatupornchai y col. 1988; Délecluse y col. 1988; Thorne y col. 1986; Waalwijck y col. 1985; Ward y Ellar 1988; Ward y col. 1986).

El gene *Cry IV B* es uno de los pocos genes de *B.t.i.* que han sido bien expresados en *E. coli*, (Chungjatupornchai y col.1988; Ward y Ellar 1988). Esta proteína de 128 Kda se expresó en *E. coli* TG 1 a un nivel suficiente para producir inclusiones, las cuales fueron purificadas y demostraron ser débilmente tóxicas a larvas de *Aedes aegypti*, (Ward y Ellar 1988). Asimismo esta misma toxina de 128 Kda ha sido sobreexpresada en *E. coli* JM 107 y la proteína purificada fue altamente tóxica, con una CL_{50} de 43 ng/ml a larvas de *A. aegypti* de tercer estadio.

Además de *E. coli*, se han usado otras bacterias como hospederas, tales como *B. subtilis*, en la cual se expresaron los genes *Cry IV A*, *Cry IV C* y *Cyt A* de *B.t.i.*; obtuvieron una buena expresión y pudieron observar las características inclusiones, en algunos casos, (Thorne y col. 1986; Ward y Ellar 1988; Ward y col. 1988 y 1986).

El gene del cristal *Cry IV D* de *B.t.i.* también ha sido clonado en *Bacillus megaterium*. Se produjeron cantidades significativas de la proteína de 70 Kda, pero la toxicidad hacia *A. aegypti* de cuarto estadio fue mucho más baja que aquella de *B.t.i.*, (Donovan y col. 1988).

También se ha reportado la expresión de las toxinas de *B.t.i.* en *B. sphaericus*, en un intento de incrementar la actividad larvicida y rango de hospedero del bacilo tóxico a mosquitos, (Bar y col. 1991; Trisrisook y col. 1990).

Las toxinas de 27 Kda (*cyt A*) y de 70 Kda (*cry IV D*), han sido clonadas y expresadas en *B. subtilis* y en *B. sphaericus* 2362. Aunque ocurrió pérdida de plásmidos o inestabilidad en algunos clones transformados de *B. sphaericus*, otros retuvieron toxicidad, la cual fue estable por más de 20 generaciones en la ausencia de selección de antibióticos y permitieron un incremento de 10 veces en la toxicidad hacia *A. aegypti*, comparada con aquella de la cepa padre 2362, pero más baja que la del *B.t.i.* donante. Sin embargo, la expresión de las toxinas de *B.t.i.* fue más alta en *B. subtilis* que en *B. sphaericus*, y las inclusiones cristalinas aparecieron acompañando solo a las esporas de *B. subtilis*, aunque la actividad larvicida y cristales fueron inestables en estos últimos transformantes, (Bar y col. 1991).

Otro reporte de clonación en *B. sphaericus* mostró que la expresión del gene *cry IV B* de 128 Kda de *B.t.i.* en *B. sphaericus* 2362 produjo un incremento de 100 veces en la actividad contra larvas de *A. aegypti*, el cual fue comparable a la toxicidad de *B.t.i.*, (Trisrisook y col. 1990), aunque todavía está por elucidar si fue la toxina de 128 kDa responsable de ese aumento en la actividad o fue un sinergismo con el componente endógeno de *B. sphaericus*.

También se probó la transferencia de genes de la toxina de *B. sphaericus* en *B.t.i.*, tanto en una cepa tóxica como no tóxica, en ambos casos las proteínas de la toxina de *B. sphaericus* fueron producidas a alto nivel durante la esporulación de *B.t.i.* y se acumularon como estructuras cristalinas; sin embargo, los transformantes expresando las toxinas de las dos cepas, no mostraron un mejoramiento significativo de la toxicidad contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex pipiens*, (Bourgouin y col. 1990).

Otro de los enfoques emprendidos recientemente fue el de introducir los genes de la toxina activa contra mosquitos en hospederos diferentes, tales como bacterias del género *Caulobacter* seleccionadas por su ocurrencia en habitats acuáticos predominantemente en regiones cercanas a la superficie del agua, donde las larvas de muchas especies de mosquitos se alimentan, (Merrit y col. 1992), además las especies de *Caulobacter* son capaces de persistir y crecer en medio ambientes bajos en nutrientes; de tal forma que en el trabajo realizado por Thanabalu y col. (1992), insertaron separadamente los genes de la toxina binaria de *B. sphaericus* 2297, de la toxina de 100 Kda de *B. sphaericus* SSII-1, y por último el gene de la toxina de 128 Kda de *B.t.i.*, en el plásmido pRK 248, el cual, posteriormente introdujeron mediante electroporación, en células de *Caulobacter crescentus* CB₁₅. Todos los recombinantes resultantes exhibieron toxicidad hacia larvas de mosquito; el recombinante expresando el gene de la toxina binaria fue letal a *Culex quinquefasciatus*, con una CL₅₀ de cerca de 2×10^5 células/ml, similar a la toxicidad de la cepa natural, mientras que las células de *Caulobacter* que contenían el gene de la toxina de 100 Kda de *B. sphaericus*, o el gene de la toxina de 128 kDa de *B.t.i.* fueron débilmente tóxicas a larvas de *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* respectivamente. Los niveles de proteína no fueron cuantificados, pero se creyeron bajos, así que deba buscarse quizá el uso de promotores más fuertes para incrementar la expresión en *Caulobacter*.

También se ha investigado el uso de Cianobacterias como vehículos para la liberación prolongada de toxinas para mosquitos. Estas bacterias son adaptables a medios ambientes marinos o de agua dulce, tienen amplia tolerancia a la temperatura y son fotoautótrofas, (Rippka y col. 1979).

Los primeros intentos de clonar genes de la toxina de *B. sphaericus* o de *B.t.i.* en cianobacterias fueron exitosos, pero los niveles de expresión y toxicidad fueron muy bajos, (Angsuthanasombat y Panyim 1989; Chungjatupornchai 1990; de Marsac y col. 1987).

El gene de la toxina binaria de *B. sphaericus* fue insertado en un vector conveniente para clonación en ambas *E. coli* y cianobacterias, (Kuhlemeier y col. 1983). Posteriormente efectuaron la transformación de *Anacystis nidulans* R2 también llamada *Synechococcus* spp cepa R2, (de Marsac y col. 1987) pero los extractos proteicos celulares dieron baja mortalidad contra larvas de *Culex pipiens*. Asimismo el gene *cry IV A* de la toxina de 134 kDa de *B.t.i.*, tuvo una baja expresión en células de *Agmenellum cuadruplicatum* PR-6, los extractos celulares fueron mucho menos tóxicos a larvas de *Aedes aegypti* y contenían menos proteína de aprox. 130 kDa que los extractos de *E. coli* transformados con el mismo plásmido, (Angsuthanasombat y Panyim 1989).

Otro de los genes de *B.t.i.*, el que codifica la proteína de 128 kDa (*Cry IV B*), ha sido expresado, siguiendo su integración por recombinación homóloga en el cromosoma de *Synechococcus* sp cepa PCC 6803, (Chungjatupornchai 1990). Solo los extractos celulares, a diferencia de las células vivas, fueron débilmente tóxicos a 20-30% de las larvas de *Aedes aegypti*, equivalentes a 1-2 mg de proteína de la toxina / ml.

Igualmente, el gene *Cry IV D* de *B.t.i.* fue usado para transformar células de *Agmenellum quadruplicatum* PR-6, cuya expresión estuvo bajo el control transcripcional del fuerte promotor de ficocianina (*cpc B*). Las células fueron reportadas como tóxicas a larvas de mosquito, y aunque el gene fue suficientemente bien expresado para formar inclusiones, la toxicidad de las células totales hacia larvas de *C. pipiens* quedó sin cuantificar, solo se observó mortalidad al cabo de 5.5 días después de la ingestión, (Murphy y Stephens 1992).

La diversidad de bacterias y otros organismos los cuales han sido transformados con plásmidos que codifican genes de la toxina expresables, como lo acabamos de mencionar en los párrafos anteriores, ha levantado la interrogante de cuales tipos de microorganismos recombinantes son los más convenientes para liberación de toxinas, o combinaciones de éstas, en las zonas de alimentación larval, (Pantuwatana y col. 1991), por lo que Porter y col. (1993) hacen una evaluación de seis tipos de bacterias, en términos de características deseables, las cuales, conjuntadas, podrían producir una cepa recombinante superior a *B.t.i.* y/o *B. sphaericus*. Estas características, para los seis microorganismos evaluados, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.- Evaluación y la comparación de seis cepas bacterianas potenciales para la expresión de proteínas tóxicas a mosquitos.

CARACTERISTICA	CONVENIENCIA DE CEPAS					
	<i>E.c.</i>	<i>B.t.i.</i>	<i>B.sph</i>	<i>B.s.</i>	Ca	Cy
Buena capac. para expresar prot. extranjeras.	SI	SI?	SI?	SI	?	?
Mapas genéticos buenos y mutantes disponibles.	SI	NO	NO	SI	NO	NO
Plásmidos estructurales segregacionalmente estables	SI	?	?	SI	SI	NO
Persisten en la zona de alimentación larval	?	NO	NO	NO	SI	SI
Fuente de alimento conocida para las larvas	SI?	SI	SI	SI	SI	SI
Sobrevivencia en diversos medio ambientes	?	NO	SI	SI	SI	SI
Experiencia en producción	SI	SI	SI	SI	NO	NO
Formulación	NO	SI	SI	NO	NO	NO
Toxicidad a mamíferos	SI	NO	NO	NO	?	?

Tomado de Porter y col., (1993).

E.c.= *E. coli*; *B.t.i.*= *B. thuringiensis* var. *israelensis*; *B.sph.*= *Bacillus sphaericus*; *B.s.*= *B. subtilis*; Ca= *Caulobacter* spp; Cy= Cyanobacterias

1.- Obtención de las cepas bacterianas.

Se utilizaron un total de siete cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotipo H-14 depositadas en la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Tabla 4.- Cepas de *B.t.i.* utilizadas.

CLAVE ^a	ORIGEN
001	ISRAEL
007	ISRAEL
196	MEXICO
197	MEXICO
210	MALASIA
223	MALASIA
225	KENYA

a = Clave de Colección de *B.t.i.* (De Barjac y col. 1992)

2.-Activación y conservación de las cepas.

Las esporas bacterianas conservadas mediante liofilización sobre papel filtro, fueron activadas en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 de Caldo nutritivo (Difco) se depositó una tirilla y se dejó incubar a temperatura de 28 a 30°C y con agitación, por 48 horas, al cabo de este tiempo se observaron microscópicamente, para comprobar la pureza del

cultivo, después se dejaron incubando 24 horas más para observación de esporas y cristales libres. Posteriormente se resembraron en cajas con agar nutritivo para checar su morfología macroscópica y se pasó a tubos con agar nutritivo inclinado, para su mantenimiento, así como también se liofilizó en papel filtro, para su conservación a largo plazo.

3.-Diseño de medios de cultivo.

En un reporte, resultado de una reunión de la O. M. S. celebrada en Ginebra, Suiza, donde se delinearon las bases para la producción de *B.t.i.* en países en desarrollo, Vandekar y Dulmage, (1983), señalaron algunos ejemplos de medios potenciales baratos, disponibles para la producción de la δ - endotoxina de *B.t.i.*, que fueron : agua de coco, suero de leche, melazas, líquido de remojo de maíz, entre los líquidos, y harina de leguminosas, como chícharo, garbanzo, soya, haba; cereales como maíz, tubérculos como papa, desechos de bebidas como levadura seca y materias de origen animal como harina de pescado y harina de sangre entre los sólidos. De acuerdo con lo anterior, procedimos a la búsqueda de materias primas y subproductos agroindustriales disponibles en la región, que tuvieran como características deseables un contenido de proteína y un costo bajo, por lo que recopilamos una lista de 18 materias primas y subproductos utilizados en nutrición animal, se investigó su costo/Kg, contenido de proteína y disponibilidad. De esta lista se eligieron cinco materias que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.- Análisis bromatológico** de materias primas y subproductos utilizados en el diseño de medios de cultivo para *B.t.i.*

Materia prima	Costo*/Kg	E.L.N. ^a	Proteína	F. cruda	Ceniza
Gluten de maíz 40	1.80	34.29	57.18	1.79	3.9
Harina de pescado	1.50	2.15	73.02	1.50	13.63
Harinolina	0.720	32.7	43.5	8.2	6.5
Pasta de soya(Purina)	0.70	40.13	46.89	5.17	7.58
Pasta en polvo(Gamesa)	0.40	85.68	11.55	1.52	0.49

^a Extracto libre de nitrógeno.

* Cotización a 1992, en nuevos pesos.

** Realizado en el Laboratorio Ciencia de los Alimentos,F.C.B., UANL, las cifras se dan en porcentajes.

Además de estas materias y subproductos, uno de los azúcares disponibles y de uso frecuente en fermentaciones es la melaza de caña, un subproducto de la fabricación del azúcar, que resulta una de las más económicas fuentes de carbono, por lo que la incluiremos en todos los medios. Además, otra de las sustancias tradicionalmente empleadas como fuente de Nitrógeno es el líquido de remojo del maíz, que ha formado parte de medios de cultivo, en trabajos reportados con anterioridad, Murga, (1983), Galán-Wong, (1993), Dulmage y De Barjac, (1973), Couch y Ross(1980), Goldberg y col. (1980). Aparte de este subproducto, hay otras opciones que resultan un poco más caras, como el extracto de levadura, usado por Smith, (1983), Pearson y Ward, (1988); Casaminoácidos, también usados por Smith, (1983), y en un reporte de la OMS, (1979); así como harina de leguminosas como haba, chícharo, garbanzo, lenteja, en el trabajo realizado por Salama y col. (1983). Por su disponibilidad y precio, el líquido de remojo del maíz fué la mejor opción.

Por último, existen algunas sales minerales consideradas particularmente importantes en el crecimiento y esporulación de *Bacillus*, según Vandekar y Dulmage, (1983), y Sikdar y col. (1991), por lo tanto, formarán parte también en nuestros medios. Entonces, conjuntados cada uno de los ingredientes necesarios, nuestros medios de producción del complejo insecticida de *B.t.i.* quedaron como se muestra en la siguiente Tabla No.6

Tabla 6.-Composición de los medios de cultivo utilizados, para la producción de la δ -endotoxina de *B.t.i.*

Ingredientes	Medios de cultivo, en g/l				
	MHL	MPS	MHP	MPG	MGM
Melaza	20	20	20	20	20
Líqu. de remojo de maíz	10	10	10	10	10
Harinolina	20	-	-	-	-
Pasta de soya(Purina)	-	20	-	-	-
Har. de pescado(Purina)	-	-	10	-	-
Pasta en polvo(Gamesa)	-	-	-	70	-
Gluten de maíz 40(Alm.Mex)	-	-	-	-	20
MgSO ₄	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
MnSO ₄	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
ZnSO ₄	"	"	"	"	"
FeSO ₄	"	"	"	"	"
CaCO ₃	1	1	1	1	1
.....pH = 6.8 - 7.0.....					

MHL= Con harinolina como ingrediente variante, MPS= con pasta de soya, MHP= Con harina de pescado, MPG= Con pasta en polvo, MGM= con gluten de maíz.

Además de estos cinco medios, uno empleado comúnmente en fermentaciones de otras variedades de *B.f.* en el laboratorio, es el siguiente, en g/l: Melaza, 20, harina de soya 20, L.R.M., 10, CaCO₃ 1, PH = 7.0 y también fue empleado en nuestras fermentaciones con el nombre clave MN.

4.- Preparación de cultivos para bioensayos preliminares.

Se prepararon los seis medios de cultivo previamente diseñados, que contenían las diversas materias primas y subproductos agroindustriales, se colocaron en cantidades de 10 ml c/u dentro de matraces Erlenmeyer de 25 ml, se esterilizaron y posteriormente se inocularon con cada una de las siete cepas bacterianas, se incubaron a 30° C y con agitación rotatoria a 200 rpm durante 72 horas, realizándose observaciones microscópicas diarias con el propósito de verificar esporulación y formación de cristales y lisis celular, como paso siguiente, se congelaron dichos cultivos hasta la realización de bioensayos para determinación de toxicidad, (De Barjac, 1990, Comunic. verbal). Así, las siete cepas bacterianas cultivadas en los seis medios conformaron un total de 42 combinaciones.

5.- Bioensayos preliminares con cultivo total.

Cada uno de los cultivos se descongeló y se sometió a bioensayos preliminares contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío o 4o. temprano, según la metodología de De Barjac, y col. (1990, Comunic. verbal.) Los pasos a seguir fueron los siguientes:

a) En vasos de plástico, se colocaron 25 larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano de *Aedes aegypti*.

b) Se llenaron con 148 ml de agua destilada, para completar 150 ml de volumen de agua.

- c) De acuerdo al rango de diluciones que se desea probar, es la cantidad de vasos que se preparan. Así en nuestro caso, se probaron cuatro diluciones del cultivo total, en un rango amplio de concentraciones, que fueron 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , cada una con dos repeticiones.
- d) Se prepararon también cuatro vasos con 25 larvas c/u como control (sin toxina).
- e) Se prepararon tres soluciones patrón, a partir del cultivo total, que fueron 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , para tomar de estas las cantidades correspondientes (en ml, o ml), que se iban a agregar a cada vaso para dar la concentración establecida, según una tabla de concentraciones preparada previamente.
- e) Se agregó la cantidad correspondiente de cultivo total, o diluciones de este, conteniendo la toxina, a cada uno de los vasos usando micropipeta o pipeta, según se requiriera.
- f) Después de que se agregaron los microlitros correspondientes se mantuvieron las larvas a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 70 a 80 % de humedad relativa, durante 24 horas, al cabo de las cuales se registró la mortalidad presentada.

6.- Bioensayos para la determinación de la CL_{50} con cultivo total.

Con los resultados de bioensayos preliminares, se seleccionaron aquellos cultivos que presentaron una mortalidad mayor al 10% con la dilución 10^{-6} del cultivo total, por lo cual se descartaron algunos y se continuó con el trabajo de selección, se prepararon nuevamente los cultivos totales seleccionados en el preliminar, y se probaron otra vez en larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío o cuarto temprano, sólo que en este caso, se empleó un rango de concentraciones más estrecho, de 10^{-6} a 10^{-7} y se probaron de 5-7

diluciones, con cinco repeticiones para cada dilución, por lo que fueron 125 larvas/ dilución y 100 como testigo. (De Barjac, 1990, Comunic. Verbal)

7.- Análisis de bioensayos.

Los datos de mortalidad presentada al cabo de 24 horas de exposición, se analizaron mediante el programa Probit y Probit Plot, con el cual se determinaron las concentraciones letales medias correspondientes.

Para determinar la homogeneidad de la población de insectos empleados en los experimentos, y de esta manera verificar la confiabilidad del bioensayo, se usó la prueba de Chi cuadrada (X^2) y valor de la pendiente al nivel del 95% de confiabilidad, por lo que aquellos bioensayos cuyos valores de X^2 y pendiente estuvieron por abajo de estos requisitos se volvieron a repetir hasta que ambos valores estuvieron dentro de los límites permitidos.

8.- Fermentación a nivel de matraz Erlenmeyer

Ya seleccionada la cepa y medio de cultivo, que presentaron la CL_{50} menor en los bioensayos con el cultivo total, se continuó con las pruebas de fermentación y optimización del medio de cultivo a nivel de matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad; en este punto, el objetivo fue buscar la concentración óptima de los componentes del medio, melaza y pasta en polvo de Gamesa, necesarios para obtener una máxima producción y actividad del extracto insecticida. Para esto se prepararon seis combinaciones de ambos componentes, en las que se variaron sus concentraciones, de tal forma que quedaron de la siguiente manera presentada en la tabla 7.

Tabla 7.- Combinaciones usadas del medio MPG, pasta en polvo y melaza, para producción del complejo insecticida de *B.t.i.*

<u>COMBINACION</u>	<u>MELAZA*</u>	<u>PASTA EN POLVO*</u>
1	1	3
2	1	5
3	1	7
4	2	3
5	2	5
6	2	7

* En % peso/volumen de agua destilada.

Los demás componentes del medio, L.R.M. y las sales minerales permanecieron como en las proporciones señaladas en la tabla 6.

Cada una de las seis combinaciones de este medio de producción se prepararon por duplicado en volúmenes de 100 ml contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad y se sometieron a las condiciones de fermentación establecidas por Vandekar y Dulmage, (1983) y Abdel- Hameed y col.(1991), para *B.t.i.*, que fueron :

Temperatura = 30°C

Agitación = 200 rpm

Tiempo = 72 horas o más hasta completar esporulación y lisis celular.

Inóculo de 1er. paso = 2 % v/v, crecido en Caldo- Triptosa- Fosfato de 12 horas de edad.
Inóculo de 2do. paso = 2 % v/v , crecido en el mismo medio de producción, de 12 horas de edad.

9.- Parámetros de fermentación.

Durante la cinética de fermentación se determinaron los siguientes parámetros :

- a) crecimiento alcanzado, mediante cuenta viable en placa, realizado por triplicado, en agar nutritivo.
- b) Determinación de pH.
- c) observación microscópica de esporas y cristales.
- d) Consumo de azúcares totales, mediante el método de la Antrona, de Dimler y col. (1952).

Cada medición se efectuó a intervalos de 24 horas, excepto para d) que fue únicamente a las 0 y 72 horas.

10.- Recuperación del complejo espora- cristal.

Al finalizar la fermentación se llevó a cabo la recuperación del extracto insecticida, cuando se observó la total liberación de la espora y el cristal, mediante el procedimiento descrito por Dulmage y col. (1970), con lactosa y acetona, filtrado con vacío, y secado toda la noche a temperatura ambiente.

11.- Producción obtenida.

El extracto de esporas y cristales, se molió en mortero, se pesó, y se obtuvo la productividad alcanzada, en g/l.

12.- Actividad del extracto insecticida.

Se evaluó la actividad del extracto obtenido, mediante bioensayos contra larvas de *Aedes aegypti* de cuarto estadio temprano, empleando 8-10 concentraciones, con dos repeticiones para cada concentración y 100 larvas como testigo. También se realizaron bioensayos con el estándar IPS-82, contra el mismo insecto de prueba, con el fin de determinar su concentración letal media (CL₅₀) y obtener la potencia de nuestros extractos, mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Potencia desconocida del extracto (UTI/mg)} = \frac{\text{CL}_{50} \text{ del estándar IPS-82}}{\text{CL}_{50} \text{ desconocida del extracto}} \times 15000$$

ITU = Unidades tóxicas internacionales

CL₅₀ = Concentración letal media.

13.-Actividades de algunos productos comerciales.

También se determinaron las actividades insecticidas presentadas por algunos productos comerciales, a nivel de laboratorio, como Teknar® (Sandoz), Vectobac G® y ABG®- Granulado, de Abbott y por último, Bactimos®, de Biochem Products, sobre el mismo insecto de prueba, con el fin de compararlos con el nuestro. Para esto se siguió el

procedimiento descrito por Mulla y col., (1982), donde se trató de encontrar el rango de concentraciones necesarias para causar desde un 10 a 90 % de mortalidad del insecto de prueba, con un mínimo de 5 concentraciones, dos menores a la CL_{50} y dos mayores a ésta.

14.- Formulación del extracto más efectivo y determinación de la potencia.

Con objeto de poder comparar nuestro extracto insecticida más potente, producido en alguna de las combinaciones del medio de cultivo seleccionado, contra los insecticidas comerciales ya mencionados, se formuló al 10 % p/p utilizando como ingredientes inertes, talco y tierra de diatomeas, además como coadyuvante en las formulaciones se agregó Tritón al 1%, (Angus y Lüthy 1971) . Las dos formulaciones preparadas se probaron contra el mismo insecto, *Aedes aegypti*, para obtener su potencia, en las mismas condiciones que para los anteriores bioensayos, que se repitieron hasta que los requerimientos estadísticos, la prueba de Chi cuadrada (χ^2) y la pendiente estuvieran dentro de los límites permitidos, así como también la mortalidad del control, (De Barjac, 1982; Vandekar y Dulmage 1983).

RESULTADOS

1.-Cultivos totales utilizados en bioensayos preliminares.

Las siete cepas bacterianas cultivadas en los seis diferentes medios diseñados, a nivel de matraz Erlenmeyer de 25 ml de capacidad, con 10 ml de medio, crecieron bien, empezaron a formar espora y cristal a las 24 a 48 horas de fermentación, posteriormente se lisaron, con liberación de ambos espora y cristal, en 72 a 96 horas, después, los 42 cultivos totales, se guardaron en congelación hasta la realización de bioensayos.

2.- Bioensayos preliminares.

En la tabla 8 se muestran los porcentajes de mortalidad con la dilución 10^{-6} , de 42 cultivos totales de *B.t.i.* sobre larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío (promedio de 2 repeticiones) y en la Figura No.1 se presentan estos mismos resultados, en ella se observa el efecto del medio en el cual se cultivaron las cepas, registrándose mayores porcentajes de mortalidad, con los cultivos totales del medio MPG (pasta en polvo de Gamesa) desde 2 a 42% de mortalidad, en segundo lugar los cultivos obtenidos en medio MHP (Harina de pescado), con cifras de 6 a 20%, y en tercer lugar los cultivos en medio MN (harina de soya) con valores de 4 a 16% mientras que los cultivos obtenidos en medios MHL (harinolina), MPS (pasta de soya de Purina) y MGM (Gluten de maíz 40) presentaron nulos o escasos porcentajes de mortalidad; en la misma tabla 8 se observa que las cepas de *B.t.i.* claves 007 y 197, presentaron bajos porcentajes de mortalidad, menores al 10%, en los seis medios utilizados, en consecuencia, se descartaron estas dos cepas y tres de los medios, MHL, MPS y MGM, y quedaron únicamente cinco de las siete cepas, claves 001, 196, 210, 223 y 225 y tres de los medios, MPG, MHP y MN, que formaron un total de 15 cultivos totales, los cuales se volvieron a bioensayar, y en esta

Tabla 8.- Porcentajes de mortalidad de Bioensayos preliminares realizados con las diluciones 10^{-6} de 42 cultivos totales de *B.t.i.* sobre larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío.

MEDIOS DE CULTIVO	CLAVE DE CEPAS DE <i>B.t.i.</i>						
	001	007	196	197	210	223	225
	% DE MORTALIDAD						
MN ^a	8	10	12	10	4	8	16
MHL ^b	0	2	0	0	2	2	2
MPS ^c	2	4	4	0	8	0	8
MHP ^d	10	6	20	6	8	6	0
MGM ^e	0	0	0	0	12	2	18
MPG ^f	34	10	34	2	26	38	42

^a Harina de soya , ^b Harinolina , ^c Pasta de soya , ^d Harina de pescado , ^e Gluten de maíz , ^f Pasta en polvo .

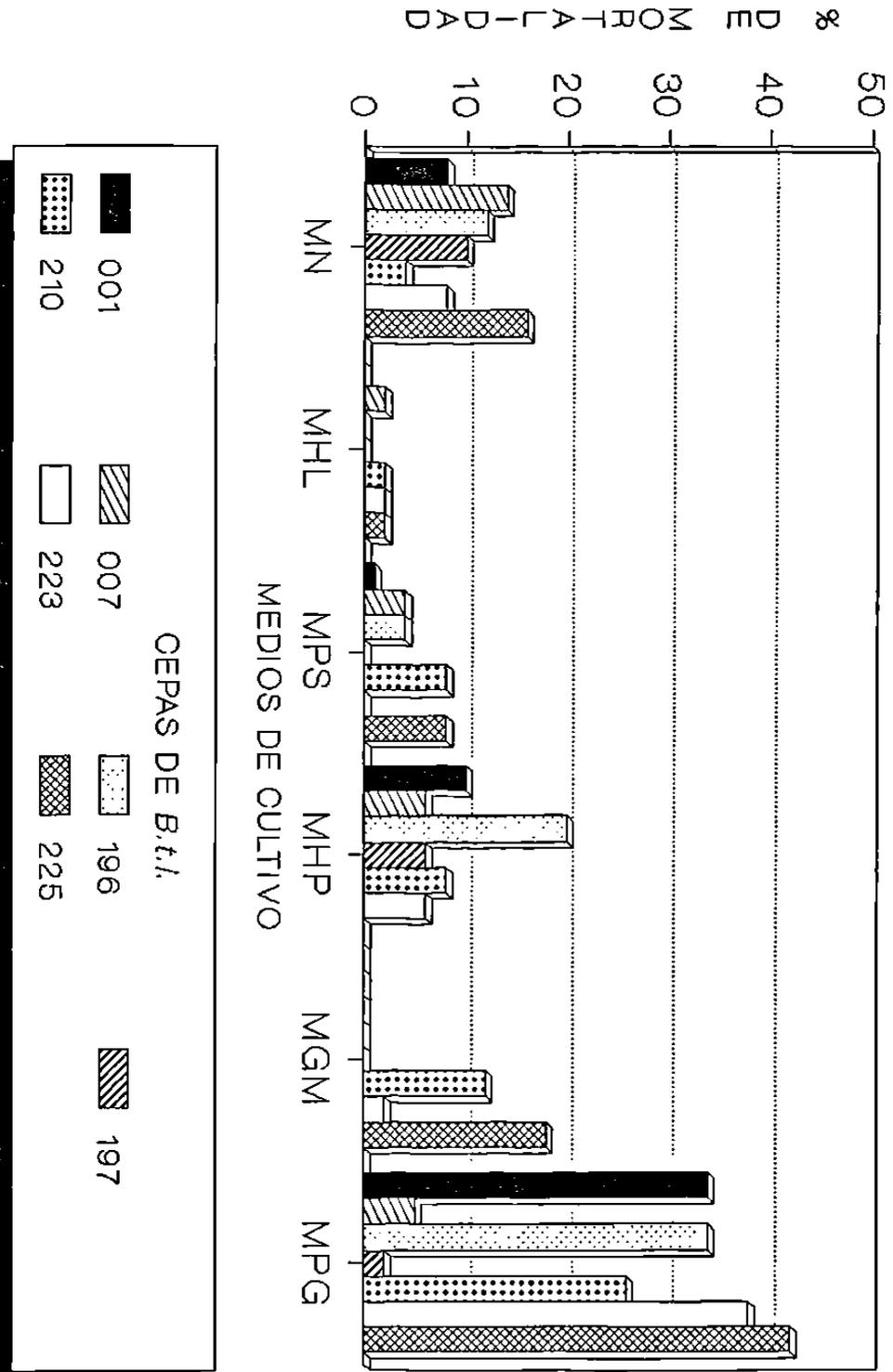


Fig 1.- Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* con cultivos totales de *B.t.i.* propagados en diferentes medios de cultivo.

prueba se emplearon concentraciones del cultivo, en un rango más estrecho, para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) con cultivo total.

3.- Resultados de Bioensayos para determinación de la concentración letal media con cultivos totales.

En la tabla No.9 se muestran los porcentajes de mortalidad presentados por la dilución 10^{-6} de los 15 diferentes cultivos totales de *B.t.i.* probados sobre larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío. Los porcentajes mayores fueron los obtenidos con la cepa 001, cultivada en el medio MPG, que alcanzó un 97%, después, la cepa 225 en el medio MN, con un 91% y en tercer lugar la misma cepa 225, pero en medio MPG, con un 89% de mortalidad. Sin embargo, las demás cepas cultivadas en los distintos medios presentaron porcentajes de mortalidad menores a los antes mencionados, y variaron en el rango de 72.8 a 3.5 %.(Fig No. 2)

Posteriormente, mediante el programa Probit, se obtuvieron las concentraciones letales medias para cada uno de estos 15 cultivos totales probados, las cuales se muestran en forma resumida en la misma tabla No. 9 y en forma gráfica en la Fig. No. 3. Así, observamos que las CL_{50} menores fueron las logradas con las cepas de *B.t.i.* claves 001 y 225 ambas cultivadas en el medio MPG (pasta en polvo de Gamesa), cuyos valores fueron de 4.7593×10^{-7} y 4.8743×10^{-7} , respectivamente, ambos expresados como diluciones del cultivo total. Debido a que la cepa clave 001 constituye la base para la preparación del estándar IPS- 82, usamos la cepa clave 225 y el medio MPG, (que dió resultados muy semejantes a la cepa clave 001) para los estudios posteriores de optimización del medio para producción del complejo bioinsecticida.

4.- Resultados de la fermentación a nivel de matraz Erlenmeyer.

a) Cinética de fermentación.

Tabla 9.- Porcentajes de mortalidad presentados por la dilución 10^{-6} de cultivos totales de cinco cepas de *B.t.i.* propagadas en tres diferentes medios de cultivo* y concentraciones letales medias sobre larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío.

CEPA	MEDIO*	% DE MORTALIDAD ^a	CL ₅₀ ^b
001	MPG	97.6	4.7593
	MN	61.6	8.6937
	MHP	60.3	7.2516
225	MPG	89.0	4.8743
	MN	91.0	5.3777
	MHP	45.6	10.2934
223	MPG	39.3	10.3265
	MN	72.8	7.2909
	MHP	50.4	11.7749
196	MPG	69.6	7.1570
	MN	42.0	11.2575
	MHP	7.2	18.6426
210	MPG	64.0	5.4395
	MN	19.2	13.7145
	MHP	3.5	45.8195

^a Son el promedio de 5 repeticiones.

^b X 10^{-7} dilución de cultivo total.

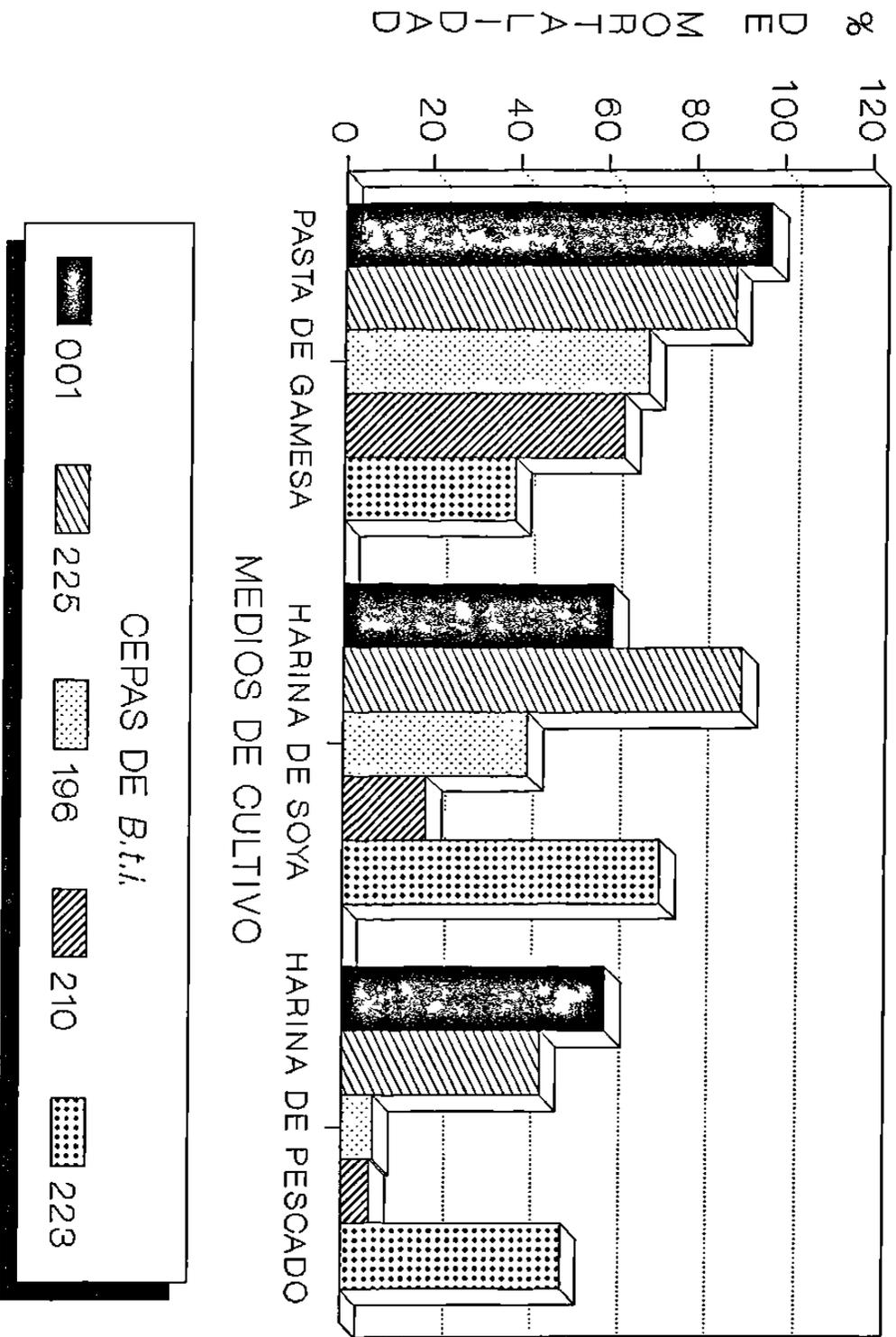


Fig 2 Toxicidad de cultivos totales de *B.t.i.* propagados en diferentes medios de cultivo, sobre larvas de *Aedes aegypti*.

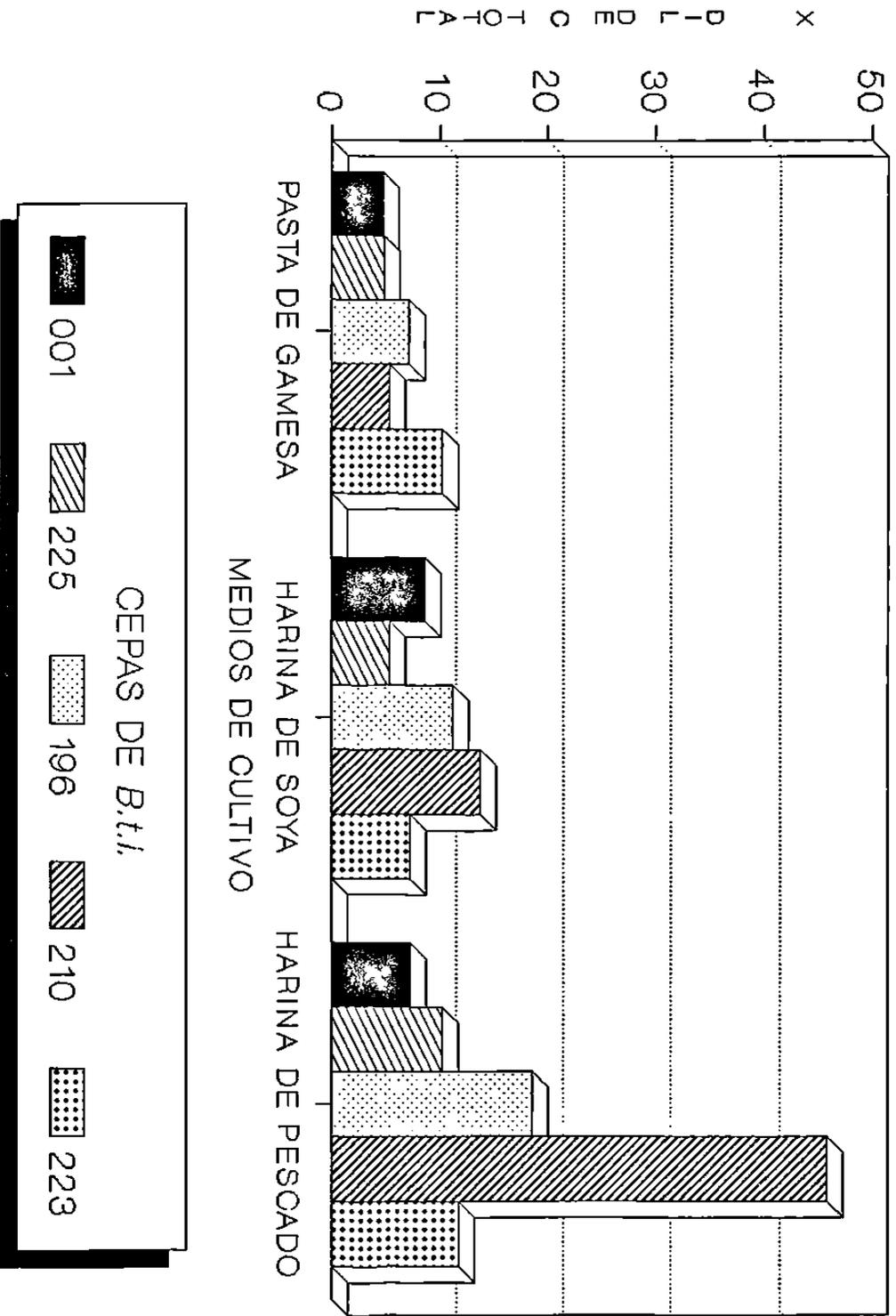


Fig 3. Concentraciones letales medias con cultivos totales de B.t.t. (Dilucion 10) sobre larvas de Aedes aegypti.

Se determinaron las cinéticas de fermentación, para las seis combinaciones del medio de melaza y pasta en polvo de Gamesa empleadas y cuyas cifras de los parámetros medidos cada 24 h, que fueron crecimiento, pH, y consumo de azúcares totales se muestran en las tablas 10 a 15 .

En la tabla No. 10 se muestran las cifras de los parámetros de fermentación determinados cada 24 h para la cepa de *B.t.i.* clave 225 cultivada en la combinación 1 del medio MPG, constituida por melaza 1% y PG (Pasta en polvo) 3%. Se inició la fermentación con un inóculo de 1.1×10^8 UFC/ml, con un pH de 6.65, que al transcurrir el tiempo descendió paulatinamente hasta 5.77 a las 72 horas, aquí se detectó el crecimiento máximo, cuyas cifras fueron de 1.0×10^9 UFC/ml de cultivo en promedio; mientras tanto, los azúcares totales disminuyeron de 1.36 g/100ml hasta 60 mg/100ml de sobrenadante, al final de las 72 horas de fermentación. Por lo que respecta a la formación de esporas y cristales, a las 48 horas ya se tenían esporas y cristales libres con lisis del 50-70% de las células, que se incrementó a cerca del 80% al cabo de 72 horas de fermentación. Esta cinética se presenta en forma gráfica en la Figura No. 4.

En la Tabla No. 11 se reportan los resultados de la cinética de fermentación de la misma cepa de *B.t.i.* propagada en la combinación 2 del medio MPG (melaza 1% y PG 5%). Al iniciar la fermentación se inoculó un 0.5 % de volumen de inóculo, con una población de 1.1×10^8 UFC/ml, el pH fue de 6.82, que en la misma forma que el precedente también fue disminuyendo gradualmente hasta 5.56 al cabo de 72 horas. El crecimiento máximo registrado fue de 7.3×10^9 UFC/ml de cultivo, a las 48 horas de fermentación (que fue la cifra más alta de todas las fermentaciones en el medio MPG) disminuyó a 6.3×10^8 a las 72 horas, diferente al anterior cuyo crecimiento máximo se logró a las 72 horas, (Fig 4). En lo que concierne al consumo de azúcares, las cifras iniciales fueron de 1.82 g/100 ml reduciéndose hasta 55 mg/100 ml a las 72 horas. Por lo que respecta a la formación de esporas y cristales, a las 48 horas había unos pocos

Tabla 10. Cinética de fermentación de *B.t.i.* cepa 225 propagada en medio MPG, combinación 1 (melaza 1%, Pasta en polvo 3%) por 72 h.

Horas	pH	Crecimiento ^a	Azúcares totales ^b
0	6.65	1.1×10^8	1.36
24	5.67	9.0×10^7	---
48	5.52	1.5×10^9	---
72	5.77	1.0×10^9	0.06

^a En UFC/ml de cultivo.

^b En g/100 ml de sobrenadante.

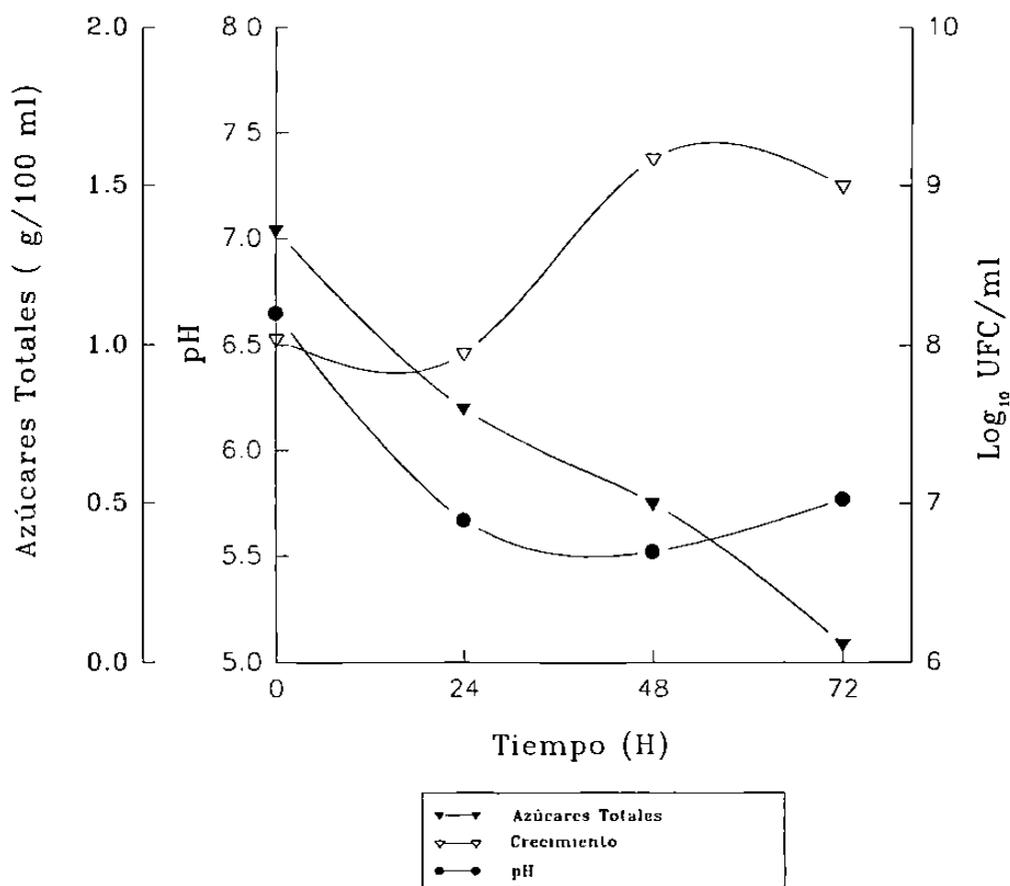


Fig 4. Cinética de fermentación de *B.t.i.* cepa 225 propagada en la combinación 1 del medio MPG, a 30° C, pH inicial de 7.0, agitación 200 r.p.m durante 72 h.

Tabla 11. Cinética de fermentación de *B.t.i* cepa 225 propagada en medio MPG, combinación 2 (melaza 1%, Pasta en polvo 5%) por 72 h.

Horas	pH	Crecimiento ^a	Azúcares totales ^b
0	6.82	1.1×10^8	1.82
24	5.48	1.7×10^8	---
48	5.45	7.3×10^9	---
72	5.56	6.3×10^8	0.055

^a En UFC/ml de cultivo.

^b En g/100 ml de sobrenadante.

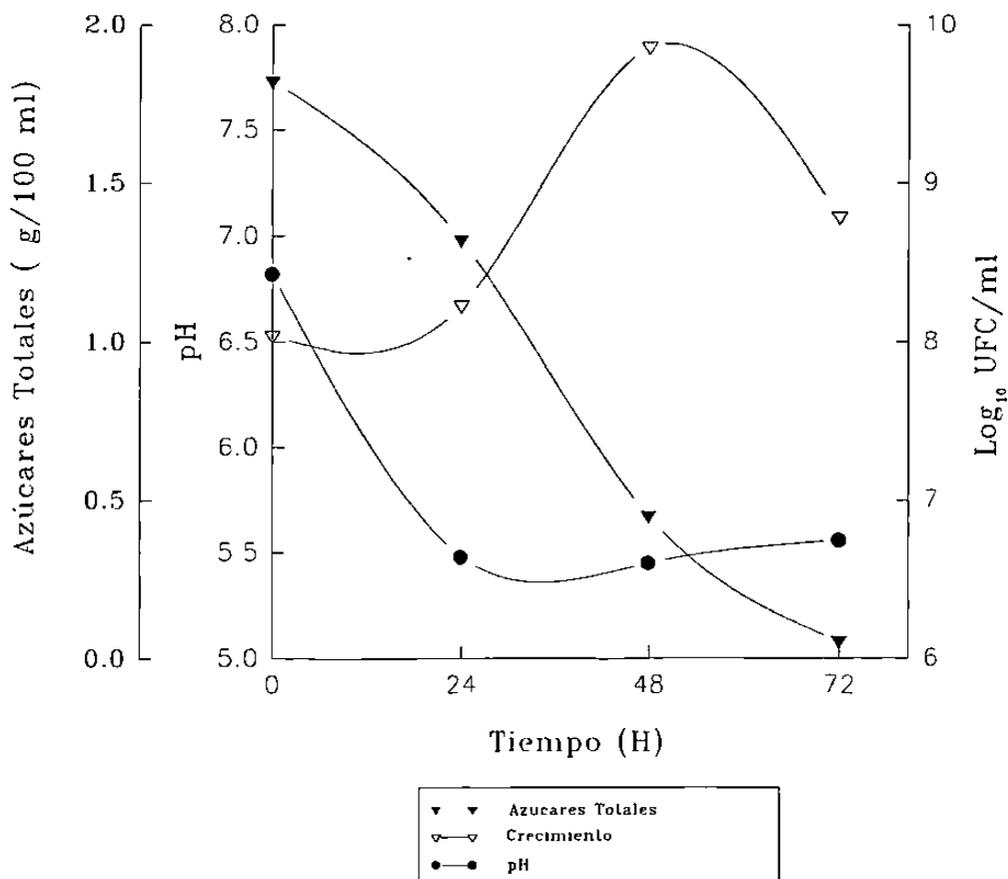


Fig 5. Cinética de fermentación de *B.t.i.* cepa 225 propagada en la combinación 2 del medio MPG, a 30 °C, pH inicial de 7.0, agitación 200 r.p.m durante 72 h.

cristales libres por campo, con lisis de aproximadamente 10-20% de las células, en tanto que para las 72 horas los cultivos presentaban pocos cristales grandes, irregulares en forma, y una lisis celular por debajo del 50%, por lo que la fermentación se dejó continuar 24 horas más para completar un 80-90% de lisis celular. Estos datos se muestran en forma gráfica en la Figura No. 5.

En la Tabla No. 12 se presentan las cifras de los parámetros de la fermentación con la misma cepa de *B.t.i.* clave 225 cultivada en la combinación 3 del medio MPG (melaza 1%, PG 7%). Esta fermentación se inició con un inóculo, (0.5% v/v), de 2.2×10^7 UFC/ml, con un pH de 6.85, que al igual que en las anteriores cinéticas descendió hasta 5.07 a las 72 horas (Cifra que fue la menor presentada, en las seis cinéticas realizadas). El crecimiento máximo logrado fue de 1.1×10^9 UFC/ml, en promedio, a las 72 horas. La concentración de azúcares totales bajó de 5.64 g/100 ml hasta 60 mg/100 ml de sobrenadante. En relación a la aparición de cristales y esporas fueron muy pocos al cabo de 48 horas, con lisis celular de aprox. 3-15%, y los cristales presentaron un mayor tamaño que en las dos fermentaciones anteriores. Al término de 72 horas había un 50% de esporas y cristales libres, por lo que se dejaron en agitación 24 horas más con el fin de obtener un mayor porcentaje de lisis celular. Los valores señalados aquí se presentan gráficamente en la Fig No. 6.

En la tabla No. 13 se indican los valores de la cinética de fermentación de la cepa de *B.t.i.* clave 225, propagada en la combinación 4 del medio MPG (melaza 2%, Pasta en polvo 3%). Se comenzó con un inóculo de 1.0×10^7 UFC/ml, semejante al de la fermentación anterior, (Tabla 12), con un pH de 6.4, el cual se mantuvo con pocas variaciones, y presentó un valor mínimo de 6.16 al cabo de 48 horas de fermentación, el cual ascendió ligeramente a 6.35 a las 72 horas, el mayor presentado en las seis fermentaciones; en lo que respecta al crecimiento, se obtuvo 2.4×10^9 UFC/ml al término de 72 horas, ligeramente mayor al presentado en la combinación 1 (1% de melaza, 3%

Tabla 12. Cinética de fermentación de *B.t.i* cepa 225 propagada en medio MPG, combinación 3 (melaza 1%, Pasta en polvo 7%) por 72 h.

Horas	pH	Crecimiento ^a	Azúcares totales ^b
0	6.85	2.2×10^7	5.646
24	5.29	6.3×10^8	---
48	5.48	5.7×10^8	---
72	5.07	1.1×10^9	0.06

^a En UFC/ml de cultivo.

^b En g/100 ml de sobrenadante.

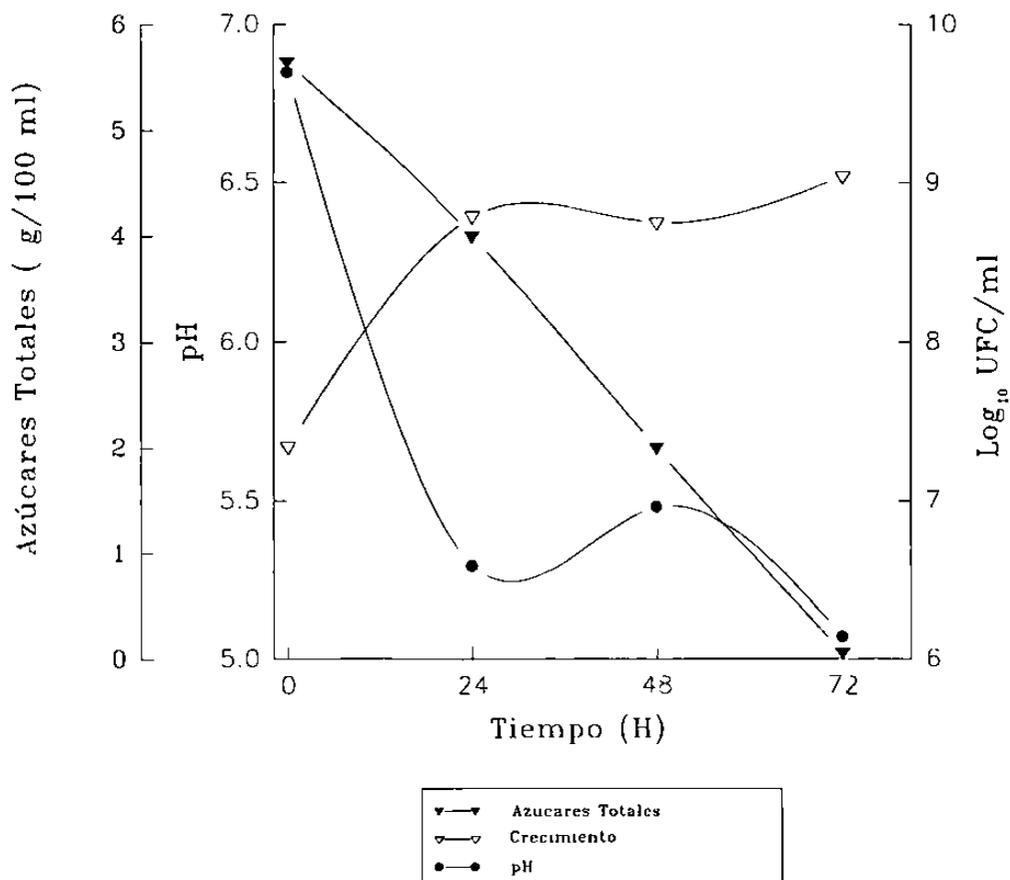


Fig. 6. Cinética de fermentación de *B.t.i.*, cepa 225 propagada en la combinación 3 del medio MPG a 30 °C, pH inicial de 7.0, agitación 200 r.p.m. durante 72 h.

Tabla13. Cinética de fermentación de *B.t.i* cepa 225 propagada en medio MPG, combinación 4 (melaza 2%, Pasta en polvo 3%) por 72 h.

Horas	pH	Crecimiento ^a	Azúcares totales ^b
0	6.4	1.0×10^7	2.795
24	6.49	1.6×10^7	---
48	6.16	1.1×10^9	---
72	6.35	2.4×10^9	0.175

^a En UFC/ml de cultivo.

^b En g/100 ml de sobrenadante.

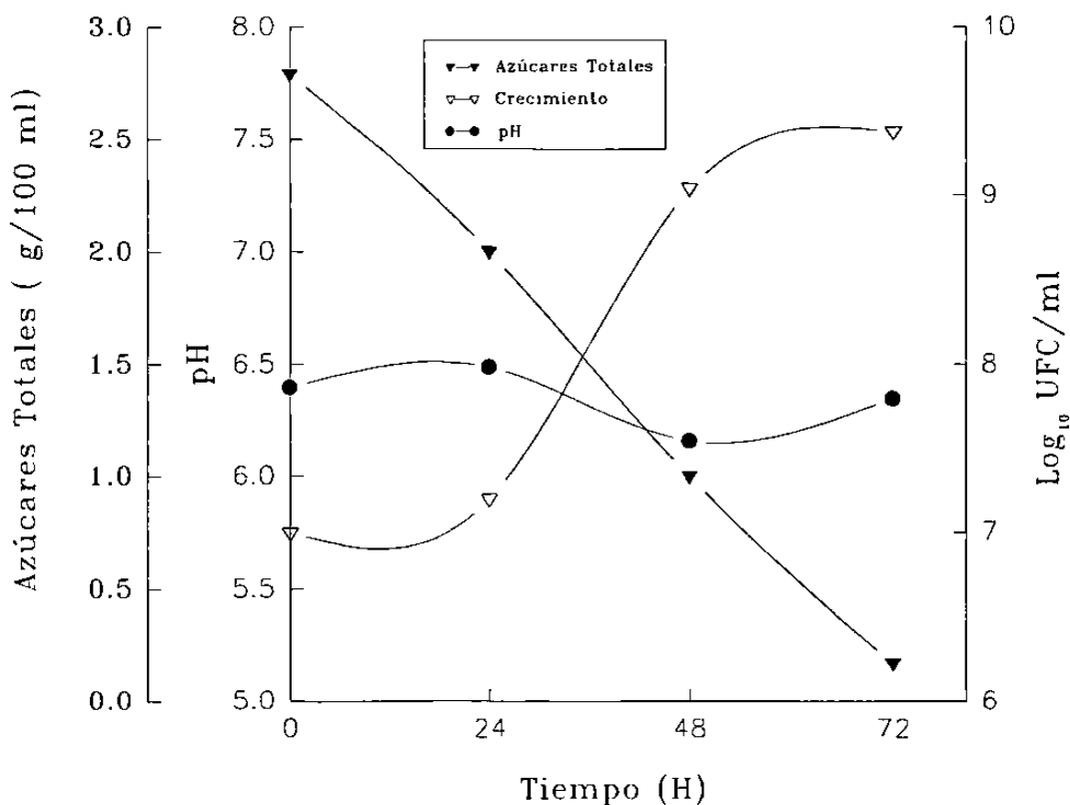


Fig 7. Cinética de fermentación de *B.t.i.* cepa 225 propagada en la combinación 4 del medio MPG, a 30 °C, pH inicial de 7.0, agitación 200 r.p.m., durante 72 h.

pasta en polvo) (Tabla 10), y al de la combinación 3 (1% de melaza, 7 % de pasta en polvo), (Tabla 12). En lo que concierne a la concentración de azúcares totales, de un valor inicial de 2.795 g/100 ml, quedó un remanente de alrededor de 175 mg /100 ml, a las 72 horas, cifra que rebasó en más de 100 mg/100 ml al presentado en medios con 1% de melaza. Por otra parte, a las 48 horas de fermentación había aproximadamente un 50% de esporas y cristales libres, con lisis del 50-70% de las células, que aumentó hasta un 80-90% al término de 72 horas de fermentación. Tales resultados se muestran en la Fig. No. 7.

La Tabla No. 14 muestra los parámetros de fermentación de la cepa de *B.t.i.* clave 225 cultivada en la combinación 5 del medio MPG (melaza 2%, pasta en polvo 5%). El número de células del inóculo al iniciar la fermentación, fue de 8.2×10^6 UFC/ml, algo menor a los mencionados anteriormente; el crecimiento máximo llegó hasta 3.5×10^8 UFC/ml, a las 72 horas de fermentación, valor que estuvo por debajo de las presentadas en las cinco fermentaciones restantes. El pH descendió gradualmente de 6.35 hasta 5.30 a las 72 horas de fermentación; en tanto que los azúcares totales disminuyeron de 4.0 g/100 ml hasta 200 mg/100 ml. En relación al porcentaje de esporas y cristales libres, al cabo de 48 horas, un 10-20% del total de células, que aumentó hasta cerca del 50% a las 72 horas, por lo que la fermentación se dejó continuar 24 horas más para completar un 80-90 de lisis celular. Estos resultados se presentan en la Fig. No. 8.

En la tabla No. 15 se presentan los resultados de la cinética de fermentación de la cepa de *B.t.i.* clave 225, propagada en la combinación 6 del medio MPG (2% melaza, 7% de pasta en polvo). El inóculo tenía una población inicial de 1.8×10^7 UFC/ml, que alcanzó un crecimiento máximo de 2.8×10^9 UFC/ml en 48 horas, que después disminuyó a 8.5×10^8 a las 72 horas; en tanto, el pH descendió lentamente de 6.43 hasta quedar en 5.28 a las 72 horas. Las cifras de azúcares totales bajaron de 6.47 g/100 ml hasta 250 mg/100 ml,

Tabla 14. Cinética de fermentación de *B.t.i.* cepa 225 propagada en medio MPG, combinación 5 (melaza 2%, Pasta en polvo 5%) por 72 h.

Horas	pH	Crecimiento ^a	Azúcares totales ^b
0	6.35	8.2×10^6	4
24	5.84	3.1×10^7	---
48	5.51	3.1×10^8	---
72	5.3	3.5×10^8	0.2

^a En UFC/ml de cultivo.

^b En g/100 ml de sobrenadante.

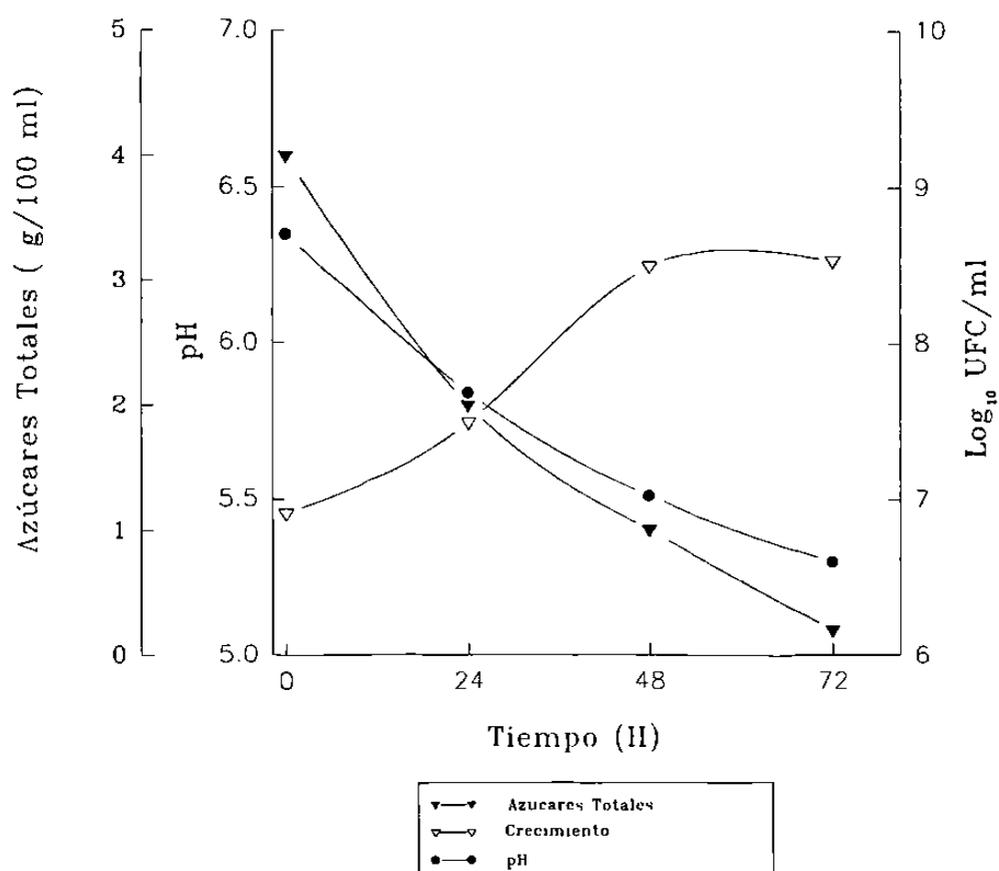


Fig. 8. Cinética de fermentación de *B.t.i.*, cepa 225 propagada en la combinación 5 del medio MPG a 30 °C, pH inicial de 7.0, agitación 200 r.p.m. durante 72 h.

Tabla 15. Cinética de fermentación de *B.t.i.* cepa 225 propagada en medio MPG, combinación 6 (melaza 2%, Pasta en polvo 7%) por 72 h.

Horas	pH	Crecimiento ^a	Azúcares totales ^b
0	6.43	1.8×10^7	6.47
24	6.16	7.0×10^8	---
48	5.34	2.8×10^9	---
72	5.28	8.5×10^8	0.25

^a En UFC/ml de cultivo.

^b En g/100 ml de sobrenadante.

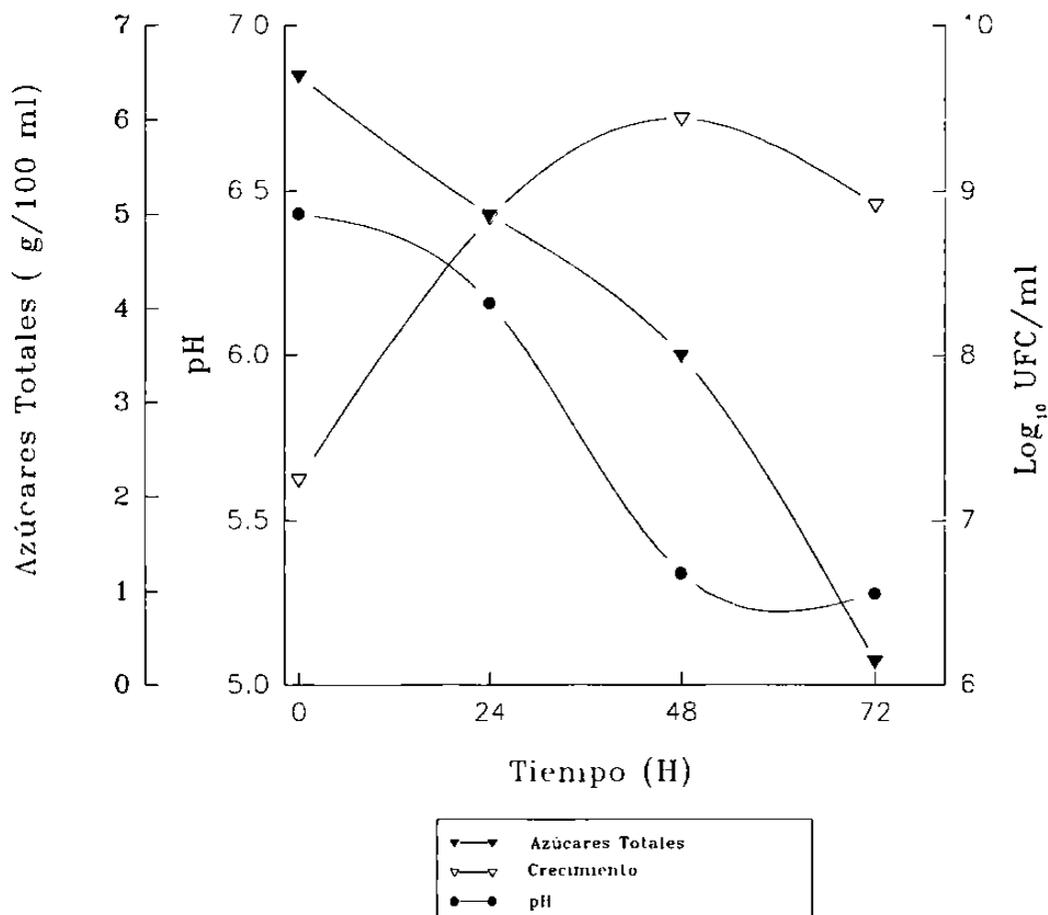


Fig. 9. Cinética de fermentación de *B.t.i.*, cepa 225 propagada en la combinación 6 del medio MPG a 30 °C, pH inicial de 7.0, agitación 200 r.p.m. durante 72 h.

por lo que hubo un remanente de casi 200 mg/100 ml en el sobrenadante, más que en los medios con 1% de melaza (además de los azúcares del tipo del almidón que precipitaron junto con el complejo espora-cristal, en un porcentaje desconocido). Por otra parte, a las 48 h había solo algunas esporas y cristales grandes libres, con lisis del 3-15% de las células, que aumentó casi hasta 50% al cabo de 72 h, por lo que la fermentación se dejó continuar 24 h más para completar un 80-90% de lisis celular. Estos datos se presentan en la Fig No. 9.

Los resultados resumidos de estas cinéticas, se presentan en la siguiente Tabla No. 16.

Tabla 16.- Crecimiento máximo, azúcares residuales y pH mínimo presentado en una fermentación de 72 horas con *B.t.i*, clave 225 propagado en seis combinaciones del medio MPG*.

Combinación	Crec. máx. ^a	Az. Resid. ^b	pH ^c
1	1	60	5.52
2	7.3	55	5.45
3	1.1	60	5.07
4	2.4	175	6.16
5	0.3	200	5.30
6	2.8	250	5.28

* Medio de Melaza y Pasta en polvo.

^a X 10⁹ UFC/ml de cultivo.

^b Azúcares residuales totales en mg/100 ml de sobrenadante, a las 72 horas de fermentación.

^c pH mínimo presentado durante la fermentación.

5.- Producción del extracto espora-cristal de *B.t.i*. 225

Tabla 17.- Producción, concentraciones letales medias y potencia de los extractos espora - cristal de *B.t.i.* cepa 225, obtenidos en seis combinaciones del medio MPG, sobre larvas de *Aedes aegypti*.

COMBINACION ^a	PRODUCCION ^b	CL ₅₀ ^c	POTENCIA ^d
1	13.05 ± 0.18	0.0317	4,400.6
2	18.9 ± 1.02	0.1046	1,333.6
3	34.2 ± 7.5	5.550	25.1
4	8.6 ± 0.16	0.0382	3,651.6
5	27.6 ± 4.0	0.7581	184
6	42.5 ± 7.7	2.9535	47.2

^a Concentraciones de melaza y pasta en polvo, del medio MPG, según la Tabla 7.

^b En g/l, promedio de 3 repeticiones.

^c Concentración letal media, en mg/l.

^d En UTI/mg de extracto de fermentación.

La tabla No.17 muestra la producción obtenida para cada una de las seis combinaciones del medio MPG en las cuales se propagó la cepa de *B.t.i.* clave 225. En ella encontramos que el valor mínimo correspondió a la combinación 4 formada por melaza 2% y pasta en polvo (PG) 3%, con valor de 8.6 g/l en promedio, seguido de la combinación 1 (1% melaza, 3% PG) con 13.05 g/l, después la combinación 2 (1% melaza, 5% PG) con 18.9 g/l, y de este valor siguió aumentando el peso del extracto espora-cristal hasta el valor máximo de 42.5 g/l obtenido para la combinación 6 (2%melaza y 7 %pasta en polvo).

Como era lógico suponer, entre mayor fue la cantidad de PG que contenía el medio o combinación, mayor fue la cantidad de extracto obtenido, ya que el residuo no utilizado al final de la fermentación, precipitó junto con el extracto. En la misma tabla No. 17 se muestran las concentraciones letales medias obtenidas para estos extractos sobre larvas de *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano. La concentración letal media mínima correspondió al extracto obtenido en la combinación 1 (1% de melaza, 3% PG), de 0.0317 mg/l, seguido del extracto producido en la combinación 4 (2% melaza, 3% PG), con 0.0382 mg/l y en tercer lugar el extracto obtenido en la combinación 2 (1% melaza, 5% PG) con 0.1046 mg/l. Los restantes extractos presentaron concentraciones letales medias en el rango de 0.7581 hasta 5.550 mg/l.

6.- Actividad del estándar IPS - 82.

El estándar usado, IPS- 82, del Instituto Pasteur de París, donado por la Dra. H. de Barjac, se probó en el mismo insecto, *Aedes aegypti*, de 4o. estadio temprano, y se emplearon siete concentraciones. Los datos del bioensayo se muestran a continuación, en la tabla No. 18.

Tabla 18.- Porcentajes de mortalidad presentados por distintas concentraciones del estándar IPS-82, sobre larvas de *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano, a las 24 horas de exposición.

Concentración (mg/l)	% de mortalidad
0.005	8
0.008	30
0.01	60
0.02	96

Estos datos, se sometieron al Programa de Probit, que determinó la concentración media letal en *Aedes aegypti*, fue de 0.0093 mg/l, con un intervalo de confianza al 95% de 0.0076 a 0.0114, un valor de Chi cuadrada (χ^2) de 1.0612 y una pendiente de 5.41, valores aceptables, según los valores de tablas. Tales datos se muestran en la tabla No. 19.

Tabla 19.-Cifras estadísticas del bioensayo con el estándar IPS-82 contra *Aedes aegypti*.

CL ₅₀	I. C.*	χ^{2**}	Pendiente
0.0093	0.0076 - 0.0114	1.0612	5.41

* Intervalo de confianza del 95 %.

** Valor de la Chi cuadrada.

7.- Actividad presentada por los extractos insecticidas producidos en las seis combinaciones del medio MPG.

Una vez obtenido el valor de CL₅₀ para el estándar IPS-82, se determinaron las potencias de los extractos obtenidos en las seis combinaciones del medio de melaza y pasta en polvo, que se muestran en la Tabla No. 17. En ella encontramos que el extracto

más efectivo fue el obtenido en la combinación 1 (1% de melaza y 3% de pasta en polvo) que resultó con 4.400.6 UTI/mg, seguido del producido en la combinación 4 (2% de melaza y 3% de pasta en polvo) con 3,561.6 UTI/mg, y en tercer lugar el extracto obtenido en la combinación 2 (1% de melaza y 5% de pasta en polvo) con 1333.6 UTI/mg. Los extractos restantes presentaron actividades insecticidas muy por debajo de los anteriormente mencionados, desde 184 hasta 25.1 UTI/mg. Cabe mencionar que los dos extractos más potentes, fueron producidos en las combinaciones 1 y 4 , del medio MPG, que contenían las concentraciones más bajas de pasta en polvo (3 %).

Las cifras estadísticas de los bioensayos realizados para determinar la potencia de los seis extractos obtenidos en las diferentes combinaciones del medio MPG, sobre larvas de *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano se muestran en la Tabla No. 20.

En ella se observa que los valores de las pendientes, desde 2.79 a 5.03, fluctuaron dentro de los límites permitidos, entre 1.5 y 6; y fueron significativamente diferentes de cero al nivel del 5%, según las cifras obtenidas para el valor F, comparados con los valores de tablas; en tanto que los valores para la Chi cuadrada, de 0.072 a 6.03, estuvieron dentro de los límites permitidos, según los valores de tablas.

Tabla 20.- Cifras estadísticas de los bioensayos realizados con los extractos espora-cristal de *B.t.i.* obtenidos en seis combinaciones del medio MPG, sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Combinación	CL ₅₀ *	I. C.**	Pendiente	Valor F	χ ² ***
1	0.0317	0.0275 a 0.0365	5.03	51.76	3.8
2	0.1046	0.0609 a 0.1797	3.30	25.70	2.54
3	5.55	4.305 a 7.156	2.79	34.06	6.03
4	0.0382	0.033 a 0.0441	4.78	537	0.4
5	0.758	0.6584 a 0.8729	4.73	146	2.14
6	2.953	2.193 a 3.977	3.50	1423	0.072

* Concentración letal media, en mg/l.

** Intervalo de confianza del 95 %

*** Chi cuadrada.

8.- Actividad presentada por bioinsecticidas comerciales, ensayados a nivel de laboratorio.

En los bioensayos realizados con los cuatro insecticidas comerciales probados, se obtuvieron las concentraciones letales medias correspondientes, y su potencia sobre *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano, se muestran en la tabla No. 21. La concentración letal media menor fue presentada por Bactimos®, con 0.0771 mg/l sobre *Aedes aegypti*, formulado al 50% de ingrediente activo, 50% ingrediente inerte, con una potencia de 1,809 UTI/mg, seguido de Teknar®, de Sandoz, con una CL₅₀ de 0.0925 mg/l, lo cual dió una potencia de 1,508 UTI/mg, en tercer lugar quedó ABG®- 6168, de Abbott, formulado al 0.2% de Ingrediente activo, con CL₅₀ de 0.5160 mg/l y una potencia de 270 UTI/mg; en último lugar, quedó Vectobac®, de Abbott, que mostró una CL₅₀ de 7.6332 mg/l y una potencia de sólo 18.27 UTI/mg.

Tabla 21.- Concentraciones letales medias y actividades comparativas de bioinsecticidas comerciales determinadas sobre *Aedes aegypti* a nivel de laboratorio..

PRODUCTO	COMPAÑIA	CL ₅₀ ^a	POTENCIA ^b
ABG-6168	Abbott	0.5160	270
Bactimos	Biochem	0.0771	1,809
Teknar	Sandoz	0.0925	1,508
Vectobac	Abbott	7.6332	18

^a Concentraciones letales medias , en mg/l.

^b En UTI / mg.

En la siguiente tabla No. 22, se presentan las cifras estadísticas de estos bioensayos realizados con bioinsecticidas comerciales, en la cual se muestra que los valores obtenidos para las pendientes fluctuaron entre 1.708 y 6.761, este último ligeramente mayor que el valor máximo aceptable = 6, mientras que las cifras para la Chi cuadrada estuvieron en el rango de 1.510 hasta 4.49, al nivel del 5%.

Tabla 22.- Cifras estadísticas de bioensayos realizados con productos comerciales a base de *B.t.i*, contra larvas de *Aedes aegypti*, a nivel de laboratorio.

PRODUCTO	CL ₅₀ ^a	I.C. ^b	PENDIENTE	VALOR F	°X ²
Bactimos®	0.0771	.03046 a .1954	1.925	21.67	2.050
Teknar®	0.0925	.05031 a .1702	1.708	66.65	1.510
ABG®-6168	0.516	.4630 a .5750	6.761	48.98	4.49
Vectobac®	7.633	5.9795 a 9.7443	3.862	52.49	2.64

^a Concentración letal media, en mg/l.

^b Intervalo de confianza del 95 %.

^c Chi cuadrada.

9.-Actividad presentada por formulados a base de *B.t.i* 225.

En la Tabla siguiente No. 23 se muestran los resultados de los bioensayos, contra larvas de *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano realizados con los dos formulados preparados con el extracto insecticida más potente, el obtenido en la combinación 1 del medio MPG. El formulado 1 constituido por un 10 % de ingrediente activo + 90 % de ingrediente inerte (talco), presentó una concentración media letal de 1.3213 mg/l, y una potencia de 105.68 UTI/mg, en tanto que el formulado 2, con tierra de diatomeas como ingrediente inerte, en la misma proporción que el formulado 1, mostró una CL₅₀ de 1.9073 mg/l y una potencia de 73.42 UTI/mg.

Tabla 23.- Actividad insecticida de formulados preparados al 10% de ingrediente activo de *B.t.i.* clave 225 + 90% de ingrediente inerte, contra larvas de *Aedes aegypti*.

Formulado	CL ₅₀ ^a	Potencia ^b
1*	1.3213	105.68
2**	1.9073	73.42

* Con talco como ingrediente inerte.

** Con tierra de diatomeas

^a Concentración letal media, en mg/l

^b En UTI/mg.

En la tabla No. 24 se señalan las cifras estadísticas de estos bioensayos con los formulados, realizados contra larvas de *Aedes aegypti*. La CL₅₀ obtenida para el formulado 1 fue de 1.3213 mg/l, el intervalo de confianza al 95 % osciló entre 0.9978 a 1.7497, mientras que la pendiente tuvo un valor de 4.44, la Chi cuadrada fue de 5.53, menor a la de tablas y el valor F fue de 24.05, lo que indica que la pendiente fue significativamente diferente de cero al nivel del 5%. Para el formulado 2, se obtuvieron valores de CL₅₀ de 1.9073 mg/l, con un intervalo de confianza del 95% de 1.1882 a 3.0615 mg/l, una pendiente de 3.40, dentro de los límites permitidos, un valor F de 39.67, lo que indica una pendiente significativamente diferente de cero al nivel del 5 %, y una Chi cuadrada de 1.84, menor a la de tablas.

Tabla 24. Cifras estadísticas de bioensayos con formulados a base de *B.t.i.* 225 (10 % de ingrediente activo + 90% de ingrediente inerte) contra larvas de *Aedes aegypti* a las 24 horas de exposición.

Formulado	CL ₅₀ ^a	I.C. ^b	Pendiente	Valor F	X ²
1*	1.3213	.9978 a 1.7497	4.44	24.05	5.53
2**	1.9073	1.1882 a 3.0615	3.40	39.67	1.84

* Con talco como ingrediente inerte

** Con tierra de diatomeas.

^a en mg/l

^b Intervalo de confianza del 95%.

Al establecer una comparación, entre las actividades insecticidas de productos comerciales y los formulados preparados al 10 % de ingrediente activo de *B.t.i.* clave 225, podemos concluir que de los cuatro bioinsecticidas comerciales probados, tres de ellos, que fueron Bactimos®, Teknar® y ABG®-6168, con 1,809, 1,508 y 270 UTI/mg respectivamente, resultaron superiores en potencia a nuestros formulados, que mostraron 105.68 y 73.42 UTI/mg, para el formulado con talco y con tierra de diatomeas respectivamente y únicamente el Vectobac®, con 18 UTI/mg fue inferior, como se muestra en la tabla No. 25.

Tabla No. 25. Concentraciones letales medias y actividades comparativas de bioinsecticidas comerciales y formulados preparados a base de ingrediente activo de *B.t.i.* 225, sobre larvas de *Aedes aegypti*.

BIOINSECTICIDA	CL ₅₀ ^a	POTENCIA ^b
Bactimos®	0.0771	1,809
Teknar®	0.0925	1,508
ABG®-6168	0.5160	270.0
Formulado 1*	1.3213	105.68
Formulado 2**	1.9073	73.42
Vectobac®	7.6332	18.0

* Con talco como ingrediente inerte.

** Con tierra de diatomeas

^a En mg/l.

^b En UTI/mg

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se diseñaron diferentes medios económicos para el cultivo y selección de cepas de *B.t.i.* de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la F.C.B.-U.A.N.L., activas contra especies de insectos vectores, en particular *Aedes aegypti*. Aunque los seis medios de cultivo preparados promovieron buen crecimiento y esporulación de las cepas bacterianas, uno de ellos, preparado con pasta en polvo, subproducto de la fabricación de pastas para sopa de Gamesa, S.A., fue con el que se obtuvieron los porcentajes de mortalidad mayores, en los bioensayos contra larvas de *Aedes aegypti*, empleando cultivos totales de las siete cepas de *B.t.i.*, tanto en los resultados preliminares, como en los definitivos para obtener la CL_{50} , que resultaron con cifras de 4.7593×10^{-7} para la cepa clave 001 y 4.8743×10^{-7} para la cepa clave 225, ambos valores expresados como diluciones del cultivo total, muy superior al reportado por Orduz y col (1992), para su nueva cepa recientemente aislada 163-131, de 0.2×10^{-4} dilución del cultivo total en *Aedes aegypti*. Al observar los resultados notamos una similitud entre los valores obtenidos para las dos cepas mencionadas y dado que la cepa clave 001, originaria de Israel, es la base del estándar IPS-82, y tomando en cuenta que la cepa clave 225 presentó una toxicidad muy semejante a la de la cepa clave 001 decidimos emplear la cepa clave 225 en los estudios posteriores de fermentación y obtención del ingrediente activo, ya que los resultados con cultivo total habían evidenciado una actividad muy semejante.

Al realizar los estudios de fermentación a nivel de matraz, con la cepa clave 225 y el medio seleccionado pasta de Gamesa (MPG), para determinar las concentraciones óptimas para producción de toxina, tanto del ingrediente ya mencionado, como de melaza, tomando como parámetros de medición crecimiento, pH, formación de cristales, rendimiento y actividad del extracto, encontramos que en lo relativo a crecimiento alcanzado tuvimos un rango de 3.5×10^8 a 7.3×10^9 UFC/ml, algo similar al alcanzado por Abdel- Hameed y col (1991), de alrededor de 1×10^9 /ml, a nivel de fermentador de 8 l

; también fue cercano a los valores reportados por Pearson y Ward (1988), quienes obtuvieron 3×10^9 UFC/ ml en matraz agitado y 6.5×10^9 / ml en fermentador de 40 l; comparado con el crecimiento reportado por Smith (1988) de $0.01 - 8.9 \times 10^8$, y el de Salama y col (1983) de 0.1 a 6.1×10^8 / ml resultó superior. Además, en fermentaciones realizadas con otras variedades de *B.f.*, las cifras de crecimiento obtenidas han fluctuado entre 3.7×10^8 /ml a 7.14×10^{11} UFC / ml, según los reportes de Dulmage (1971), Drake y Smith (1963), Maldonado-Blanco (1981), Arcas y col. (1984), Arcas y col. (1987), Razo (1990) y Rowe (1990).

Por otra parte, analizando el comportamiento del pH en las seis combinaciones preparadas, éste no alcanzó valores superiores a 7.0, por el contrario y diferente a la mayoría de los valores reportados, en los cuales el pH se eleva por arriba de 8.0, según Rowe y Margaritis,(1987), Abdel-Hameed y col.(1991), Obeta y Okafor (1984), Dulmage y col. (1970), Smith (1982), Vandekar y Dulmage (1983), en nuestros medios se mantuvo en el rango entre 5.07 y 6.65, con un valor mínimo de 5.52, en la combinación que dió el extracto más activo. Solo hubo algo de similitud, con el trabajo reportado por Pearson y Ward (1988), cuando en fermentaciones con matraces agitados, el pH osciló en el rango entre 6 y 7. En relación a esto, Abdel- Hameed y col. (1991) mencionan en su trabajo que cuando el pH decrece por abajo de 6.5, afecta en un 20 % el rendimiento de toxina, hecho que se ve incrementado hasta en un 50% cuando el pH aumenta hasta 8.0, de tal manera que se podría pensar que quizá en nuestro caso se afectó el rendimiento de toxina en alguna proporción, aunque menor, comparado con lo que se afectaría si el pH se hubiera elevado por arriba de 8.0.

En cuanto concierne al contenido de azúcares residuales, en los medios conteniendo 1% de melaza había un remanente de alrededor de $60 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 0.6 \text{ mg/ml}$, en tanto que en los medios con 2% de melaza permanecía un residuo de más de $200 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 2 \text{ mg/ml}$. Tomando en cuenta que el crecimiento no se vió incrementado al usar 2% de

melaza ni la actividad del extracto conteniendo la d- endotoxina fue mejor que con los medios con 1% de melaza, consideramos que con 1% de melaza es suficiente; esto concuerda con lo reportado por Pearson y Ward (1988) y Abdel-Hameed y col. (1991), quienes en sus medios óptimos para producción usaron 1% de melaza. Además de estos azúcares determinados en el sobrenadante, quedó también un residuo insoluble formado principalmente por almidón, materia constituyente del ingrediente usado pasta en polvo, que no se determinó en la muestra y que precipitó junto con el complejo espora- cristal. Esto contribuyó al incremento en peso del extracto obtenido e hizo que la actividad presentada por los extractos, variara inversamente a la producción como obviamente se esperaba.

En relación a esto, la producción obtenida en las seis combinaciones del medio MPG varió mucho, ya que conforme aumentaba la concentración de pasta en polvo, de los medios, de 3 hasta 7%, la producción aparente obtenida era mayor, ya que el sustrato residual que quedaba al final de la fermentación, contribuyó al incremento en peso de los extractos y por ende, la actividad resultó disminuida, por la cantidad de materia prima residual que precipitó junto con el extracto, en el proceso de recuperación del bioinsecticida, de tal manera que los extractos obtenidos en las combinaciones del medio MPG con pasta en polvo 3%, (1 y 4), presentaron una producción de 13.04 y 8.6 g/l, mientras que la actividad presentada fue de 4,400.6 y 3651.8 respectivamente, en tanto que los extractos obtenidos en las combinaciones con 5% de pasta en polvo (2 y 5), sus cifras de producción fueron de 18.9 y 27.6 g/l, con actividades de 1,333.6 y 184 UTI/mg, respectivamente; por último, los extractos obtenidos en las combinaciones con pasta en polvo 7%, (3 y 6) presentaron rendimientos de 34.2 y 42.5 g/l y toxicidades de solo 25.1 y 47.2 UTI/mg.

El extracto más potente, el producido en la combinación 1 con pasta en polvo al 3% y melaza al 1%, resultó con una actividad de 4,400.6 UTI/mg, sobre *Aedes aegypti*, que sin

embargo al ser comparado con el estándar IPS-82, resultó 3.4 veces menos potente. Cabe mencionar que en el estudio reportado por Rodríguez y col (1991), en el cual usaron una cepa recuperada del estándar IPS-82 (clave 001) y propagada en un medio de melaza y líquido de remojo de maíz, obtuvieron un extracto con una potencia de 3,571.42 UTI/mg sobre *Aedes aegypti*, valor que resultó también 4.2 veces inferior al estándar IPS-82. Esto nos lleva a pensar que quizá las dos cepas, la 001, constituyente del estándar y la 225, que utilizamos en nuestros estudios, produzcan toxicidades semejantes en el medio con melaza y líquido de remojo de maíz para la primera y el medio MPG (melaza y pasta en polvo) para la segunda y que quizá la diferencia en toxicidad que tienen con el estándar IPS-82 la haga el medio de cultivo empleado o bien el método de extracción utilizado para la preparación de este último, porque si ambas cepas se propagaran en el medio usado para preparación del estándar, quizá se obtendría una mayor potencia, comparable a dicho estándar. Otra observación deducida de nuestro estudio, es de que el medio de cultivo que se emplee para producción no debe dejar residuos o material grueso insoluble, al momento de hacer la extracción, ya que precipitarían junto con el complejo espora-cristal y entonces el producto tendría una gran cantidad de impurezas, que afectarían su potencia.

Al formular nuestro ingrediente activo más efectivo, con talco y tierra de diatomeas como ingredientes inertes, además de Tritón X-114 como coadyuvante, en la proporción 10:90:1, los resultados que obtuvimos fueron de 105.68 UTI/mg para el formulado con talco y 73.42 UTI/mg para el formulado con tierra de diatomeas. Estos valores resultan bajos para lo esperado, ya que Rodríguez Tovar (1994), en su trabajo con formulados a base de *B.t.i.*, determinó una potencia de 3,061 UTI/mg para el ingrediente activo de *B.t.i.* obtenido en medio de melaza y líquido de remojo de maíz, con el cual preparó el formulado con talco como ingrediente inerte, en la misma proporción al nuestro y obtuvo una potencia de 346 UTI/mg, valor que resulta muy semejante al de Bactimos® Pellets, de 350 UTI/mg, por lo cual el nuestro presentó una potencia tres veces inferior. Esto tal vez podría

explicarse por el hecho de que nuestro formulado se preparó varios meses después de que se obtuvo el ingrediente activo y quizá las condiciones de almacenamiento no fueron las más adecuadas, pudo ser que el extracto tomó humedad del medio ambiente, o quizá la temperatura alta característica de esta región hizo que la toxina fuera degradándose gradualmente al paso de los meses, W.H.O (1979), Guillet y col (1979), Vandekar y Dulmage, (1983).

En los bioensayos realizados con otros insecticidas comerciales, las potencias determinadas sobre larvas de *Aedes aegypti* variaron en el rango de 1809.33 a 18.27 UTI/mg. Al intentar hacer una comparación con el formulado nuestro, nos encontramos con el hecho de que pocas marcas comerciales dan a conocer el porcentaje de ingrediente activo del formulado, de tal forma que solo pudimos saber del Bactimos® y del ABG-6168®, que contienen un 50 y 0.2% de ingrediente activo respectivamente, por lo tanto fue difícil establecer una comparación exacta. Sin embargo, si podemos decir que nuestro formulado al 10% de ingrediente activo, resultó inferior al ABG-6168®, formulado al 0.2% de ingrediente activo; y el Vectobac®, que fue el producto comercial evaluado menos potente, fue inferior al nuestro, aunque desconocemos cual es el porcentaje de ingrediente activo que contiene.

Otra explicación para la baja potencia de nuestro formulado podría ser por el hábito alimenticio de la larva de *Aedes*, que se alimenta del fondo, y como nuestro formulado se preparó con talco, el tamaño de partícula de este hace que quede más en suspensión, que en el fondo, y por lo tanto a la larva le faltó ingerir la cantidad de toxina necesaria. También otro problema es el mezclado inadecuado, cuando se hace la formulación, porque le falta uniformidad.

De los objetivos inicialmente planteados, se cumplieron al seleccionar una cepa de *B.t.i*, de nuestra Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos, activa contra *Aedes*

aegypti, se diseñó un medio económico a base de subproductos, para la producción de la δ -endotoxina, y se evaluaron los productos insecticidas recuperados de dicho medio, se formuló el más efectivo y se determinó su potencia, así como de otros productos comerciales, solo que al establecer una comparación entre estos últimos y los formulados nuestros, la potencia de los formulados preparados fue baja, menor a la esperada, y pensamos que quizá el punto débil estuvo en la etapa de formulación, ya que los resultados de toxicidad con cultivo total y del ingrediente activo (extracto) fueron aceptables, por lo tanto la hipótesis de trabajo se cumplió en parte, por lo que hace falta una mayor investigación en este campo.

Finalmente debemos mencionar que el costo del medio de producción, fue bastante bajo, de aproximadamente N \$ 0.376 por litro de medio de cultivo.

De este trabajo por tanto obtuvimos las siguientes conclusiones:

- Las siete cepas de *B.t.i.* probadas mostraron buen crecimiento, esporulación y formación de cristales tóxicos en los seis medios diseñados para producción de la δ -endotoxina.
- Cuando se probaron cultivos totales, seis de las siete cepas de *B.t.i.* propagadas en el medio pasta en polvo de Gamesa, mostraron porcentajes de mortalidad mayores en larvas de *Aedes aegypti*, que los cultivos obtenidos en los restantes cinco medios.
- Las cifras menores de CL_{50} obtenidas a nivel de cultivo total, correspondieron a las cepas de *B.t.i.* claves 001 y 225 ambas cultivadas en el medio MPG (Pasta en polvo de Gamesa), con valores de 4.7593×10^{-7} y 4.8743×10^{-7} , respectivamente, expresadas como diluciones del cultivo total.
- De las cepas de *B.t.i.* evaluadas, la más efectiva fue la cepa clave 225, originaria de Kenya.
- En los experimentos a nivel de matraz de 500 ml, en seis combinaciones del medio MPG, con pasta en polvo de Gamesa y melaza, la combinación 1, constituida por 3% de pasta en polvo y 1% de melaza produjo el extracto insecticida más potente, sobre *Aedes aegypti*, con una CL_{50} de 0.0317 mg/l, una actividad de 4,400.6 UTI/mg y una producción de 13.05 g/l.
- Nuestro extracto más efectivo, resultó 3.4 veces menos potente que el estándar IPS-82.

□ Los formulados preparados con el extracto anterior, además de talco y tierra de diatomeas como ingredientes inertes *c/u*, adicionados de Tritón X-114 como coadyuvante, en la proporción 10:90:1 resultaron con una potencia de 105.68 para el preparado con talco y 73.42 UTI/mg para el de tierra de diatomeas, ambos sobre larvas de *Aedes aegypti* de 4o. estadio temprano, a nivel de laboratorio.

Entre los logros más importantes alcanzados fueron: seleccionar una cepa de *B.t.i.*, activa contra *Aedes aegypti*, diferente a los trabajos realizados con anterioridad, por otros investigadores, en los cuales se usaron cepas recuperadas del estándar IPS-82; diseñar un medio de cultivo económico con subproductos de una industria fabricante de pastas para sopa, para la producción de la δ -endotoxina de *B.t.i.*, además del ya existente, compuesto por melaza y harina de soya; y la posibilidad de usar cultivo total, directamente, en lugar del extracto seco de espora-cristal, para la selección preliminar de cultivos en base a toxicidad.

Entre las aportaciones más importantes fueron la de contribuir al conocimiento de la biotecnología de producción de *B.t.i.* en nuestro país, donde es poco lo realizado hasta ahora, por lo tanto hace falta una mayor investigación, desde las etapas de aislamiento, selección, optimización, formulación y pruebas de campo de insecticidas biológicos a base de *B.t.i.*

Dentro de las recomendaciones podríamos mencionar las siguientes:

- 1.- Cultivar la cepa seleccionada de *B.t.i.* clave 225, en el medio empleado en la preparación del estándar IPS-82 y también en el medio B-8 de Dulmage y De Barjac, (1973), con el que obtuvieron alto rendimiento de δ -endotoxina de *B.t.* .
- 2.-Determinar la actividad de los extractos obtenidos en los medios anteriores contra larvas de *Aedes aegypti*.
- 2.- Probar esta misma cepa de *B.t.i.* contra otros insectos blanco, tales como *Culex* y *Anopheles*, a nivel de laboratorio.
- 3.- Investigar otras sustancias, ya sea de origen mineral u orgánico, como posibles ingredientes inertes para preparación del formulado de *B.t.i.*
- 4.-Determinar el efecto de la humedad y la temperatura, en el almacenamiento del ingrediente activo de *B.t.i.* y también en los formulados, por períodos prolongados de tiempo
- 5.- Determinar el número de plásmidos de la cepa de *B.t.i.* seleccionada.
- 6.- Optimizar las condiciones operacionales, en relación a la aereación y agitación, para la cepa de *B.t.i.* clave 225 a nivel de planta piloto (fermentadores de 14 l de capacidad total.

LITERATURA CITADA

- 1.-Abdel-Hameed, A., G. Carlberg, y O.M. El-Tayeb. 1991. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-IV. Characterization of fermentation conditions for δ -endotoxin production. *W. J. Microbiol and Biotech.* **7**:231-236.
- 2.-Aizawai, K., N. Fujiyoshi, M. Ohba y Yoshikawa. 1975. Selection and utilization of *B. thuringiensis* strain for microbial control, Proceeding of Intersectional Congress of IAMS. Tokio **2**: 597-606.
- 3.-Angsuthanasombat, C., W. Chungjatupornchai, S. Kertbundit, P. Luxanabil, C. Settasian, P. Willairat and S. Panyim, 1987. Cloning and expression of 130-kDa-mosquito-larvicidal δ -endotoxin gen of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 384-389.
- 4.-Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, y D. J. Ellar. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry IVA and Cry IVB cloned toxins reveals synergism in vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**:63.
- 5.-Angsuthanasombat, C., y S. Panyim, 1989. Biosynthesis of 130 kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR 6. *Appl Environ Microbiol.* **55**:2428-2430.
- 6.- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature.* **173**:545-546.
- 7.-Angus, T.A. y P. Lüthy. 1971. Formulation of Microbial insecticides. En: *Microbial Control of Insects and Mites.* H.D. Burges and N.W. Hussey (Eds). Academic Press. New York. pp 623-638.
- 8.-Arcas, J., O. Yantorno, E. Arraras, y R. Ertola. 1984. A new medium for growth and delta endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 495-500.
- 9.-Arcas, J., O. Yantorno, & R. Ertola. 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnol. Lett.* **9**:105-110.
- 10.-Armstrong, J.L., G.F. Rohrmann, y G.S. Beaudreau. 1985. Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *J. Bacteriol.*, **161** : 39.
- 11.-Aronson, A.L., W. Beckman, y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol Rev.* **50**:1-24
- 12.- Arredondo- Jiménez, J.I., T. López, M.H. Rodríguez y D.N. Bown. 1990. Small scale

field trials of *Bacillus sphaericus* (strain 2362) against anopheline and culicine mosquito larvae in Southern Mexico. *J. Am. Mosq Control Assoc.* **6**:300-305.

- 13.- Balaraman, K. y S.L. Hoti, 1988. Comparative costs of mosquito control with larvicidal Bacilli and insecticides. *The Environmentalist* **8** :123-126.
- 14.- Bar, E., J. Lieman-Hurwitz, E. Rahamim, A. Keynan y N Sandler, 1991. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin DNA in *B. sphaericus*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**:149-158.
- 15.- Baumann, P., M.A. Clark, L. Baumann y A.H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxin. *Microbiol. Rev.* **55**: 425-436.
- 16.- Becker, N., 1990. Microbial Control of mosquitos and black flies. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 84-89.
- 17.- Berry, C. J. Hindley, y C. Oei, 1991. The *Bacillus sphaericus* toxins and their potential for biotechnological development, p 35-51. En K. Maramorosch (Ed) *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. CRC Press. Boca Raton, Fla.
- 18.- Boman, H.G. 1981.- Insect responses to microbial infections, En *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Burges, H.D., (Ed)., Academic Press, London. p 769.
- 19.- Bone, L.W., K.P. Bottjer, y S.S. Gill, 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: Egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Exp. Parasitol.* **60**: 314-322.
- 20.- Bourgouin, C., A. Klier, y G. Rapoport. 1986. Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta endotoxin of *B. thuringiensis israelensis*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 390-397.
- 21.- Bourgouin, C., A. Delécluse, J. Ribier, A. Klier y G. Rapoport. 1988 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125 kilodalton larvicidal polipeptide is associated with inverted repeat sequences. *J. Bacteriol* **170**:3575-3583.
- 22.- Bourgouin, C., A. Delécluse, F de la Torre, y J. Szulmajster. 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. *Appl. Environ Microbiol.* **56**:340-344.
- 23.- Charles, J.F. y H. de Barjac, 1981. Histopathologie de l'action de la δ -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves d' *Aedes aegypti* (Dip:

- Culicidae). *Entomophaga* **26**:203-212.
- 24.- Charles, J.F., y H. de Barjac, 1982. Sporulation et cristallogénese de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopie électronique. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **133A**:425-442.
- 25.- Chestukhina, G.G., L.I. Kostina, A.L. Mikhailova, S.A. Tyurin, E.S. Klepikova, y V.M. Stepanov. 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch. Microbiol* **132**:159-162.
- 26.- Chilcott, C.N., y D.J. Ellar. 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol* **134**:2551-2558.
- 27.-Chungjatupornchai, W., H. Höfte, J. Seurinck, C. Angsuthanasombat, y M. Vaeck, 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* **173**:9-16.
- 28.-Chungjatupornchai,W. 1990. Expression of the mosquitocidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* and the herbicide-resistance gene bar *in Synechocystis* PCC 6803. *Curr Microbiol.* **21**:283-288.
- 29.-Crueger, W. y A. Crueger.1989. *Biotechnology : A text book of Industrial Microbiology.* Sinaver Associates. Sunderland MA. pp 338-340.
- 30.-Dalhammer,G. y H. Steiner, 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem* **139**:247.
- 31.-Davidson, E.W., y P. Myers.1981. *Fems Microbiol. Lett.***10**:261-5.
- 32.-Dharmsthini, S.C., Pantuwatana y Bhumiratana. 1985. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1583 on media using a by-product from a monosodium glutamate factory. *J. Invertebr Pathol* **46**:231-238.
- 33.- DeBach, P. 1985. *Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas .* 12a Edición. Ed. CECSA, México, D.F. p 949.
- 34.-De Barjac, H. y A. Bonnefoi, 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key to their differentiation. *J. Invertebr Pathol.* **11**:347-355.
- 35.-De Barjac, H. 1978(a). Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* tres toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. *C.r. hebdomadaire Seanc. Acad. Sci. Paris, serie D* **286**:797-800.

- 36.-De Barjac, H. 1978 (b). Etude cytologique de l' action de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larvæ de moustiques. C.r. hebdomadaire Seances. Acad. Sci. Paris serie D 286: 1629-1632.
- 37.- De Barjac,H. 1989. New Facts and trends in bacteriological control of mosquitoes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **84**:101-105.
- 38.-De Barjac, H. y E. Frachon, 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga. **35**:233-240.
- 39.-De Barjac, H., V.C. Dumanoir, E. Frachon, H. Ripouteau, 1992. Catalogue of strains No. 1. International Entomopathogenic *Bacillus* Centre. W.H.O. Collaborating Centre. Instituto Pasteur, Paris, Francia.
- 40.-De Barjac H. y L. Larget-Thierry, 1979. Proposals for the adoption of a standardized bioassay for the evaluation of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. WHONBC 79. 744. 9 p.
- 41.-De Barjac, H. 1982. Bioassay method for the titration of *B.t.i.* preparations with IPS-82 Standard. Unité des Bacteries Entomopathogenes. Institut Pasteur, Paris, Francia. pp1-2.
- 42.-Delécluse, A., C. Bourgouin, A. Klier, y G. Rapoport. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. Mol. Gen. Genet. **214**:42-47.
- 43.- De Marsac, N.T., F.de la Torre, y J. Szulmakster, 1987. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593 in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Mol. Gen. Genet. **209**:396-398.
- 44.-Dimmler, R.J., W.C. Shasfer, O.S. Wise, C.E. Rist. 1952. Anal Chem. **124**:1411.
- 45.-Donovan,W.P., C.C. Dankocsick, y M.P. Gilbert, 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. **170**:4732-4738.
- 46.-Drake, B. & C.V. Smyth, 1963. U.S. Patent. 3,087 865.
- 47.-Dulmage, H.T. 1970. Production of the spore-endotoxin complex by variants of *B. thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol. **16**:385-389.
- 48.-Dulmage, H.T. 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*. Serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr Pathol. **18**:353-358.

- 49.-Dulmage, H.T., 1981. Production of bacteria for biological control of insects. En: Biological control of crop production, G.C. Papavizas (Ed.) Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun and Co. Totowa, N.J. 5:129.
- 50.-Dulmage, H.T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis*. Perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 84:113-122.
- 51.-Dulmage, H.T., J. A. Correa, y A. J. Martínez.1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 15:15-20.
- 52.-Dulmage, H.T., Boening, Rehnberg y Hunsen. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. J. Invertebr. Pathol. 18: 240-245.
- 53.-Dulmage, H.T. y H. De Barjac. 1973. HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of δ -endotoxin. J. Invertebr Pathol. 22:273-277.
- 54.-Fast, P.G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. En H.D. Burges (Ed) Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press Inc. London. pp 223-248.
- 55.-Faust, E.C., P.F. Rusell, y R.C. Jung. 1974. Parasitología Clínica. Reimpresión 1979. Salvat (Eds), S.A. Mallorca, España. p 888.
- 56.-Faust, R.M., y Bulla. 1982. Bacterial and their toxins as insecticides microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, New York, N.Y. 3:75-206.
- 57.-Feitelson, J.S., J. Payne, y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis* : Insects and beyond. Bio/technology. 10:271-275.
- 58.-Foo, A, y H. H. Yap. 1982. Comparative bioassays of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations against four species of mosquitoes in Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hith, 13:206-210.
- 59.-Fontaine, R.E. 1980. Mosquito Control Research: Annual Report. Univ. California, Riverside, Cal.
- 60.-Gabriel, C.J. and C.R. Cook. 1990. Biological control the need for a new scientific framework. Bio/Science. 40:204-207.
- 61.-Galán-Wong, L.J.1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hübner) y *Heliothis virescens*

(Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.

- 62.- García, R., B. Desrochers, W. Tozer y J. Mcnamara. 1983. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) var. *israelensis* for mosquito control. Proceedings and Papers of the fifty first Ann. Conf. of Calif. Mosq. and Vec. Cont. Assoc. pp 25-29.
- 63.-Georghiou, G.P., J. Baker, Z. Al-Khatib, R. Melon, C. Murray, H. Tran, M. Vasquez, F. Pelsue y J. Hazelrigg. 1983. Insecticide resistance mosquito control research, Annual report 1983, University of California, Los Angeles, E.U.A.
- 64.-Goldberg, L. y J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News. **37**:355-358.
- 65.-Goldberg, I., B. Sneh, E. Battat y D. Klein. 1980. Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *B. thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. Biotechnol. Lett. **2**:419-426.
- 66.- Goldman, I.F., J. Arnold, y B.C. Carlton. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Pathol. **47**:317.
- 67.-González, J.M. Jr, y B.C. Carlton.1984. A large transmissible plasmid required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. Plasmid. **11**: 28-38.
- 68.-Guillet, P.,J. Dempah, y J. Coz. 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis* serotype H- 14 de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. III. Données préliminaires sur la sédimentation del'endotoxine dans l' eau et sur sastabilité en zone tropicale. Rapport ORSTOM No. 7. pp 1-10.
- 69.-Guillet, P., H. Escaffre, y J.M. Prud, Hom. 1982. L'utilisation d'une formulation a base de *Bacillus thuringiensis* H-14 dans la lutte contre l' Onchocercose en Afrique de Ouest 1.-Efficacité et modalités d' application. Cach. O.R.S. TOM Ser. Ent. Med. et parasitol **20**:175-180.
- 70.-Held,G.A., L.A. Bulla Jr, E. Ferrari, J. Hoch, A.H. Aronson y S.A. Minnich. 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**:6065-6069.
- 71.-Henry, J.E. 1971. Experimental application of *Nosema locustae* for control of grasshoppers. J. Invertebr Pathol. **18**:389-394.

- 72.-Höfte, H. y H. R. Whitheley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Reviews*. 53:242-255.
- 73.-Ignoffo, C.M., T.L. Couch, C. García, y M.J. Kroha. 1981. Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* and *Heliothis virescens*. *J. Econ. Ent.* 74:218-221.
- 74.-Insell, J.P. 1983. Studies on the structure and origin of the parasporal inclusion of sporulating Bacilli. Ph.D. Thesis, University of Western Ontario, London, Ontario Canada.
- 75.-Karow, E.O., W.H. Bartholomew, y M.R. Sfat. 1953. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 1:302-306.
- 76.-Knepper, R.G., S.A. Wagner, y E.D. Walker, 1991. Aerially applied, liquid *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) for control of spring *Aedes* mosquitoes in Michigan. *J. of Am. Mosq. Control Assoc.* 7:307-309.
- 77.-Knowles, B.H., y D.J. Ellar. 1986. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific delta- endotoxin. *J. Cell Sci* 83: 89-102.
- 78.-Kuhlemeier, C.J., A.A.M. Thomas, A. Van der Eide, R.W. Van Leen, W.E. Borrias, C.A.M.J.J. Van den Hondel y G. A. Van Arkel. 1983. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* 10:156-163.
- 79.-Lacey, L.A., H. Escaffre, B. Philippon, A. Séketeu y R. Guillet. 1982. Large River treatment with *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the Onchocerciasis Control Programme. *Tropen Med Parasit* 33: 97-101.
- 80.-Lacey, L.A. y C. M. Heitzman. 1985. Efficacy of flowable concentrate formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against black flies (Diptera: Simuliidae) *J. Am. Mosq Control Assoc.* 1:493.
- 81.-Lacey, L.A. y A. Inman. 1985. Efficacy of granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the control of *Anopheles* larvae in rice fields. *J. Am. Mosq Control Assoc.* 1:38.
- 82.-Leal-Castillo, M. 1993. Sobrevivencia y actividad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en ambientes naturales contra larvas de mosquito. Tesis inédita. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- 83.-Lecadet, M.M. 1970. *B. thuringiensis* toxins. The proteinaceous crystal. En T.C. Montie, S. Kades and S.J. Ajl (Eds), *Microbial Toxins* vol. 2 Academic Press,

.New York pp 437-471.

- 84.-Lee, S.G., W. Eckblad, y L.A. Bulla Jr. 1985. Diversity of protein inclusion bodies and identification of mosquitocidal protein in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:953.
- 85.-Lépine, P. 1979. Pathologie : toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de simulies vectrices de l' Onchocercose. *C.R. Acad. Sci Paris*, 289, serie D:549-551.
- 86.-Lereclus, D., C. Bourgouin, M.M. Lecadet, A. Klier y G. Rapoport. 1989. Role, structure, and molecular organization of genes coding for the parasporal δ -endotoxin of *B. thuringiensis*. En: *The regulation of Procaryotic Development*, Smith, Slepecky and Setlow (Eds). *Am. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.* pp 255-276.
- 87.-Linek, V., P. Bernes, y Vacer V. 1988. Measurement of the aereation capacity of fermenters. *Chem. Eng. Techol.* **12**:213-217.
- 88.-Lozano-González, I.E., y E.C. López-Barbosa. 1992. Evaluación y persistencia de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de *Culex quinquefasciatus*(Say) bajo condiciones de laboratorio en Morelia, Michoacán. *Memorias del XXVII Cong. Nal. de Ent.* p 144.
- 89.-Lüthy, P. y H.R. Ebersold. 1981. *The entomocidal toxins of Bacillus thuringiensis.* Pergamon Press, Great Britain. 13:257-283.
- 90.-Lüthy, P., J.L. Cordier, y H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* a bacterial insecticide : Basic considerations and application. En : *Microbial and Viral pesticides*, E. Kurstak (Ed), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 35.
- 91.-Maldonado-Blanco, M.G. 1981. Producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* GM-1 utilizando tres diferentes medios de cultivo. Tesis Inédita. Fac. de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- 92.-Majori,G., A. Ali, y G. Sabatinelli. 1987. Laboratory and field efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* s.i. and *Culex quinquefasciatus* in Ovagadougou, Burkina Faso. *J. of Am. Mosq. Control Assoc.* **3**:20-25.
- 93.-Merrit, R.W., R. H. Dadd, y E.D. Walker. 1992. Feeding behaviour, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* **37**:349-376.
- 94.-Metcalf, L.R. 1989. Insect resistance to insecticides. *Pest Sci.***26**:333-358.

- 95.- Miller, L.H. 1992. The challenge of malaria. *Science* **257**:36-37.
- 96.-Mulla, M. 1990. Activity, field efficacy and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. En: H. de Barjac and D. Sutherland (ed). *Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press. New Brunswick, N.J. pp 134-160.
- 97.-Mulla, M. S., B. A. Federici, y H.A. Darwaseh. 1982. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against flood water mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1288-1293.
- 98.-Murga,G. M.A. 1983. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-2 en diferentes medios de cultivo. Tesis inédita. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México.
- 99.-Murphy, R.C., y S.E. Stephens Jr.1992. Cloning and expression of the cryIVD gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1650-1655.
- 100.-Nagamatsu,Y., Y. Itai, C. Hatanaka,G. Funatsu, y K. Hayashi. 1984. A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**:611-619.
- 101.-Norris, J.R. 1978. Microbial control of pest insects. En: *Companion to Microbiology*. Bull and Meadow (Eds), Longman. pp 459-479.
- 102.-Obeta, J. A. N. y N. Okafor, 1984. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:863-867.
- 103.-Ordaz, S., R. William, M.M. Correa, A.E. Montoya, y H. de Barjac. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:99-103.
- 104.-Pantuwatana, S. 1991. Control of mosquito vectors by genetically engineered *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* in the tropics. En K. Maramorosch (Ed). *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. CRC Press. Inc. Boca Raton, Fla. p 149-161.
- 105.-Pao-Intara, M., C. Angsuthanasombat, y S. Panyim. 1988. The mosquito larvicidal activity of 130 KDa delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* resides in the 72 KDa aminoterminal fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**:294-300.

- 106.-Pearson, D. y O.P. Ward. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.* **10**:451-456.
- 107.-Percy, J. y P.G. Fast. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* **41**:86-98.
- 108.-Pérez-Orona, C., M.L. Rodríguez- Tovar, y L.J. Galán-Wong.1985. Efecto de tres extractos de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Aedes aegypti* L y *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Folia Entomológica Mexicana* **63**: 75-81.
- 109.-Pfannenstiel, M.A., G.A. Couche, E.J. Ross, y K.W. Nickerson, 1986. Immunological relationships among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystalline toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:644-649.
- 110.-Porter, A.G., E.W. Davidson, y J.W. Liu. 1993. Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol Rev.* **57**:838-861.
- 111.-Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard y P.R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* **273**:43-47.
- 112.-Razo, F.E. 1990. Producción de bioinsecticidas a nivel semiindustrial. Memorias del VII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Morelos, México.p 106.
- 113.-Reardon, R.C. 1990. Use of microbials for control of defoliating insects of broadleaved trees. Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaida, Australia. p 169.
- 114.-Riley, C.M., y R. Fusco. 1990. Field efficacy of Vectobac®-12AS and Vectobac®-24AS against black fly larvae in New Brunswick streams (Diptera: Simuliidae) *J. of Am. Mosq. Control Assoc.* **6**:43-46.
- 115.-Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herman, and R.Y. Stanier. 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**:1-61.
- 116.-Rodríguez, M.L., L.H. Morales, R. Torres, H. Quiroz y M. Culebro. 1991. Evaluación en laboratorio y campo de un formulado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en larvas de *Culex* (sp). *Southwestern Entomologist* **16**:277-281.
- 117.-Rodríguez, M.L., R. Torres, S. Casillas, L. Galán y E. González. 1992.

Laboratory and field evaluation of commercial and locally prepared formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *B. sphaericus* on Culicidae of Northeastern Mexico. Mosq. Vec. Control and Biol in Latin Am.. A second Symposium. J. of Am. Mosq. Control Assoc. 8 :312-313.

- 118.-Rodríguez-Monroy, M., M. de la Torre y E. De Urquijo-Niembro. 1991. *Bacillus thuringiensis*: Características Biológicas y perspectivas de producción. Rev. Lat.amer. Microbiol. 33:279-292.
- 119.-Rodríguez-Tovar, M.L., 1994. Diseño y evaluación de formulados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en laboratorio y campo en *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) y *Aedes aegypti* (Linnaeus). Tesis inédita. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, N.L., México.
- 120.-Rowe, G. E. 1990. Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London. Ontario, Canada. Thesis Doc. p 295.
- 121.-Rowe, G.E., y A. Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. En: The critical reviews in Biotechnology, G.G. Stewart and Inge Rusell (Eds) CRC Press. Boca Raton, Florida. 6:87-123.
- 122.-Salama, H.A., M.S. Foda, H.T. Dulmage, y A.M. El-Sharaby. 1983. Novel fermentation media for production of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 41:8-19.
- 123.-Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, S. Guo, y M.M. Lecadet. 1989. Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera* active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai* Mol. Microbiol. 2:393-404.
- 124.-Scherrer, P., P. Lüthy y B. Trumpi. 1973. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucosa concentrations. Appl. Microbiol. 25:644-646.
- 125.-Schnepf, H.E., y H.R. Whiteley. 1985. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem. 260:6273-6280.
- 126.-Sen, K., G. Honda, N. Koyama, M. Nishida, A. Neki, H. Sakai, M. Himeno, y T. Komano. 1988. Cloning and nucleotide sequences of the two 130 KDa insecticidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Agric. Biol. Chem. 52:873-878.
- 127.-Service, M.W. (Ed) 1986. Blood-sucking insects: vectors of disease. Edward Arnold. London.

- 128.- Shevelev, A. B., M.A. Svarinsky, A. I. Karasin, Ya. N. Kogan, G.G. Chestukhina, V. M. Stepanov. Primary structure of *cryX*, the novel δ -endotoxin-related gene from *Bacillus thuringiensis* spp. *galleriae*. *Febs Lett.* **336**:79-82.
- 129.-Sikdar, D.P., M.K. Majumdar y S.K. Majumdar. 1991. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnol. Lett.* **13**:511-514.
- 130.-Smith, R.A. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* **28**: 1089-1092.
- 131.-Soper, R.S., y D.M. LacLeod. 1981. Descriptive epizootiology of an aphid mycosis. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. **1634**:1-17.
- 132.-Sprenkel, R.K., W.M. Brooks, J.M. Van Duyn, & L.L. Dietz.1979. The effects of three cultural variables on the incidence of *Nomuraea rileyi* phytophagous lepidoptera, and their predators on soybeans. *Environ. Entomol.* **8**:334-339.
- 133.-Stairs, G.R., 1971. Use of viruses for microbial control of insects. En: Microbial control of insects and mites. Burges, H.D. y N.W. Hussey (Eds), Academic Press. New York, N.Y.
- 134.-Steinkraus, D.C. 1990. Control of vector by the entomophthorales: Current status and future challenges. Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaide, Australia. pp 97-101.
- 135.-Thanabalu, T., J. Hindley, S. Brenner, C. Oei y C. Berry. 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for a biological control of aquatic insect larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:905-910.
- 136.-Thomas, W.E., y D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* **60**:181.
- 137.-Thompson, M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent. Application number: 91305048.0. Publication number: 0 461 799 A3.
- 138.-Thorne, L., F. Garduno, T. Thompson, D. Decker, M. Zounes, M. Wild, A. M. Walfield, y T.J. Pollock. 1986. Structural similarity between the Lepidoptera-and-Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *J. Bacteriol.* **166**:801-811.

- 139.-Trisrisook, M., S. Pantuwatana, A. Bhumiratana, y W. Panbangred.1990. Molecular cloning of the 130-kilodalton mosquitocidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on *Bacillus sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1710-1716.
- 140.-Tungpradubkhul,S., C. Settasatien, y S. Panyim. 1988. The complete nucleotide sequence of a 130 kDa mosquito-larvicidal delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Nucleic. Acids Res.* **16**:1637-1638.
- 141.-Tyrell, D.J., L.L. Davidson, L.A. Bulla, y W.A. Ramoska. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:656-658.
- 142.-Vandekar, M. y H.T. Dulmage. 1983. Guidelines for production of *B. thuringiensis* H-14. UNDP/World Bank/ W.H.O. Geneva, Switzerland.
- 143.-Waalwijk, C., A.M. Dullemans, M.E.S. van Workum, y B. Visser. 1985. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Mr 28 000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Res.* **13**:8207-8217.
- 144.-Ward,E.S., y D.J. Ellar. 1986. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxin. Nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. *J. Mol Biol.* **191**:1-11.
- 145.-Ward, E.S., y D.J. Ellar. 1987. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 KDa delta endotoxin. *Nucleic Acids Res.* **15**:7195.
- 146.-Ward, E.S., y D.J. Ellar. 1988. Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130 kilodalton mosquitocidal proteins. *J. Bacteriol.* **170**:727-735.
- 147.-Ward, E.S., D.J. Ellar, y J.A. Todd. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the insecticidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *FEBS Lett.* **175**:377-382.
- 148.-Ward, E.S., A.R. Ridley, D.J. Ellar y J. A. Todd. 1986. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin: cloning and expression of the toxin in sporogenic and asporogenic strains of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **191**:13-22.
- 149.-Ward, E.S., D.J. Ellar, y C.N. Chilcott.1988. Single aminoacid changes of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. *J. Mol Biol* **202**:527-535
- 150.-Whiteley,H.R., J.W. Kronstad, H.E. Schnepf, y J.P. DesRosier.1982. Cloning the

crystal protein gene of *B. thuringiensis* in *E. coli*. En : Molecular cloning and gene regulation in Bacilli.. Chang, S. y J.A. Hoch (Eds). Academic Press, N. Y..p 131.

- 151.-W. H. O. 1979. Data sheet on the biological control agent *B. thuringiensis* serotype 14 (De Barjac,1978). Information document produced by the WHO/VBC. pp 1-12.
- 152.-Yap, H.H. 1990. Field trials of *Bacillus sphaericus* for mosquito control. En : Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. De Barjac, H. and D. Sutherland (Eds). Rutgers University Press. New Brunswick, N.J. pp 307-320.
- 153.-Yousten, A.A., F.J. Genthner, y E.F. Benfield. 1992. Fate of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* in the aquatic environment. J. of Am. Mosq. Control Assoc. 8:143-148.
- 154.-Zaim, M., H. Kasiri y M. Motabar. 1992. Efficacy of a flowable concentrate formulation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against larval mosquitoes in Southern Iran. J. of Am. Mosq. Control Assoc. 8:156-158.
- 155.-Zamola, B., P. Valles, G. Meli, P. Miccoli, y F. Kajfez.1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol. Bioeng. 23:1079-1086.

