

788

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



"RECUPERACION DE CEPAS HD DE Bacillus thuringiensis,  
SU PROPAGACION EN 14 MEDIOS DE PRODUCCION Y LA  
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD TOXICA CONTRA  
Trichoplusia ni (Hüber) y Heliothis virescens (Fabricius)"

## TESIS

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

PRESENTA

Q.F.B. EDNA ELISA PONCE MORENO

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1995





TM

QR82

.B3

P6

c.1



1080072493

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



"RECUPERACION DE CEPAS HD DE Bacillus thuringiensis,  
SU PROPAGACION EN 14 MEDIOS DE PRODUCCION Y LA  
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD TOXICA CONTRA  
Trichoplusia ni (Hübner) y Heliothis virescens (Fabricius)"

## TESIS

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

PRESENTA

Q.F.B. EDNA ELISA PONCE MORENO

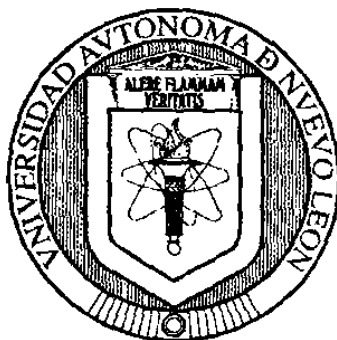
MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1995

TM  
0282  
03  
P6



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**“RECUPERACIÓN DE CEPAS HD DE *Bacillus thuringiensis*, SU PROPAGACIÓN EN 14 MEDIOS DE PRODUCCIÓN Y LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA CONTRA *Trichoplusia ni* (Hüber) y *Heliothis virescens* (Fabricius)”**

TESIS

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

PRESENTA

**Q.F.B. EDNA ELISA PONCE MORENO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“RECUPERACIÓN DE CEPAS HD DE *Bacillus thuringiensis*, SU PROPAGACIÓN EN 14 MEDIOS DE PRODUCCIÓN Y LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA CONTRA *Trichoplusia ni* (Hüber) y *Heliothis virescens* (Fabricius)”**

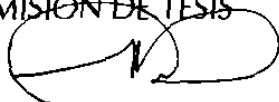
TESIS

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

PRESENTA

**Q.F.B. EDNA ELISA PONCE MORENO**

COMISIÓN DE TESIS



DIRECTOR

Dr. Luis Jesús Galán Wong



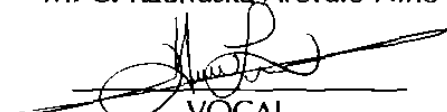
CODIRECTOR

M. C. Lucía Leticia Palacios Cortés



SECRETARIO

M. C. Katiñuska Arévalo Niño



VOCAL

M. C. Hugo Alberto Luna Olvera

## **REALIZACIÓN DEL TRABAJO**

Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo "Dr. H. T. Dulmage", Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L. México.



# CONTENIDO

Lista de abreviaturas	iv
Lista de cuadros	v
Lista de figuras	viii
Dedicatoria	ix
Agradecimientos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
Hipótesis	2
Objetivos	2
<b>II. Antecedentes</b>	
1. Control biológico	3
1.1 Insecticidas vírales	3
1.2 Protozoarios como insecticidas	4
1.3 Hongos como insecticidas	4
1.4 Insecticidas bacterianos	5
2. Reseña Histórica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
3. Morfología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
4. Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
4.1 $\alpha$ -exotoxina	11
4.2 $\beta$ -exotoxina	11
4.3 $\delta$ -endotoxina	12
5. Metabolismo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
5.1 Crecimiento vegetativo	14
5.2 Metabolismo de nitrógeno	14
5.3 Fase de transición	16
5.4 Fase de esporulación	16
6. Medios de cultivo para <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
7. Recuperación del cristal insecticida	20
7.1 Deshidratación	20
7.2 Liofilización	20
7.3 Precipitación lactosa-acetona	20

7.4 Aspersión	20
8. Pruebas de toxicidad y estandarización	20
<b>III. Materiales y Métodos</b>	<b>22</b>
1. Selección de extractos	22
1.1 Procedencia	22
1.2 Parámetros de selección	22
1.3 Extractos seleccionados	22
2. Estudio de toxicidad de extractos	23
2.1 Características del experimento	23
2.2 Determinación del índice de mortalidad	23
2.3 Análisis estadístico	24
3. Optimización del medio de cultivo	24
3.1 Fuente de carbono	24
3.2 Fuente de nitrógeno	25
3.3 Diseño experimental	25
3.4 Selección del medio de cultivo	26
• Activación de la cepa	26
• Preparación del inóculo	26
• Propagación	26
• Determinación de la cinética de crecimiento	27
• Recuperación del complejo espora-cristal	27
• Determinación de producción	27
• Conteo de esporas	28
• Determinación del coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato	28
• Bioensayos de los extractos a nivel matraz	28
• Determinación de potencia	29
3.5 Toxicidad comparativa de las cepas seleccionadas	29
4. Evaluación y selección de una cepa altamente tóxica	29
4.1 Consumo de materia prima	29
4.2 Parámetros de producción	29
5. Producción a nivel fermentador de 14 litros	30
5. 1 Preparación del inóculo	30
5. 2 Propagación	30
5. 3 Medio de cultivo utilizado	30
5. 4 Condiciones a nivel fermentador	30

5. 5 Cinética de cultivo	31
5. 6 Recuperación del complejo espora-cristal	31
5. 7 Determinación de parámetros de producción	31
5. 8 Bioensayos de extractos, conteo de esporas y determinación del coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato	32
5. 9 Demanda biológica de oxígeno	32
5.10 Velocidad específica de consumo de oxígeno	32
5.11 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	32

#### **IV. Resultados**

1. Selección de extractos	33
2. Estudio de toxicidad de los extractos	33
3. Evaluación y selección de la cepa más tóxica	35
3.1 Consumo de materia prima (Azucares)	35
3.2 pH	37
3.3 Producción	39
3.4 Conteo de esporas	40
3.5 Coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato	41
3.6 Toxicidad	42
3.7 Selección de la cepa más tóxica	43
4. Experimentos a nivel fermentador 14 litros	
4.1 Utilización de la fuente de carbono	44
4.2 pH	44
4.3 Producción	44
4.4 Productividad	45
4.5 Conteo de esporas	45
4.6 Coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato	45
4.7 Demanda de oxígeno	46
4.8 Coeficiente de respiración	46
4.9 Coeficiente de transferencia de oxígeno $KL_a$	46
4.10 Toxicidad y potencia	46

<b>V. Discusiones y conclusiones</b>	47
--------------------------------------	----

<b>VI. Recomendaciones</b>	49
----------------------------	----

<b>VII. Referencia bibliográfica</b>	50
--------------------------------------	----

<b>VIII. Apéndice</b>	63
-----------------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>B. t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	grados centígrados
$C_L$	Concentración de oxígeno en el medio de cultivo
$C^*$	Concentración de oxígeno en equilibrio
col.	Colaboradores
CTP	Caldo triptosa fosfato
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DNS	ácido 3,5 - dinitrosalicílico
g/l	gramo (s) por litro
gB	gramo (s) de biomasa
gS	gramo (s) de sustrato
h	hora (s)
<i>H.</i>	<i>Heliothis</i>
H.D.	Howard Dulmage
KDa	Kilodaltons
$KL_a$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
l	Litro (s)
LMC	Medio de cultivo
LRM	Líquido de remojo de maíz
min	Minuto
ml	Mililitro
N	Normal
Na	Demanda biológica de oxígeno
nm	nanometro (s)
%	Por ciento
ppm	Partes por millón
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H <sup>+</sup>
PCI	Proteínas cristal insecticida
QO <sub>2</sub>	Velocidad específica del consumo de oxígeno
r.p.m.	revoluciones por minuto
sp	especie
subsp	subespecie
<i>T.</i>	<i>Trichoplusia</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
var	variedad
<i>vi.</i>	<i>virescens</i>
VG	Virus granular
VPN	Virus de la polihedrosis nuclear
VVM	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
μg/ml	microgramos por mililitro
Yx/s	Coefficiente de rendimiento celular en base a sustrato

## LISTA DE CUADROS

Cuadro No.	Título	Página
1	Insecticidas microbianos disponibles en el mercado mundial.	6
2	Clasificación de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de acuerdo al serotipo H.	9
3	Clasificación de las proteínas del cristal producido por <i>Bacillus thuringiensis</i> e insectos susceptibles.	10
4	Cultivos afectados por <i>T. ni</i> y <i>H. virescens</i> susceptibles de ser controlados por <i>Bacillus thuringiensis</i> .	13
5	Formulaciones comerciales apartir de <i>B. thuringiensis</i>	13
6	Condiciones experimentales en que se realizó el estudio de toxicidad de los extractos.	23
7	Composición de la dieta Shorei modificada	24
8	Composición de los medios de cultivo utilizados para las cepas más tóxicas de la colección.	25
9	Condiciones a nivel fermentador 14 litros para la producción de la $\delta$ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa HD-1.	31
10	Características de los extractos seleccionados de la colección internacional de bacilos entomopatógenos para el control biológico de <i>T. ni</i> y <i>H. virescens</i> .	33
11	Toxicidad presentada por 7 extractos de la colección internacional de bacilos entomopatógenos después de 15 años de almacenamiento.	34
12	Comparaciones de medias de la toxicidad de los 7 extractos de <i>B. thuringiensis</i> seleccionados de la colección internacional de bacilos entomopatógenos.	34
13	Prueba de t Student para comparar el consumo de azúcares en los catorce medios por las cepas <i>B. thuringiensis</i> cepas HD-1 y HD-73.	35

14	Comparación de pH para ambas cepas de <i>B. thuringiensis</i> mediante la prueba de Student.	37
15	Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1 del pH final obtenido al ser probadas en 14 medios de cultivo.	38
16	Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73 del pH final obtenido al ser probados 14 medios de cultivo.	38
17	Comparación de producciones para ambas cepas de <i>B. thuringiensis</i> mediante la prueba de Student.	39
18	Prueba de t Student aplicada para comparar el número de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> obtenidas en los medios de cultivo para las cepas HD-1 y HD-73.	40
19	Prueba de t Student para comparar el rendimiento celular en las cepas HD-1 y HD-73.	41
20	Prueba de comparación de medias de Tuckey para <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa HD-1 del coeficiente de rendimiento celular obtenido al ser probados en 14 medios de cultivo.	41
21	Prueba de comparación de medias de Tuckey para <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa HD-73 del coeficiente de rendimiento celular obtenido al ser probados en 14 medios de cultivo.	42
22	Prueba de t Student aplicada a la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1 comparando el promedio de la toxicidad obtenida en los 14 medios de cultivo contra el estándar.	42
23	Prueba de t Student aplicada a la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73 comparando el promedio de la toxicidad obtenida en los 14 medios de cultivo contra el estándar.	43
24	Toxicidad presentada por las cepas HD-1 y HD-73 de <i>B. thuringiensis</i> en los 14 medios de cultivo probados.	43
25	Cepas seleccionadas como mejores a nivel matraz.	44



## LISTA DE CUADROS DE APÉNDICE

Cuadro No.	Título	Página
1A	Anova que muestra el efecto de toxicidad de los 7 extractos seleccionados de la CIE de los cuales parte la investigación.	63
2A	Pruebas de $X^2$ que muestran el efecto de la dosis e insectos con respecto a los 7 extractos seleccionados de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .	63
3A	Anova que indica el efecto de el consumo de azucares en los diferentes medios de cultivo utilizando <i>B. thuringiensis</i> cepa HD-1.	63
4A	Anova que determina el comportamiento del consumo de azucares en los 14 medios de cultivo probados con la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73.	64
5A	Anova que muestra el efecto del pH en los medios de cultivo utilizando la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1.	64
6A	Anova que determina el comportamiento del pH en los medios de cultivo donde se propagó la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73.	64
7A	Anova realizado a la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1 para mostrar el efecto de producción en los medios de cultivo probados.	64
8A	Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1 analizando la producción en los medios de cultivo.	65
9A	Anova realizado a la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73 para observar el efecto de la producción en los medios de cultivos.	65
10A	Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73 donde se compara la producción obtenida en los medios de cultivo analizados.	66
11A	Anova para observar el efecto de rendimiento en la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1 al utilizar 14 medios de cultivo.	66
12A	Anova del efecto de rendimiento en la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73 al propagarse en 14 diferentes medios de cultivo.	66

## LISTA DE FIGURAS

No. de figura	Título	Página
1	Comportamiento seguido por la bacteria durante la etapa de crecimiento vegetativo.	15
2	Rutas de aminoácidos seguidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> .	15
3	Rutas seguidas durante la fase de transición.	16
4	Pasos que se llevan a cabo durante la etapa de esporulación.	17
5	Azúcares consumidos (%) por la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-1 en los medios de cultivo probados.	36
6	Azúcares consumidos (%) por la cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-73 en los medios de cultivo probados.	37

## DEDICATORIA

A ti Señor:

Por haberme permitido llegar felizmente a este día.

A mis Padres:

**Sr. Humberto Rolando Ponce Sepúlveda**  
**Sra. Elena María C. Moreno Mauricio**

Por ser el apoyo y ejemplo en cada segundo de mi existencia, quienes con su experiencia han contribuido en gran parte a la formación de mi vida y que desde el principio han fortalecido mi espíritu a través de la vida, aceptando mis errores, mejorando mis virtudes, disfrutando alegrías y soportando sinsabores.

A mis hermanos:

**Claudia Lorena y Humberto Rolando** compañeros inseparables e inmejorables a quienes tanto quiero.

A mis tíos:

**Guillermina, Carlos, Arturo, María del Carmen y María de la Luz** por sus sabios consejos, quienes nunca escatimaron algún esfuerzo haciéndome sentir siempre su apoyo.

A mis amigos:

**Claudia Hernández, Juany Reyna, Lucy Puente, Alejandra Rodríguez e Isaías Balderas**, a ustedes que a lo largo del camino, fueron testigos de mis sueños y desvelos, triunfos y fracasos, alegrías y disgustos, diversiones y responsabilidades.

**Al Dr. Rahim Foroghbakhch y Juan Carlos Reyes** por acompañarme y apoyarme en ésta tarea.

A todos ustedes que me han acompañado de la mano, hoy dedico estas líneas, que son una pequeña muestra de mi agradecimiento y respeto a ese esfuerzo desinteresado, que día a día han realizado para lograr lo que hoy se ha consumado.



## AGRADECIMIENTO

Al **Dr Luis J. Galán Wong**, por sus sugerencias y acertada dirección de tesis.

Le agradezco muy especialmente al **Dr. Rahim Foroughbakhch**, por el tiempo que me brindó, por todos sus consejos y la paciencia que tuvo conmigo al asesorarme estadísticamente.

A la **M. C. Lucía Leticia Palacios Cortés**, por tu excelente codirección, por la ayuda que me brindaste al trabajar juntas y por tus conocimientos aportados.

A la **M. C. Patricia Taméz Guerra**, por tus aportaciones y sugerencias en éste trabajo.

A la **M. C. Katiushka Arévalo Niño**, por tu apoyo y asesoría brindada.

Al **M. C. Hugo Alberto Luna Olvera** por sus sugerencias en la revisión del trabajo.

A la **Q. F. B. Juana Ma. Reyna Reyes**, por tu colaboración, desvelos y amistad siempre brindada.

A **Claudia Hernández y Luz Eugenia Puente** por haberme acompañado en situaciones inaccesibles.

Al **I. Q. Juan Carlos Reyes Muñoz**, por tus valiosas contribuciones y consejos.

Al **M. C. Ernesto Javier Sánchez Alejo**, por su ayuda tan acertada en la redacción del trabajo.

Al **Sr Feliciano Molina** por su ayuda para la realización de este trabajo, dedicándole gran parte de su tiempo.

Agradezco de manera especial a **René Cuéllar, Carlos Sandoval Coronado, Diana Monsiváis, Ma. Magdalena Iracheta C., Leticia Hauad, Lilia Hortencia Morales, Norma González, Dora Medellín** y a todo el personal del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, por todo el tiempo, ayuda y enseñanzas que me brindaron durante mi estancia en los laboratorios.

## RESUMEN

Se revisó la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos (CIE), conformada por 3,000 extractos de *Bacillus thuringiensis* procedentes de las cepas HD y 500 de GM, observándose que los más tóxicos contra los insectos plaga *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens* fueron las HD. Se seleccionaron y evaluaron 7 extractos procedentes de la CIE, eligiéndose las cepas HD-1 y HD-73 como candidatas, debido a que su toxicidad había permanecido a lo largo de 15 años, ambas se cultivaron en 14 medios de cultivo, donde como fuente de carbono se utilizaron; melaza o dextrosa, como nitrógeno; harina de soya y los cofactores líquido de remojo de maíz. Se determinó: utilización de la fuente de carbono, pH, producción, toxicidad, potencia, rendimiento y nivel de producción, éstos constituyeron la base de la selección para su posterior escalamiento. Se realizaron análisis estadísticos, y fundamentándose en ellos así como el costo del proceso, se seleccionó a la cepa HD-1 en el medio de melaza. La producción del bioinsecticida a nivel fermentador de 14 litros, corroboró lo obtenido a nivel matraz determinándose además un  $KL_a$  de  $31.48h^{-1}$ , y un  $QO_2$  de  $0.1162gO_2/l/h$ , correspondientes a la aereación de 0.75VVM y agitación de 500r.p.m. De acuerdo a lo anterior se deduce: 1)La actividad tóxica recuperada utilizando el método de lactosa-acetona fue del 80 % y siguiendo el método de caldo recuperado esta fue superada a la reportada hace 15 años. 2)La producción obtenida a nivel matraz y fermentador fue igualada a la reportada. 3)La toxicidad del extracto se mantiene incluso a pH de 8.0, sin mostrar diferencias, 4)Se logro disminuir la dextrosa de 30 a 1.5g/l y harina de soya de 30 a 20g/l sin observarse diferencias de toxicidad en ambos casos y consumiéndose el 85% de la fuente de carbono. 5)Se encontró un medio de cultivo constituido por melaza, adecuado para su producción a nivel industrial sin afectar la toxicidad, ni los parámetros de producción y 6)Se determinó que la bacteria requiere un bajo consumo de oxígeno y ello se confirma con los valores de  $KL_a$  y  $QO_2$  obtenidos.

## ABSTRACT

It was review the International Bacilli Collection Entomopatogen, certified by 3,000 extracts of *Bacillus thuringiensis* originating from the strain HD and 500 of the strain GM, where was observed that the most toxic against the plague insects *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* they proceed of the strain HD. They were selected and evaluated 7 extracts, selected the strain HD-1 and HD-73 as candidate due to the fact that your toxicity had stayed throughout 15 years, both were cultivated in 14 means of cultivation, where, as source of carbon were; molasses or dextrose, as nitrogen; flour of soya and the cofactores liquid of corn soaking. It was determined; utilization of the source of carbon, pH, production, toxicity, potency, yield and production level, constituted this the base of the selection for its subsequent climbing. They were accomplished statistic analysis, and being based on them and to the cost of the process, was selected to the strain HD-1 in the medium of molasses. The production process of the bioinsecticide at level fermenter of 14 liters, corroborated obtained what is at flask level being determined furthermore a  $KL_a$  to of  $31.48h^{-1}$ , and  $QO_2$  of  $0.1162gO_2/l/h$ , corresponding to the aeration of  $0.75VVM$  and agitation of  $500r.p.m$ . According to the foregoing is deduced: 1)The recovered toxic activity using the method lactose-acetone was of the 80 % and continuing the broth method recovered this was surpassed to the reported makes 15 years. 2)The production obtained at flask level and fermenter it was evened to what is reported. 3)The pH (8.0) did not affect the toxicity of the extract. 4)Be achievement reduced the dextrose of 30 to 1.5g/l and flour of soya from 30 to 20g/l without be observed differences of toxicity in either case and being consumed a 85% of the source of carbon. 5)Was found a medium of cultivation in base molasses, adapted for its production at industrial level that it does not affect the toxicity neither the production parameters and 6)Is determined that the bacteria requires a under oxygen consumption and this is confirmed with the values of  $KL_a$  to, and  $QO_2$  obtained.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas de contaminación que sufre nuestro ambiente es causado por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos. El control biológico es una buena alternativa, éste a sido definido como: el uso de microorganismos naturales o modificados, genes o productos de ellos para reducir el efecto de organismos indeseables (plagas) a favor de insectos benéficos y microorganismos; ofrece una amplia gama de posibilidades para el manejo de plagas incluyéndose el uso de predadores, parásitos y patógenos (Falcón, 1981). Entre las plagas más devastadoras de nuestro país destaca la del gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*) que ataca 22 especies de cultivo, así como el gusano bellotero (*Heliothis virescens*) principal plaga del algodón. (Malcalf, 1982, Rodríguez, 1991).

Hoy en día se conocen alrededor de 100 bacterias entomopatógenas y solamente se han desarrollado como bioinsecticidas microorganismos pertenecientes al género de *Bacillus* (Hofte, 1989): *B. popillae*, *B. sphaericus*, *B. lentimorbus*, *B. moritai* y principalmente *Bacillus thuringiensis*, el cual representa el 1 % de todos los insecticidas producidos mundialmente. (Deacon, 1983).

La biotecnología por su parte presenta nuevas estrategias o actualiza otras ya existentes como en el caso del uso de bioplaguicidas producidas por *Bacillus thuringiensis*, estas se basan en la búsqueda de nuevas cepas y/o el mejoramiento genético de las mismas, con el fin de que presenten una nueva actividad insecticida, así como los estudios de procesamiento a escala industrial que permitan conservar la actividad de la cepa con un mejor rendimiento de producción y el mejoramiento de formulaciones para aumentar su efectividad. Sobre esta bacteria se han realizado una gran cantidad de aislamientos (En 1982 el Departamento de Agricultura de U. S. A. reportó la existencia de alrededor de 766 cepas clave HD procedentes de diferentes fuentes como: suelo, insectos, granos, etc. (Galán, 1982, 1993 y Rowe, 1987) y con las cepas más tóxicas se han efectuado fermentaciones donde se ha analizado el comportamiento empleando diversos medios de cultivo, que permitan la eficientización de la cepa.

Los extractos a estudiados han sido almacenados por mucho tiempo (alrededor de veinte años los cuales fueron efectuados y donados por el Dr. Howard T. Dulmage del Departamento de Agricultura de E. U. A., Weslaco, Texas a la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L.), desconociéndose hasta la fecha la actividad que presentan, si es que ha permanecido. Por lo anterior nos hemos planteado lo siguiente:

## HIPÓTESIS

Es posible recuperar cepas de *Bacillus thuringiensis* clave HD, de extractos de fermentación almacenados, que sean tóxicos contra *Trichoplusia ni* (Hüber) y *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidóptera Noctuidae), que muestren una actividad igual o superior a las cepas comerciales.

## OBJETIVOS

1. Seleccionar una cepa de *Bacillus thuringiensis* clave HD, a partir de extractos almacenados para el control biológico de *T. ni* y *H. virescens*.
2. Optimización de medio del cultivo y parámetros de fermentación para la cepa seleccionada, además de evaluación de la actividad de la  $\delta$ -endotoxina recuperada.

# ANTECEDENTES

## 2.1 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico, se inició a finales del siglo pasado con el uso de algunos predadores y parásitos de insectos. Pero fué hasta finales de los años 30 que se utilizó exitosamente el virus de la polihedrosis nuclear (VPN) para el control del diprionido *Gilpinia hercyniae* en Canadá (Benz, 1986).

Los entomopatógenos pertenecen a cuatro grupos: virus, protozoarios, hongos y bacterias. Cerca de 1,500 especies han sido descritas con alto potencial para el manejo de poblaciones de insectos plaga en áreas agrícolas, forestales, ornamentales y salud (Ignoffo e Hink, 1971). Se incluyen alrededor de 750 especies de hongos, 700 virus, 300 protozoarios y casi 100 especies de bacterias aisladas de insectos. Estos se han utilizado en las siguientes formas i) Introducción y establecimiento permanente para formar un factor de mortalidad perpetua, ii) Aplicación periódica en forma inundativa o inoculativa para el control temporal de insectos <sup>1</sup> y iii) Manipulación ambiental, la cual implica la incorporación de epizooticos naturales en el manejo integral de insectos plaga y en el mejoramiento, así como el aumento de estos epizooticos naturales por otros métodos aparte de la agregación directa a patógenos ya presentes naturalmente. Lo anterior muestra como el control biológico se lleva a cabo en la actualidad.

### 2.1.1 INSECTICIDAS VÍRALES

Existe una gran variedad de virus patógenos de insectos; entre los que destaca, el virus de la polihedrosis nuclear (VPN) y en menor medida los virus de la granulosis (VG), ambos pertenecen a la familia Baculoviridae, son virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tienen forma de bastón o varilla, envueltos por su cápside en forma granular o poliédrica. Hasta el momento se han descubierto cientos de estos virus, pero sólo aquellos que atacan a Lepidópteros (83%), Hymenoptera (10%) y Díptera (4%), son los que se utilizan o están en proceso de desarrollo como bioinsecticidas (Blissard y Rohrmann, 1990); estos datos reflejan la intensidad de las investigaciones de estos grupos de virus (Ignoffo, 1974). Lo cual se debe al alto grado de especificidad y al nulo peligro contra organismos no blanco. En Estados Unidos de Norteamérica tres virus han sido registrados, todos ellos miembros de VPN que atacan a *Heliothis zea*, *Orgyia pseudotsugata* y *Porthetris dispar*. Todos son parásitos intracelulares obligados y solamente pueden crecer en células vivas, solo se reproducen en las larvas hospederas o en cultivos de células, razón por la cual se limita el interés comercial para su

---

<sup>1</sup>a. Inundativo: Los entomopatógenos liberados son agentes de mortalidad mientras que la progenie de estos entomopatógenos no va a infectar los insectos.

b. Inoculativo: Se hacen las liberaciones de entomopatógenos periódicamente, está limitada en una estación (Nordlund, 1984).



desarrollo como insecticidas microbianos, excepto aquellos que atacan plagas de particular importancia o que presentan un amplio rango de hospedero (Sherman, 1985). En el futuro los virus se podrán producir *in vitro*, en grandes cultivos de células, pero hasta el momento esto no se puede realizar a nivel industrial (Granados y col., 1987). Otra razón por la que los insecticidas vírales no han mostrado gran éxito comercial es que tienen que competir con los insecticidas químicos. Por ejemplo en los 70's se utilizaron para el control de *Heliothis*, pero al compararse con los piretroides que eran más baratos y presentaban la misma eficiencia se desacreditaron (Ignoffo y Couch, 1981). Es de esperarse que mientras existan materiales más baratos (como algunos insecticidas químicos o *B. thuringiensis*) los virus con mayor potencialidad de ser utilizados a corto plazo sean aquéllos que controlen las plagas más importantes, para las cuales los insecticidas químicos o *B. thuringiensis* no estén disponibles, o bien através del desarrollo de virus recombinantes que aniquilen a los insectos más rápidamente y que tengan un rango hospedero más amplio. Se concluye que los virus se encuentran en su etapa de desarrollo.

### 2.1.2 PROTOZOARIOS COMO INSECTICIDAS

Estos microorganismos tienen un potencial limitado como insecticidas microbianos de acción rápida a corto plazo, debido a la producción masiva del hospedero vivo, que impone un límite sobre el bajo costo y la cría masiva de estos organismos entomopatógenos; y a que la densidad de la plaga es muy alta y es necesario bajar la población de manera rápida, sin embargo los protozoarios no actúan con rapidez suficiente para impedir el daño de la plaga al cultivo (Baddi, 1993). La mayoría de los protozoarios considerados como potenciales bioinsecticidas son microsporidios. Sus esporas infectan al hospedero a través de la ingestión y, una vez en el intestino, las esporas proyectan un largo tubo que inyecta el núcleo del patógeno en los tejidos internos del hospedero. Estos se multiplican en el citoplasma y gradualmente se dispersa por todos los tejidos del hospedero, causando enfermedades crónicas que pueden matar o no al hospedero (Roberts y col., 1991). Un ejemplo es la utilización de *Nosema locustae* en Estados Unidos para el control de chapulines que redujo el 34.5% de la población (Carter, 1976). La reducción presenta un rango del 40 al 60% en el transcurso de varias semanas, con un costo bajo, en comparación con otros medios de control (Brooks, 1988). Por lo anterior concluimos que los protozoarios de forma global son solo útiles en contra de ciertos insectos.

### 2.1.3 HONGOS COMO INSECTICIDAS

Las unidades infecciosas de los hongos son las conidias, las cuales caen en la cutícula del insecto y germinan. La hifa penetra la cutícula para colonizar al hospedero, donde se desarrolla el micelio profuso dentro de éste. La muerte ocurre aproximadamente en dos días, particularmente en aquellas cepas que secretan toxinas; sin embargo, en muchas ocasiones el

período de infección es más largo (St. Leger y col., 1992). Los candidatos fúngicos como *Bauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, son hongos imperfectos que tienen dos ventajas sobre *B. thuringiensis* y los virus, muchas de las cepas o aislados tienen un rango hospedero más amplio e infectan a su hospedero por invasión a través de la cutícula de tal forma que estos pueden atacar áfidos y chicharritas, además de larvas de Lepidópteros, Coleópteros y otros insectos masticadores (Roberts y col., 1991). La mayoría de los hongos se pueden producir en medios artificiales, la principal limitación es que el control efectivo en el campo requiere normalmente de varios kilos de bioinsecticidas por hectárea y para producir un kilo de conidias se necesitan aproximadamente 25 kilos de sustrato, el cual normalmente es producido a base de granos de cereales. Los hongos pueden crecer en fermentadores con cultivos líquidos, pero el resultado es la producción de blastosporas con paredes más delgadas son menos viables que las conidias, además la vida de anaquel es baja comparada con *B. thuringiensis* y los virus. En la actualidad los hongos presentan gran potencialidad en los ambientes protegidos, como los cultivos de invernadero, o bien regiones tropicales y subtropicales. *Verticillium lecani* es utilizado en los invernaderos de Gran Bretaña con el se han obtenido excelentes resultados. Por otra parte el mejor productor de hongos es Brasil, cuya producción se enfoca hacia la muscardina verde, *Metarhizium anisopliae*, para el control de salivazos en caña y pasto (McCoy y col., 1988).

#### 2.1.4 INSECTICIDAS BACTERIANOS

Cientos de especies de bacterias están asociadas con insectos (Galán y col., 1993). En 1960, Buchner, dividió las bacterias entomopatógenas en tres grupos obligatorio, facultativo y potencial. Por su parte Falcón en 1971, las caracterizó en dos: formadoras de esporas y no formadoras de esporas; en el primer grupo se encuentran especies obligatorias y muchas facultativas, en el segundo sólo una especie completamente facultativa y todas las especies potenciales. Las bacterias de mayor importancia se encuentran en el orden *Eubacterial*, específicamente en la familia bacillacea y en el género *Bacillus*; de ellas, las más utilizadas como insecticidas microbianos son las especies *B. popillae*, *B. sphaericus*, *B. morati* y *B. thuringiensis*. El éxito relativo de *B. thuringiensis*, comparado al de otros patógenos, se debe a la acción rápida y a la posibilidad de producirlo *in vitro* en forma industrial, además, las células esporuladas y los cristales son fáciles de formular, se utilizan en la actualidad materiales como ligninas, pectinas, celulosa, greda, almidón, etc. ya que en ellas se ha observado prolongación de la vida de anaquel, además se puede aplicar por métodos convencionales y muchas de formulaciones comerciales son competitivas en costo con relación a los insecticidas químicos (Lambert y Peferoen, 1992), lo cual indica que su utilización en la vida cotidiana está cobrando interés y que en un futuro no lejano será la mejor solución en el control de plagas debido a las ventajas que presenta, así como a los resultados obtenidos en la investigación, los cuales confirman lo dicho. Los productos comerciales utilizados para el control biológico a nivel mundial se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Insecticidas microbianos disponibles en el mercado mundial.

GRUPO	ORGANISMO	PRODUCTO
Virus	<i>Virus de la Poliedrosis Nuclear</i>	Elcar, Gypchek, Virin-Ensh, Virin-EKS, Virin-HS, Virin-Diprion, Virin-KHS, Virin-LS, Manestrin, Monisarmio-virua, TM-Buocontrol, Virox, Menestrin*, Spodoterin*, VPN 80, VPN 82, Hifantrin, Virin-ABB, Virin-GYAP, Virin-OS, Carpovirusine*.
	<i>Virus de la Poliedrosis Citoplasmática</i>	VPC
Bacterias	<i>Bacillus popilliae</i>	Doom, Japademic, Milky Spore.
	<i>Bacillus sphaericus</i>	ABC-6185, 2362*.
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dipel, Javelin, Thuricide, Bactospeine, Bathurin, BIP, Enterobacterin-3, Bitoksibacillín, Exotoksí, Gomelín, Insektín, Lepidocin, Thuríngin, Bactokulicid, Bacillan, Thuridán, Thurindhgín, Turintoks, Biotrol, Baktutal, Dendrobacillín, M-1, Foil, Larvo-Bt, Biobit, Bactimos, Teknar, Vectobac, Moskitur, Foray, Delfin, Condor, Cutlass, MVP, Certan, Skeetal, Teknar, Vectobac, M-One, M-One Plus*, Trident, Novodor, Foil.
Hongos	<i>Bauveria bassiana</i>	Biotrol FBB, Boverin, Boverol, Boverosil, ABC-6178.
	<i>Hirsutella thompsoni</i>	Mycar
	<i>Metharhizium anisopliae</i>	Biotrol-FMA, Mataquino, Metarrhizin.
	<i>Verticillium teceanii</i>	Vertelpac, Mycotol, Verticillín, Verticón.
	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Peocilomín
Protozoarios	<i>Nosema locustae</i>	Hopper Stopper
Nemátodos	<i>S. feltiae</i>	Seek, Spear, Neocide, Crop Patrol, Pest Patrol.

Nota: \* Productos en fase experimental.

## 2.2 RESEÑA HISTÓRICA DE *Bacillus thuringiensis*

A principios de siglo fué aislado por primera vez *Bacillus thuringiensis*, por el japonés Ishiwata quien lo obtuvo del gusano de seda (*Bombix mori*). Posteriormente en 1915 el alemán Berliner, aisló de la misma manera esta bacteria apartir de larvas de la palomilla del mediterráneo *Anagasta kuehniella*, a la cual denominó *Bacillus thuringiensis* por Thuringia, región alemana (Miltenburger, 1984). Aoki y Chigasaki en 1915, demostraron que viejos cultivos de *Bacillus sotto* contenían un componente que causaba la muerte en insectos y quienes consideraban que la rápida toxicidad era debido a alguna toxina (Krieg, 1984 y Pendleton, 1969).

En 1927, Mattes confirmó lo expuesto por Berliner, ambos hicieron observaciones importantes mientras las células vegetativas crecían y esporulaban, producían además de la espora oval, un segundo cuerpo nombrándolo cuerpo de desecho o "Restekörper", también observaron cambios en la posición de la espora (Aizawai, 1980 y Dulmage y col., 1980). A finales de los años 30's aparece el primer producto comercial a base de *Bacillus thuringiensis* con el nombre de Sporaine, en París, Francia (Norris, 1978).

A mediados de siglo en Estados Unidos, Stainhaus realizó pruebas con 51 cepas de *B. thuringiensis* de las cuales 11 resultaron ser tóxicas para el gusano de la alfalfa (*Colia eurithemeen*) estas publicaciones propiciaron la aplicación y explotación comercial de dicha bacteria (Dulmage, 1989). Por su parte Hannay, observó cristales en forma de diamantes libres del esporangio en preparaciones de cultivos esporulados de *B. thuringiensis*, refiriéndose a éstos como un cuerpo paraesporal, confirmado por la microscopía electrónica, además sugiere que los cristales al encontrarse en el intestino medio, están conectados con la formación de una toxina que induce a la septicemia en larvas (Faust y Bulla, 1982). Por esas fechas Angus sugiere una relación entre el cristal y la patogenicidad hacia el insecto; demostrando que la toxicidad en el insecto está principalmente asociada con la inclusión cristalina del bacilo y requiere ser solubilizada en álcali diluido o jugo intestinal del insecto para ser activo (Burges, 1986). Conjuntamente con Fitz-James determinaron que los cristales presentes en la bacteria se conforman en su mayoría por proteínas y la ingestión de dicho cristal por larvas de insectos Lepidópteros causa la muerte (Prasad, 1976). A finales de esta década aparecen productos comerciales de *Bacillus thuringiensis* como: "Thuricide" lanzado por la International Mineral and Chemical Corp. (1957), "Celita" (1958) y "Biotrol" por Nutrilte Prod. Inc. (1959) a excepción del segundo presentaron poca estabilidad en el mercado (Hernández, 1984). Por su parte Heimpel y Angus (1958-59) realizaron una clasificación de bacterias formadoras de cristal en base a las pruebas morfológicas y bioquímicas (Dulmage, 1973 y Heimpel y Angus, 1963).

En 1969 H. T. Dulmage aisló del gusano rosado *Pectinophora gossypiella*, una cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*, que resultó 20 a 200 veces más tóxica entre las cepas existentes, a la que denominó HD-1, la cual es comercializada como "Dipel" por la compañía Abbot en Estados Unidos de Norteamérica (Beegle, 1979; Couch y Ross, 1980, Dulmage, 1970 y 1973 y Norris, 1978).

En 1962, los descubrimientos de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* y los intentos por clasificarlos continuaron y en este año de Barjac y Bonnefoi hicieron un estudio con 24 cepas formadoras de cristal utilizando pruebas bioquímicas y serológicas, la clasificación serológica basándose en la determinación del antígeno flagelar específico a cada variedad (Beegle, 1979 y de Barjac, 1962). Años después (1968) se crea el Centro Internacional de *Bacillus thuringiensis* dependiente de la Organización Internacional del Control Biológico en París, Francia (Galán, 1993).

A principios de los 70's se presentan dos grandes avances obtenidos por H. T. Dulmage, el primero, basado en la precipitación con lactosa-acetona para la producción de polvos

humectables se desarrolló y adaptó rápidamente en la industria, y el método para la determinación de Unidades Internacionales de Potencia (UIP), utilizando un estándar lo cual permitió una rápida expansión comercial de insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Dulmage y Correa, 1970; Dulmage, 1973 y 1976, y Krieg y Langenbruch, 1981).

En 1976 el descubrimiento de la variedad *israelensis*, la cual presenta un cristal amorfo y correspondiendo a un nuevo serotipo H-14 (Barak, 1988; de Barjac, 1978 y Goldberg, 1980), presentando gran toxicidad para los mosquitos (Dípteros) y mosca negra (Simulidae). Así como el aislamiento de las variedades *tenebrionis* y *san diego* pertenecientes a la subespecie *morrisoni*, las cuales son tóxicas para escarabajos (Coleópteros) (Krieg y col., 1983 y 1984).

En 1990, de Barjac y Frachon informan sobre la clasificación de *B. thuringiensis*, basados en el antígeno flagelar H, reportando 45 serotipos (Cuadro 1) que distinguen a 54 serovarietades (de Barjac, 1990). En el mismo año Rodríguez y Galán, recuperan dos nuevas subespecies denominadas *neolonensis* serotipo H-24, la cual presenta un cristal triangular y carente de actividad tóxica para Lepidópteros y Dípteros (Rodríguez, 1990) y la variedad *mexicanensis* correspondiente al serotipo H 8a8b subsp. *morrisoni*, con cristal rectangular (Galán, 1990).

### 2.3 MORFOLOGÍA DE *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria aeróbica esporogénica, del grupo I, gram positiva, de 2 a 5 por 1  $\mu\text{m}$ , se divide por fisión binaria, frecuentemente se encuentra en cadenas, presenta flagelos peritricos (Sebasta, 1969) a excepción de un biotipo (de Barjac, 1990), saprófita del suelo, facultativamente parásita de los insectos (Herrnstadt, 1986 y Krieg, 1984), la cual se caracteriza por la formación de cuerpos paraesporales proteicos, sus cristales se liberan al exterior después de la lisis de la pared celular. El cristal glicoprotéico de algunas especies esta integrado por diferentes proteínas siendo la  $\delta$ -endotoxina la más importante (Lüthy, 1980). La mayoría de estas proteínas son protoxinas de aproximadamente 135 Kilodaltons, las cuales se digieren parcialmente por proteasas digestivas del insecto y dan lugar a toxinas activas de entre 60 y 70 Kilodaltons. Las toxinas son generadas en el intestino del organismo susceptible, pueden variar en forma y tamaño (Herrnstadt, 1986; Knowels y Ellar, 1987 y Krieg, 1984). Las especies plagas susceptibles a estos cristales se muestran en el cuadro 2, los cuales son Lepidópteros (Hofte, 1989), Dípteros (Aizawai, 1978 y Stanbury, 1984), Coleópteros (Herrnstadt, 1986 y Krieg, 1984), Nemátodos (Meadows, 1990), protozoarios (Stanbury, 1984) y células tumorales (Prasad, 1976).

La clasificación de *Bacillus thuringiensis* está basada en el antígeno flagelar, complementadas con pruebas bioquímicas para determinar las variedades, ésta fué propuesta por de Barjac apartir de 1976.

**Cuadro 2.** Clasificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* de acuerdo al serotipo H

SEROTIPO	SUBESPECIE	PRIMERA DESCRIPCIÓN VALIDA
1	thuringiensis	Berliner, 1915; Heimpel y Angus, 1958
2	finitimus	Heimpel y Angus, 1958
3a,3c	alesti	Tourmanoff y Vago, 1951; Heimpel y Angus, 1958
3a,3b, 3c	kurstaki	De Barjac y Lemille, 1970
3a, 3d	sumiyoshiensis	Ohba & Aizawa, 1989
3a, 3d, 3e	fukuokaensis	Ohba & Aizawa, 1989
4a,4b	sotto	Ishiwata, 1905; Heimpel y Angus, 1958
4a,4c	kenyae	Bonnefoi y de Barjac, 1963
5a,5b	galleriae	Shyetsova, 1959; de Barjac y Bonnefoi, 1962
5a,5c	canadensis	De Barjac y Bonnefoi, 1972
6	entomocidus	Heimpel y Angus, 1958
7	aizawai	Bonnefoi y de Barjac, 1963
8a,8b	morrisoni	Bonnefoi y de Barjac, 1963
8a,8c	ostrinae	Gaxin, Ketian, Minghua y Wingmin, 1975
8a,8d	nigeriensis	De Barjac, Frachon, Rajagopalan y Cosmao, no publicado
9	tolwoethi	Norris, 1964; de Barjac y Bonnefoi, 1968.
10a, 10b	darmstadiensis	Krieg, de Barjac y Bonnefoi, 1968
10a, 10c	londrina	Arantes y col. (no publicado)
11a,11b	toumanoffi	Krieg, 1969
11a,11c	kyushuensis	Ohba y Aizawa, 1979
12	thompsoni	De Barjac y Thompson, 1970
13	pakistani	De Barjac, Cosmao, Shaik y Viviani, 1977
14	israelensis	De Barjac, 1978
15	dakota	De Lucca, Simonson y Larson, 1979
16	indiana	De Lucca, Simonson y Larson, 1979
17	tohokuensis	Ohba, Aizawa y Shimizu, 1981
18a, 18b	kumamotoensis	Ohba, Ono, Aizawa e Iwanami, 1981
18a, 18c	yosoo	Lee H. H. (no publicado)
19	tochigiensis	Ohba, Ono, Aizawa e Iwanami, 1981
20a,20b	yunnanensis	Wan-yu, Qi-fang, Xue-ping e You-wei, 1979
20a,20c	pondicheriensis	De Barjac, Frachon, Rajagopalan y Cosmao, no publicado
21	colmeri	De Lucca, Palmgren y de Barjac, 1984
22	shandongiensis	Ying, Jie y Xichang, 1986
23	japonensis	Ohba y Aizawa, 1986
24a, 24b	neoleonensis	Rodríguez, Galán-Wong, de Barjac, Dulmage, Taméz-Guerra y Roman Calderon, 1988
24a, 24c	novosibirsk	Burtseva, Kalmikova y col. no publicado
25	coreanensis	De Barjac y Lee, no publicado
26	silo	De Barjac y Lee, no publicado
27	mexicanensis	Rodríguez-Padilla y Galán-Wong, 1988
28a, 28b	monterrey	no publicado
28a, 28c	jegathesan	Lee L. H. (no publicado)
29	amagiensis	Ohba (no publicado)
30	medellin	Orduz, Rojas, Correa, Montoya and de Barjac, 1992
31	toguchini	Hodirev (no publicado)
32	cameroun	Jacquemard, 1990; Juarez-Perez y col. (no publicado)
33	leesis	Lee H. H. y col., 1994
34	konkukian	Lee H. H. y col., 1994
35	seoulensis	Shim (no publicado)
36	malaysiensis	Ho (no publicado)
37	andalousiensis	Santiago-Alvarez y col., (no publicado)
38	oswaldocruzi	Rabinovitch y col. (no publicado)
39	brasiliensis	Rabinovitch y col. (no publicado)
40	huazhongensis	Yu Ziniu (no publicado)
41	sooncheon	Lee H. H. (no publicado)
42	jinghongiensis	Rong Sen Li (no publicado)
43	guiyangiensis	Rong Sen Li (no publicado)
44	higo	Ohba (no publicado)
45	roskildiensis	Hinrinschen & Hansen (no publicado)

Nota: De Barjac H., E. Frachon, 1990. Classification of *B. thuringiensis* entomophaga 35: 233 - 240.



**Cuadro 3.** Clasificación de las proteínas del cristal producido por *B. thuringiensis* e insectos susceptibles.\*

Tipo de Proteína	Peso Molecular (KDa)	Huésped
CryIA(a)	133.200	L
CryIA(b)	131.000	L
CryIA(c)	133.300	L
CryIB	138.000	L
CryIC	134.800	L
CryID	132.500	L
CryIF	133.200	L
CryIG	133.600	L
CryIIA	70.900	L
CryIIB	70.800	L-D
CryIIIA	73.100	C
CryIIIB	74.237	C
CryIIIB2***	74.393	C
CryIIIC	129.400	C
CryIIID	73.300	C
CryIVA	134.400	D
CryIVB	127.800	D
CryIVC	77.800	D
CryIVD	72.400	D
CryV?	81.200	L-C
CryVA(a)**		N
CryVA(b)**		N
CryVIA**		N
CryVIB**		N
CytA	27.400	Citotóxica

Nota: \* Adaptadas de Hofte and Whiteley, 1989. El proceso molecular es dado a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica del primer gen reportado para cada una de las clases. \*\*Peso molecular no reportado. \*\*\*Donovan y col., 1992..?Apareció después de Feitelson y col., 1992.. L= Lepidópteros; C= Coleópteros; D= Dípteros y N= Nematodos.

## 2.4 TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

Hannay en 1953, asocia al cristal producido por esta bacteria; activado contra las larvas de insectos. Las toxinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* son ocho, las cuales se muestran a continuación:

1. La fosfolipasa C ( $\alpha$ -exotoxina)
2. Exotoxina termoestable ( $\beta$  -exotoxina)
3. Enzima no identificada que puede ser no tóxica ( $\tau$ -exotoxina)
4. Proteína de cristal paraesporal ( $\delta$ -endotoxina)
5. Toxina lábil
6. Toxina soluble en agua

7. Exotoxina "factor ratón"

8. La toxina *Btken-Ag*

También se considera un antibiótico bacilogénico y una proteínasa (Faust, 1982).

La habilidad que presenta *B. thuringiensis* para producir toxinas varía de una cepa a otra, dependiendo de la composición y condiciones del medio de cultivo (Dulmage y Burgerjo, 1977).

#### 2.4.1 $\alpha$ -exotoxina

También conocida como fosfolipasa C o lecitinasa, se ha estudiado en las variedades de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* (Krieg, 1969), afecta a los fosfolípidos de membrana, causando lisis y necrosis, actúa sobre la molécula de lecitina con la formación de un diglicérido y fosforilcolina. Estudios sobre su biosíntesis indican que aparece en la fase logarítmica de crecimiento y su actividad más alta se observa en el sobrenadante después de 10 horas de inoculación, su biosíntesis y acumulación ocurre en un rango de pH: 6.0 - 9.0. (Palacios, 1993) su punto óptimo cercano al neutro, que es el que se presenta en el intestino de los insectos. Algunas especies de *Bacillus thuringiensis* son incapaces de producir lecitinasa. Se ha encontrado susceptibilidad por algunos insectos como: *Galleria mellonella*, *Plutella maculipennis* (Faust, 1982).

#### 2.4.2 $\beta$ -exotoxina

Fué descubierta por McConell y Richards en 1959 (Cantwell, 1964). El aislamiento y caracterización preliminar de la beta exotoxina los condujeron de Barjac y Dedonder (1965 - 1968) a partir del serotipo H-1 (Lecandt, 1975). Farkas en 1969, propone que la estructura química de la toxina está compuesta por adenina, ribosa, glucosa y ácido alárico con un grupo fosfato, con un peso total del compuesto de 700 Da (Farkas, 1976). Confirmándose esto con estudios de resonancia magnética nuclear (Carberg, 1973). Su espectro de absorción ultravioleta presenta un máximo a 260 nm y mínimo a 230 nm. Faust en 1973 la considera como un producto extracelular, dializable, soluble en agua y termoestable a 120°C por 15 minutos (Faust, 1982), producida en la fase de crecimiento exponencial (Ignoffo, 1972). Se han aislado de los serotipos: 4ac, 5, 7, 9, 10, 11, y 12 aunque su producción es menor que en el 1 (Carlberg, 1973). Una característica de esta toxina es su amplio espectro de toxicidad, que comprende los géneros: Orthoptera, Coleóptera, Lepidóptera y Díptera principalmente (Wolfenbarger, 1972), además de la mosca doméstica (Dunn, 1960).

Su modo de acción lo investigó Sebasta y Horská en 1968, quienes mostraron que la exotoxina inhibe la ARN polimerasa dependiente de *Escherichia coli* "in vitro", indicaron que dicha actividad es tóxica (de Barjac, 1976; Johnson, 1978 y Sebasta, 1968). Lam y Webster

(1972), sugieren que bajas dosis causa la aparición de individuos morfológicamente anormales (Carlberg, 1973), Panda en 1971 estudió los efectos clastogénicos en plantas confirmando sus observaciones. Sin embargo Meretoja y Carlberg (1971) (Kahlconen, 1979 y Linnainmma, 1977), Thelestam (1972) (Carlberg, 1973), Kahkonen (1979) , Cantwell (1982) y por último Marec y col. en 1989, sostienen que éste compuesto no presenta actividad genotóxica (Marec, 1989).

### 2.4.3 $\delta$ -endotoxina

Es de las toxinas más importantes producidas por *Bacillus thuringiensis* (Faust, 1982), es sintetizada en forma de protoxina durante el proceso de esporulación (idiofase) dentro de la célula vegetativa pero el mayor crecimiento ocurre durante las fases III y IV (Carlberg, 1973). Esta protoxina aparece como una inclusión cristalina, la mayoría de la veces se presenta en forma bipiramidal pero puede variar en forma y tamaño, dependiendo de los serotipos de la bacteria, es diferente en cuanto a su composición y cantidad de cadenas polipeptídicas, es termolábil y soluble en soluciones alcalinas, es hidrolizada a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales del hospedero, la susceptibilidad es dependiente de enzimas y serotipo (Faust, 1982). Yamamoto en 1981, realizó estudios bioquímicos del cristal y obtuvo péptidos de diferentes pesos moleculares un péptido de 135 Kda denominado P-1, el cual fue tóxico para Lepidópteros, y otro de 65 Kda denominado P-2, el cual atacó a dípteros, además de Lepidópteros (Rowe, 1987 y Youn, 1970), Butkoen en 1994, estudió la interacción de la  $\delta$ -endotoxina en las vesículas de fosfolípidos, indicó que la toxina se disipa por difusión a través de la membrana vesicular creando poros o canales permeables, dependiendo de las condiciones ácidas . El cuerpo paraesporal representa aproximadamente 1/3 del tamaño de la espora, esta es una característica constante en las especies de *B. thuringiensis* y única diferencia entre éste y *B. cereus* (Lüthy, 1980).

Su mecanismo de acción es sobre la superficie de las células epiteliales del intestino, interactuando con lípidos específicos y provocando un efecto similar a sustancias tensoactivas (detergentes), rompe la membrana celular y causa citolisis (Faust, 1980). En 1982 Hofte, sugiere que la toxina induce la formación de poros en la membrana de las células epiteliales del intestino del insecto (Hofte, 1982) éstos cambios fisiológicos ocasionan que el insecto deje de alimentarse y muera (Faust, 1982). En el cuadro 4 se muestran los cultivos que son principalmente atacados por *T. ni* y *H. virescens*, y para los cuales se han obtenido excelentes resultados.

Numerosos trabajos de genética se han desarrollado sobre la identificación de las proteínas del cristal, estructura de las mismas, así como los genes que las codifican. Se sugieren 13 genes denominados Cry, los cuales han sido divididos en cuatro clases y varias subclases. En base a las características estructurales y de toxicidad, atacando Lepidópteros (I), Dípteros y Lepidópteros (II), Coleópteros (III) y Dípteros (IV) (Hofte, 1989). Por otra parte Krieg y col. en 1987, presenta 3 patotipos: a) patotipo A, patógenos para Lepidópteros, b) patotipo B, patógenos contra Dípteros y c) patógenos para Coleópteros (Krieg, 1987 y Rowe, 1987).

**Cuadro 4.** Cultivo afectados por *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens* susceptibles de ser controlados por *Bacillus thuringiensis*

Insecto Lepidóptero Plaga	Nombre Común	Cultivo
<i>Trichoplusia ni</i>	Gusano falso medidor	Ajonjolí,
		Algodón
		Brócoli
		Cartamo
		Col
		Chícharo
		Chile
		Espinaca
		Fresa
		Melón
		Pepino
		Sandía
		Soya
		Jitomate
Perejil		
<i>Heliothis virescens</i>	Gusano del fruto	Tabaco
		Jitomate
		Garbanzo
		Tabaco

Los insecticidas producidos a base de *B. thuringiensis* como principio activo, se muestran en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Formulaciones comerciales a partir de *Bacillus thuringiensis*.

Nombre comercial	Compañía
<b>Beta exotoxina</b>	
Biotoksylbacillin	All Union Inst. Agr. Microbiol. (URSS)
Eksotoksin	Glavmikrobioprom (URSS)
Toxobakterin	Glavmikrobioprom (URSS)
<b>Delta endotoxina</b>	
Agritol	Merck & Co. (USA)
Baxthane	Rohm & Hass (USA)
Bactospeine	Roger Bellon (Francia)
Bathurin	Chemapol-Biokyma (Checoslovaquia)
Biospor	Farbwerke Hoechst (Alemania)
Biotrol BTB	Nutrilite Prod (USA)
Dendrobacillin	Glavmikrobioprom (USA)
Dipel	Abbott Labs. (USA)
Entobacterin	Glavmikrobioprom (USA)
Insektin	Glavmikrobioprom (USA)
Parasporin	Grain Proc. Lab. (USA)
Sporeine	LIBEC Laboratorie (Francia)
Thuynciede	Sandoz-Inc (USA)

## 2.5 METABOLISMO DE *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* presenta un comportamiento metabólico complejo y algunos aspectos hasta la fecha son desconocidos. Su metabolismo básico es siguiendo las rutas: de la glucólisis, ciclo de Krebs y ciclo de glioxicolato (Rowe, 1987). Rowe en 1990, demostró que las rutas de la valina, leucina e isoleucina funcionan como una unidad anfibólica de manera íntegra y ordenada. El metabolismo seguido por *B. thuringiensis* se describe en tres pasos crecimiento vegetativo, fase de transición y por último la etapa de esporulación.

### 2.5.1 Crecimiento vegetativo

Es realizado a base de carbohidratos (Freese, 1976), aunque hay evidencias de que además ocurra catabolización de aminoácidos (Anderson, 1990; Rowe, 1990 y Sakarova, 1984). El consumo de carbohidratos se realiza en un 93 -100% mediante la ruta de Embden-Meyer-Parnas (EMP) y en escasas ocasiones se presenta la vía de pentosas fosfato, el comportamiento seguido se muestra en la figura 1 (Anderson, 1990 y Nickerson, 1974), donde se ha observado que el lactato es el metabolito que se produce en mayor proporción (Anderson, 1990). Otros reportes indican que existe un consumo simultáneo de carbohidratos y aminoácidos para la biosíntesis y obtención de energía, en este caso se acumula como producto mayoritario el acetato (Rowe, 1990). Sakharova y col. en 1984, fueron los primeros en reportar el crecimiento de *B. thuringiensis* variedad *galleriae* usando a los aminoácidos (medio a base de extracto de levaduras) como fuente de carbono (Sakharova, 1984). Existen numerosos trabajos de los medios donde se desarrolla *B. thuringiensis* entre ellos destaca materias primas de bajo costo como melaza y harina de camarón.

### 2.5.2 Metabolismo de nitrógeno

Es complejo y en su mayoría desconocido, éste se puede asimilar en forma de amonio o aminoácidos, las principales vías de asimilación pueden ser mediadas por las enzimas: alanina deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, glutamato sintetasa y glutamina sintetasa (figura 2) las dos primeras son consideradas las más importantes, ya que las células vegetativas y esporas presentan altas concentraciones de glutamato y alanina, en un 60% o más de aminoácidos libres. Posteriormente actúan como donadores de nitrógeno a otros metabolitos por vía transaminación (Arosón, 1976).

Figura 1. Comportamiento seguido por la bacteria durante la etapa de crecimiento vegetativo los números equivalen a la cantidad en micromoles requeridos.

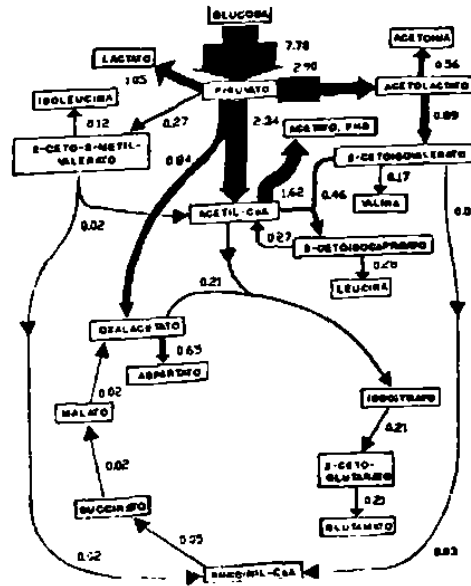
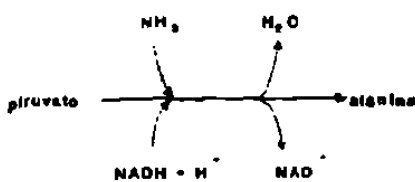
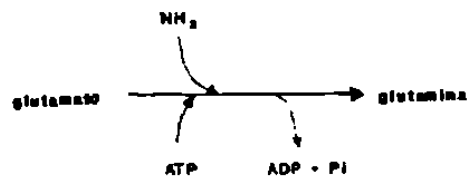


Figura 2. Rutas de aminoácidos seguidas por *Bacillus thuringiensis*

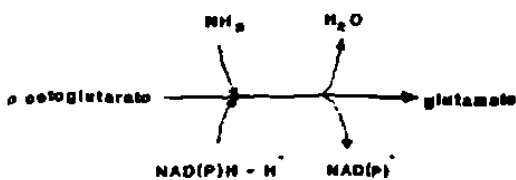
ALANINA DESHIDROGENASA (EC 1.4.1.1)



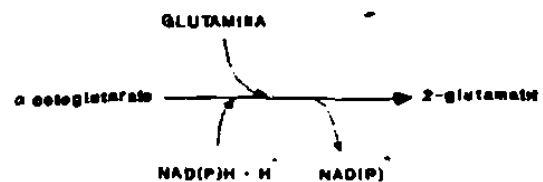
GLUTAMINA SINTETASA (EC 6.3.1.2)



GLUTAMATO DESHIDROGENASA (EC 1.4.1.2)



GLUTAMATO SINTASA (EC. 1.4.1.3)









mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  7.5 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.5 mg y  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  40 mg en litro de agua destilada (Dubois, 1968).

Dulmage en 1970, reportó el aislamiento de *B. thuringiensis* HD-1 var. *kurstaki*, en un medio de dextrosa 5.0 g, extracto de levadura 2.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g, harina de semilla de algodón 1.0 g y harina de soya 1.0 g por litro de agua destilada, con ello se obtuvieron altos niveles de producción de  $\delta$ -endotoxina (Dulmage, 1970). Otros de los medios probados por Dulmage en 1971, fueron aquellos en los que utilizaron distintas fuentes de carbono y nitrógeno tales como triptona, proflo, harina de soya, algodón de maíz, extracto de levadura y bactopectona. En 3 especies de *B. thuringiensis* una de la variedad *alesti* (serotipo 3a) y dos de la variedad *kurstaki* (serotipo 3a, 2b), se observó que la producción de  $\delta$ -endotoxina y la actividad insecticida varía ampliamente dependiendo del serotipo y medio en cual se desarrolla (Dulmage, 1971).

Las materias primas han sido tan variadas que Nagama y col., reportan un medio de cultivo sólido que consiste en nuez molida y polvo de médula de tamarindo con el propósito de obtener un producto con alto nivel de esporulación (Salama, 1990).

Dulmage y de Barjac, en 1973, utilizaron un aislado de *B. thuringiensis* HD-187 serotipo 5 (5a5b), el cual produce rendimiento superior a los anteriores de  $\delta$ -endotoxina, al utilizar tres medios cuya composición es la siguiente: todos contienen en común peptona 0.2 %, glucosa 1.5 %, extracto de levadura 0.2 % y sales minerales, el denominado medio B-4 contiene además harina de semilla de algodón al 1 %, el B-4b al 2 % y por último el B-8 al 2 % además de líquido de remojo de maíz por litro de agua destilada. El producto obtenido tuvo una actividad de  $2 \times 10^9$  Unidades Internacionales (UI) por litro de caldo cosechado y el producto presentó una potencia de 200,000 UI/mg (Dulmage y de Barjac, 1973).

Scherrer y col. en 1973, estudiaron concentraciones de 0.1 a 0.6 % de glucosa en un medio que contenía extracto de levadura y sales, observaron que la longitud del cristal presentando un incremento de 0.2 a  $0.5 \mu\text{m}$ , sin afectar el tamaño de la espora y toxicidad (Scherrer, 1973).

En 1980 Couch y Ross, recomendaron la utilización de productos naturales como productos de maíz hidrolizados, almidón y dextrosa como fuente de carbono y como nitrógeno líquido de remojo de maíz, levadura autolizada, harina de pescado, harina de semilla de algodón, harina de soya y caseína, con los cuales se puede reducir el costo del medio (Couch, 1980).

Por su parte Golberg y col. en 1980, optimizaron un medio de cultivo a escala semipiloto en fermentadores de 500 litros de capacidad con glucosa 30.0 g, peptona de soya 20.0 g, extracto de levaduras 4.5 g, líquido de remojo de maíz 5.0 ml y sales minerales KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  por litro de agua destilada, las condiciones del proceso fueron las siguientes

temperatura 32°C, aireación 0.3 VVM, agitación de 120 a 160 rpm, pH de 6.2 a 7.4, tiempo 60h y finalmente se obtuvo una producción de  $4 \times 10^9$  UFC/ml (Golberg, 1980).

Lüthy y Ebersold en 1981, utilizaron un medio formulado con ingredientes de bajo costo como: harina de soya (35.0 g/l), almidón de maíz (12.15 g/l), extracto de malta (2 g/l),  $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  (1.3 g/l),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.2 g/l),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.08 g/l) y  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.08 g/l) el pH se ajustó a 7.2 y la esporulación total se llevó a cabo en menos de 48 horas (Lüthy, 1981).

Maldonado en 1981, fué de los primeros en recuperar cepas de *B. thuringiensis* nativas de la región de Nuevo León, recuperadas de suelo a las que denominó GM, posteriormente Castro (1982) y Murga (1983), estudiaron estas cepas. Por su parte Maldonado se abocó a la cepa GM-1 observó que al cultivarse en jugo de agave y harina de soya al 1%, la potencia presentada hacia *T. ni* fué de 10,900 UI/mg (Maldonado, 1981), en 1982 se encontró que al probarse la cepa GM-1 en medio de cultivo sin  $CaCO_3$ , con melaza y jugo de agave la toxicidad hacia larvas de *S. frugiperda* fue de 44% y para *T. ni* la potencia más alta de 14,500 UI/mg (en medios con  $CaCO_3$ ), Murga estudió las cepas GM-1 y GM-2, en 14 medios donde varió la fuente de carbono, 8 con jugo de agave a 1°Brix (0.1 y 2%) y 6 con melaza al 2%, se varió además la concentración de harina de soya, líquido de remojo de maíz, agua de cocimiento de levadura (ACL),  $CaCO_3$ , y sales minerales. Se realizaron pruebas de toxicidad y se encontró que los medios que contenían harina de soya, ACL y sales presentaban valores de actividad tóxica más alta contra *T. ni* (32%) y con jugo de agave, harina de soya, ACL, y sales contra *H. virescens* (28%). La cepa GM-1 en los mismos medios presentó una actividad de 100% (Castro, 1982; Maldonado, 1981 y Murga, 1983).

Salama y col. en 1983, proponen el uso de subproductos agrícolas e industriales que incluyen harina de semilla de algodón, harina de pescado, líquido de remojo de maíz, levadura de forraje, sangre de res, subproductos secos de aves, suero de queso, semillas de leguminosas como frijol de soya, garbanzo, habas, cacahuates y lentejas. Se utilizaron medios que contenían como fuente de carbono glucosa (6.0 g/l), extracto de levadura (2.0 g/l),  $K_2HPO_4$  (4.3 g/l),  $CaCO_3$  (2.0 g/l) y sales minerales en 2 % en los que se inocularon cepas de *B. thuringiensis* variedades *kurstaki* y *entomocidus*, resultando que la mezcla de éstos productos con la levadura de forraje propició cuentas más altas de esporas con respecto a los se les añade sangre de res, en cuanto a las leguminosas, presentaron alta producción de esporas, en especial para *Entomocidus* contra *Spodoptera littoralis*. Por lo que respecta a *B. thuringiensis* es alta su toxicidad contra *Heliothis armigera* (Salama, 1983).

Arcas y col. en 1984, reporta para la cepa HD-1 un rendimiento de masa celular de 75% en almidón y glicerol (Arcas, 1984).

Dharmsthini y col. en 1985, observaron que se obtiene buena esporulación y toxicidad hacia larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* al desarrollarse *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* en un medio de subproducto hidrolizado de la factoría de glutamato monosódico al 4 y 7 %, reduciendo el costo del medio a \$ 7.05 dólar y \$ 11.67 respectivamente, lo cual hace factible el proceso comercial (Dharmsthiti, 1985).

## 2.7 RECUPERACIÓN DEL CRISTAL INSECTICIDA

La recuperación de la fracción tóxica es el paso más importante en la elaboración del bioplaguicida, en el caso de *Bacillus thuringiensis* se han utilizado las siguientes metodologías: deshidratación, liofilización, precipitación lactosa-acetona y aspersion (Galán y col., 1993).

### 2.7.1 DESHIDRATACIÓN

El proceso de deshidratación involucra la eliminación de agua, con el propósito de reducir la humedad final del ingrediente activo (cristal), esto ayuda a que no se desarrollen otros microorganismos además de hacer más eficiente el transporte y almacenamiento del producto (Barack, 1988).

### 2.7.2 LIOFILIZACIÓN

La liofilización implica la utilización de lactosa, lo cual incrementa el volumen pero su alto costo la hace inaccesible sin embargo presenta la estabilidad del complejo espora-cristal, (Betz, 1990 y Ohba, 1990).

### 2.7.3 PRECIPITACIÓN LACTOSA-ACETONA

La precipitación lactosa-acetona es la más utilizada para la extracción de *B. thuringiensis*, la cual se eficientiza más al centrifugarla antes de resuspender el sólido en solución de lactosa y posteriormente con acetona, para la obtención del complejo (Dulmage, 1970).

### 2.7.4 ASPERSIÓN

El método de aspersion consiste en una separación mecánica mediante la centrifugación seguida de un proceso térmico como el secado. Esta se adapta a fluidos con alto contenido de humedad y que presenten sensibilidad al calor (Galán, 1993; Medrano, 1987; Valenzuela, 1987 y Van, 1992).

## 2.8 PRUEBAS DE TOXICIDAD Y ESTANDARIZACIÓN

La potencia de *Bacillus thuringiensis* como un bioinsecticida puede ser determinada por varios métodos: 1) Rocket inmunológico, 2) Células de insectos, 3) Bioensayos en insectos, esta última es la forma más recomendable, ya que se realiza directamente sobre una población de insectos estandarizada (Galán, 1993).

En productos microbianos, el ingrediente activo lo constituyen las esporas y el cristal, debido a que este producto no puede ser pesado ya que la cantidad de impurezas es elevada y puede variar de una fermentación a otra, y sabiendo además que el peso de las esporas o cristales no indican la cantidad de biocida presente, es por ello que solo a través de bioensayos se puede determinar la susceptibilidad del insecto plaga en análisis y la potencia del producto.

Existen varios métodos para la realización de bioensayos, los de contacto que matan todos los estadios de insectos por exposición directa con sus superficies corporales, así como aquellos que se incluyen en la dieta para posteriormente ser ingeridos por el insecto a probar (Burges, 1971).

Sternohous y Jerrel en 1950, estimaron las siguientes características: 1) Especificar la variedad y origen del aislado utilizado, 2) Medir la actividad por medio de un bioensayo, ya que resulta inadecuada la cuenta de esporas. y 3) Estudiar la producción de la  $\delta$ -endotoxina como efecto de fermentación.

Splittstoesser y McEwen sugirieron que los bioensayos a la  $\delta$ -endotoxina podían ser mejorados si la toxina fuera administrada a los insectos-prueba incorporándola a la dieta artificial, debido a que *B. thuringiensis* actúa como insecticida estomacal que requiere ser ingerido para que se presente su actividad (Dulmage, 1970 y 1976).

En un esfuerzo por conocer las unidades más apropiadas para medir la actividad insecticida de las cepas patógenas, se vió la necesidad de compararlo con una previamente caracterizada. En Wegeningen, Holanda, se recomendó la formulación E-61 la cual contiene la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis*, que fue preparada por el Instituto Pasteur en París, Francia, y adoptada como estándar primario de referencia internacional asignándole una potencia de 1,000 Unidades Internacionales (UI/mg) (Burgeron, 1977 y Dulmage, 1971).

En 1972, en Brownville, Texas, representantes de tres productos bioinsecticidas en Estados Unidos (International Minerals and Chemical Corporation, Nutrilite Products, Inc., Agricultural and Veterinary Products Division, Abbot Laboratories) proponen la estandarización de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* mediante bioensayos contra *Trichoplusia ni* a fin de compararlo con un material estándar internacional, expresándose como Unidades Internacionales. De esta manera surge la formulación HD-1-S-1971, que fue adoptada como referencia primaria la cual presenta una potencia de 18,000 UI/mg (Burgeron, 1977; Dulmage, 1973 y 1975).

En 1980, cinco laboratorios diferentes se unieron para realizar bioensayos al producto procedente de HD-1-S-1971, y lo adoptaron bajo el nombre HD-1-S-1980 con 16,000 UI/mg de potencia, que es el estándar que rige en la actualidad (Beegle, 1979; Dulmage, 1977 y Galán, 1993).

## MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Selección de extractos

#### 3.1.1 Procedencia

La colección internacional de bacilos entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León cuenta con aproximadamente 4,000 extractos de fermentación almacenados, cerca de 3,000 de ellos corresponden a cepas HD y el resto a GM. Las condiciones de fermentación bajo las cuales se obtuvieron dichos extractos se encuentran detalladas en tarjetas de archivo. Estas condiciones incluyen parámetros de: aireación, agitación, composición del medio de cultivo, volumen utilizado, tipo de fermentador, métodos de extracción del complejo espora-cristal: precipitación lactosa-acetona, caldo recuperado y secado por aspersión, así como la actividad insecticida contra diversos insectos plaga. Actualmente los extractos se encuentran en forma de polvo seco, con diferentes tiempos de almacenamiento. Estos constituyeron la base para la selección de los extractos en esta investigación.

#### 3.1.2 Parámetros de selección

A fin de seleccionar los extractos más tóxicos se revisaron 1,215 tarjetas correspondientes a la clave HD. Actualmente depositadas en la CIE, la selección se realizó en base a las siguientes características :

- i) Que los datos de archivo sean lo más completos posibles, en cuanto a las condiciones de desarrollo del proceso y al método de obtención del extracto.
- ii) Existencia y disponibilidad del extracto.
- iii) Que presentaran valores de potencia superior al estándar comercial contra los insectos plaga designados (*Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*).
- iv) Que los valores de producción con los que se obtuvieron fueran superiores a 14 g/l , que son los índices más altos obtenidos en la planta de fermentación.
- v) Serotipo y serovariedad a la cual pertenece.
- vi) Composición del medio de cultivo utilizado.

#### 3.1.3. Extractos seleccionados

Los extractos se seleccionaron en base a los 6 lineamientos anteriores, mediante muestreo sistemático, éstos se presentan en el cuadro 10; a los mismos se les determinó la actividad insecticida actual mediante bioensayos contra los insectos plaga *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*.

## 3.2 Estudio de toxicidad de los extractos

### 3.2.1 Características del experimento

Las condiciones en que se llevó a cabo el bioensayo se muestran en el cuadro 6. Se pesaron 250 mg de extracto almacenado y se aforaron a 50ml con agua destilada para preparar la solución stock de una concentración de 5 mg/ml, se añadió además 0.1 ml de anti-espumante Dow Cornig al 20 % . De aquí se tomaron 1.25 y 12.5 ml para obtener concentraciones de 50 y 500 µg/ml respectivamente en un volumen final de 125 ml al mezclarse con dieta Shorei modificada (Cuadro 7), necesaria para el crecimiento de los insectos plaga a probar, la cual se distribuyó en 25 copas de plástico, se dejaron secar por 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se infestaron con una larva neonata del primer *instar* por copa, se cubrieron con una tapa y se introdujeron en bolsas de papel las 25 copas correspondientes a cada concentración. Se incubaron de 25 - 27°C con una humedad relativa de 55 %, por 7 días según lo establecido por Dulmage, 1970; Orlin, 1977; Moraes, 1978. Posteriormente se determinó el porcentaje de mortalidad de los extractos correspondientes. Se empleó un control positivo representado por la dieta suplementada con una concentración determinada del estándar comercial y uno negativo con la dieta y como testigo la dieta con el anti-espumante (Frost y Sullivan, 1990).

**Cuadro 6.** Condiciones experimentales en que se realizó el estudio de toxicidad de extractos.

Elementos	Valores
Extractos insecticidas	7
Dosis probadas	50 y 500 µg/ml
Insectos probados	<i>Trichoplusia ni</i> <i>Heliothis virescens</i>
Condiciones de incubación	Temperatura 30 °C Humedad relativa 55 %
Tiempo de observación	7 días
Repeticiones	3
Unidad experimental	1 copa
Tamaño de muestra	25 unidades

### 3.2.2 Determinación del índice de mortalidad

La fórmula utilizada para obtener el grado de mortalidad de acuerdo a Dulmage y col. 1970 y 1973 es la siguiente:

$$\% \text{ de Mortalidad} = ( I.M. / I.T. ) \times 100$$

Donde: I. M. = Insectos muertos

I. T. = Insectos totales



Se determinaron además el promedio de tres repeticiones, así como su correspondiente coeficiente de variación, con esto se procedió a seleccionar aquellas cepas que guardaban toxicidad después de haberse almacenado a lo largo de 15 años o más y que todavía presentaban actividad insecticida.

**Cuadro 7.** Composición de la dieta Shorei modificada.

Componentes	Cantidad (g/l)
Harina de soya	71.10
Germen de trigo	31.10
Sal Wesson	10.60
Sacarosa	13.60
Acido sórbico	1.00
Metil-d-hidroxibenzoato	1.60
Acido ascórbico	4.26
Agar-agar	15.70
Soluciones	(ml)
Acido acético al 25 %	12.00
Formalina al 10 %	4.40
Cloruro de colina al 15 %	7.30
Solución vitamínica	3.50
Agua destilada	1000.00
Solución vitamínica	
Pantoteato de calcio	12.00
Niacina	6.00
Riboflavina	3.00
Acido fólico	3.00
Tiamina	3.00
Piridoxina	1.50
Biotina	0.12
Vitamina B-12	25.00

### 3.2.3 Análisis estadístico

Los resultados de mortalidad de dichos extractos se sometieron al análisis de varianza bajo el diseño completamente al azar mediante el paquete Stat graphic 2 para una computadora personal 386 Nec/MultiSync 2A.

## 3.3 Optimización del medio de cultivo

### 3.3.1 Fuente de carbono

*Bacillus thuringiensis* lleva a cabo su crecimiento vegetativo principalmente apartir de carbohidratos, el metabolismo de azucares es por la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

fluctuando entre el 93 y 100 % según Nickerson, 1974 y Anderson, 1990. Se ha observado una marcada preferencia por las hexosas es por ello que se eligió a la dextrosa y melaza como fuentes de carbono, la primera, debido a que originalmente el extracto fué producido en esa fuente y la segunda, por que es una materia prima disponible en la región, se han obtenido buenos resultados y además es sumamente económica (Palacios, 1993; Galán, 1993).

### 3.3.2 Fuente de nitrógeno

El metabolismo del nitrógeno es poco conocido y más complejo que el de carbohidratos. Este puede ser asimilado en forma de amonio y aminoácido, Aronson (1976) reportó que las principales vías de asimilación podrían ser mediadas por enzimas entre las que se encuentran: alanina deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, glutamato sintetasa y glutamina sintetasa. La fuente de nitrógeno estuvo representada por la harina de soya (rica en aminoácidos y otros materiales), así como los cofactores por el líquido de remojo de maíz, que contiene nitrógeno y proteínas, la proporción que se utilizaron fueron de 10 y 20 g/l respectivamente, en los medios de cultivo diseñados.

### 3.3.3 Diseño experimental

Los factores probados como fuente de carbono fueron, melaza o dextrosa, fuente de nitrógeno harina de soya y como cofactores el líquido de remojo de maíz.

**Cuadro 8.** Composición de los medios de cultivo utilizados para las cepas más tóxicas de la colección.

CLAVE DEL MEDIO	MELAZA (g/l)	DEXTROSA (g/l)	L.R.M. (g/l)	H. S. (g/l)
E- 1	20	-	10	20
E- 2	-	1.5	20	10
E- 3	30	-	15	15
E- 4	20	-	10	15
E- 5	-	1.0	10	10
E- 6	10	-	10	15
E- 7	10	-	10	10
E- 8	10	-	10	20
E- 9	10	-	20	10
E-10	10	-	20	20
E-11	30	-	10	10
E-12	30	-	10	20
E-13	30	-	20	10
E-14	30	-	20	20

L.R.M. : Líquido de remojo de maíz , H.S. : Harina de soya y (g/l) : gramos por litro.

En el cuadro 8 se muestra la composición de los 14 medios de cultivo probados, los seis primeros reportados por Palacios y col.\* como adecuados, así como factibles para el desarrollo de *B. thuringiensis*, los 8 restantes proceden de un arreglo factorial de  $2^3$  utilizando 2 niveles representados por concentraciones de: a) 10 y 20 g/l y b) 10 y 30 g/l y los 3 factores corresponden a las fuentes de carbono, nitrógeno y cofactores. A los medios de cultivo se les adicionó 1 g/l de  $\text{CaCO}_3$  como amortiguador de pH.

\* : Trabajo en prensa

### **3.3.4 Selección del medio de cultivo**

#### **3.3.4.1 Activación de la cepa**

A los extractos seleccionados por el método estadístico fueron activados siguiendo la metodología propuesta por Vandekar, 1983:

1. Se pesó 0.1 g del extracto almacenado y se diluyó en 9.9 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril a un pH=7.0, posteriormente se pasteurizó a 80 °C por 10 minutos.
2. Se procedió a sembrar en cajas con agar nutritivo a pH=7.0 en cuatro cuadrantes, se incubaron a 30 °C de 24 a 48 horas.
3. Aquellas colonias puras cristalíferas se seleccionaron y sembraron en tubos con agar nutritivo inclinado incubándose para su crecimiento, posteriormente se almacenaron a temperatura de refrigeración. Al momento de utilizarse se activaron (por triplicado) para la realización de estudios.

#### **3.3.4.2 Preparación del inóculo**

Una vez activada la cepa, se tomaron varias asadas y se inocularon 3 matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, los cuales contenían 50 ml de caldo triptosa fosfato (CTP), a pH=7.0, estos se mantuvieron en agitación a 200 rpm en un agitador rotatorio (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) durante 18 h a 30 °C Solomons, 1967.

#### **3.3.4.3 Propagación**

Se tomó el 1 % (V/V) como inóculo del medio CTP para sembrarlo en los 14 medios de cultivo designados (por triplicado), que estaban contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de dichos medios, se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 30 °C en el agitador rotatorio durante 10 horas.

#### 3.3.4.4 Determinación de la cinética de crecimiento

Se tomaron alícuotas de 3 ml al inicio y final del proceso a las cuales se les determinó lo siguiente :

1. Se realizaron observaciones microscópicas cada 12 h a los medios de cultivo y después de 48 h cada 6 horas para determinar el final del proceso al observar el 80 % de la formación espora-cristal.
2. Medición de pH : se colocaron 3 ml de cada muestra en 10 ml de agua destilada de pH =7.0 para medir el pH resultante utilizándose un pHmetro marca Beckman.
3. Determinación de azúcares: se analizó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Las muestras recuperadas durante el transcurso de la fermentación se almacenaron a temperatura de congelación, al momento de llevar a cabo la determinación se descongelaron y centrifugaron a 3,000 rpm por 15 minutos, del sobrenadante se tomó 1 ml, el cual se depositó en un tubo de ensaye, luego se le agregó 1 ml del reactivo DNS, se calentó en un baño de agua por 5 minutos, transcurrido ese tiempo se pasaron a un baño de hielo se les adicionaron 2 ml de agua destilada fría y se agitaron. Posteriormente se realizaron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro modelo 690 marca Sequoia-Turner Corporation a una longitud de onda 540 nm (Palacios, 1993).

#### 3.3.4.5 Recuperación del complejo espora cristal

Se utilizó el método de precipitación lactosa-acetona propuesto por Dulmage (1970), en el cual se ajustó a pH=7.0 con HCl 1N el cultivo, después se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos, subsecuentemente se decantó y se pesó el precipitado con una relación de 1:1.71 se resuspendió éste en lactosa al 5 %. Se agitó por 30 minutos, se dejó reposar 10 minutos y a éste volumen se le añadió acetona en proporción de 1:3.4 agitando 30 minutos, una vez concluido esto se filtró al vacío utilizando un papel filtro Whatman No. 1, el filtrado fue secado y raspado para recuperarlo, se pulverizó con ayuda de un mortero y se pesó para cuantificar así la producción y rendimiento obtenido. El extracto se guardó en frascos de plástico con tapa a condiciones ambientales, para después determinar: número de esporas viables, así como bioensayos que permitieron analizar su potencia y toxicidad.

#### 3.3.4.6 Determinación de producción

Se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Producción} = \frac{\text{Peso de extracto seco (g)}}{\text{Volumen de cultivo (ml)}}$$

Este resultó un parámetro básico que se utilizó junto con la toxicidad para la selección del medio de cultivo. Se realizaron análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar.

### 3.3.4.7 Conteo de esporas

El conteo se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Del extracto recuperado se hizo una dilución de 0.1g en 9.9 ml de agua destilada estéril a pH=7.0
2. Se pasteurizó a 80 °C por 10 minutos y se efectuaron una serie de diluciones de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-9}$ .
3. Posteriormente se sembraron por difusión 1 ml de las diluciones en placas de agar nutritivo estéril, con pH=7.0, se incubaron a 30°C por 24 horas.
4. Finalmente se efectuó un recuento de las unidades formadoras de colonias (U.F.C./g).

### 3.3.4.8 Determinación del coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato (Yx/s)

Este parámetro se determinó a cada experimento através de la cuantificación de la biomasa celular y del consumo de azúcares reductores según la fórmula:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Donde :

- Y<sub>x/s</sub> :Coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato (g/g).  
X :Concentración final de la biomasa celular (g/l).  
X<sub>0</sub> :Concentración inicial de la biomasa celular (g/l).  
S :Concentración final de azúcares reductores (g/l).  
S :Concentración inicial de azúcares reductores (g/l).

Para estimar la biomasa celular (g/l) se consideró el peso de una célula del género de *Bacillus thuringiensis* que es de  $2.295 \times 10^{-9}$  g y el número de esporas presentes en el extracto recuperado (U.F.C./g), para finalmente determinar los gramos de células secas (rendimiento) obtenidos.

### 3.3.4.9 Bioensayos de los extractos a nivel matraz

A los extractos recuperados se les probó su actividad insecticida con larvas neonatas de *Trichoplusia ni*. Se determinó el porcentaje de muerte a concentraciones de 50 y 500 µg/ml y para calcular la concentración necesaria para eliminar la mitad de la población, se probaron 7

dosis con las siguientes concentraciones : 50, 45, 35, 25, 15, 5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , para posteriormente determinar la potencia (Dulmage, 1973).

#### 3.3.4.10 Determinación de potencia

Se determinó el porcentaje de mortalidad a cada una de las concentraciones, se sometieron a un análisis de regresión procedentes del paquete Probit para determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de la población probada ( Dulmage, 1973). Una vez conocido éste valor se determinó la potencia mediante la fórmula :

$$\text{U.I./}\mu\text{g} = \frac{\text{D.L.}_{50} \text{ del estándar} \times \text{U. I. del estándar}}{\text{D.L.}_{50} \text{ de la muestra}}$$

Donde:

U.I./ $\mu\text{g}$  : Unidades Internacionales por microgramo de muestra.

D.L.<sub>50</sub> : Dosis Letal media (en microgramos por mililitro).

U.I. del estándar HD-1-S-1980: 16,000 U. I.

#### 3.3.5 Toxicidad comparativa de las cepas seleccionadas

Finalmente los resultados de toxicidad presentados por los extractos recuperados procedentes de los medios de cultivo, se sometieron al análisis de varianza para evaluar el efecto de la misma en relación a los medios y para determinar la toxicidad entre las cepas se realizó una prueba de t Student's.

### 3.4 Evaluación y selección de una cepa altamente tóxica

#### 3.4.1 Consumo de materia prima

Con los resultados obtenidos en la determinación de azúcares reductores, al inicio y final del experimento, se determinó el consumo de la fuente de carbono por las cepas en cada medio, realizado esto se sometieron los resultados al análisis de varianza y se clasificaron de acuerdo a su utilización de esta fuente (Zar, 1984).

#### 3.4.2 Parámetros de producción

Determinada la producción, productividad y rendimiento en los medios de cultivo probados por las cepas, se realizó el análisis de varianza, para determinar la existencia de efecto de los parámetros arriba mencionados en relación a los medios de cultivo y mediante la prueba

de comparación de medias, la selección de aquellos que presentaran mayores ventajas para el escalonamiento a nivel fermentador de 14 litros.

Para la selección de la cepa se consideró el nivel de producción, obtenido de la razón de la producción y la  $DL_{50}$ , a los valores más altos de dicho factor se les midió el consumo de la materia prima así como el costo y de ésta manera se seleccionó al que lo hiciera más factible a escalar.

### **3.5 Producción a nivel de fermentador de 14 litros.**

#### **3.5.1 Preparación del inóculo**

Se realizó de la misma manera que el experimento a nivel matraz (Dulmage, 1971).

#### **3.5.2 Propagación**

Del medio CTP se tomó el 1 % (V/V) para sembrarlo en 3 matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml del medio de cultivo seleccionado estéril, se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 30 °C en un agitador por 18 horas, posteriormente se inoculó un volumen de 100 ml al fermentador de 14 litros el cual contenía un volumen de operación de 7 litros de medio de cultivo seleccionado más 50 ml de antiespumante Dow-Corning al 20%. De este se tomó una alícuota para determinar el número de células con las que se inició del proceso.

#### **3.5.3 Medio de cultivo utilizado**

El medio se seleccionó en base a los resultados generados en el experimento a nivel matraz, a éste se le determinó azúcares reductores presentes y pH, durante el proceso.

#### **3.5.4 Condiciones a nivel fermentador**

En el cuadro 9 se muestran las condiciones en las que se llevó a cabo la fermentación, éstas se eligieron en base a estudios realizados por Palacios, 1991 y Galán, 1993, se considero al mejor tratamiento para la producción de bioinsecticida a esta escala de acuerdo a análisis estadísticos.

**Cuadro 9.** Condiciones a nivel fermentador 14 litros para la producción de la  $\delta$ -endotoxina de la cepa HD-1.

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
Aireación	0.75 VVM
Agitación	500 rpm
pH	7.0 - 8.0
Temperatura	30 °C

VVM = Volumen de aire por volumen de medio por minuto

rpm = revoluciones por minuto

°C = grados centígrados

Los experimentos se realizaron en 3 fermentadores de 14 litros de capacidad de marca New Brunswick Scientific Co. Inc. Modelo MF-114.

### 3.5.5 Cinética del cultivo

Se tomaron alícuotas de 5 ml durante el desarrollo del proceso y las cuales se les determinó

1. Frotis consecutivos cada 2 h para observar el desarrollo de la cepa hasta finalizar la esporulación.
2. Medición de pH: este se midió con electrodo tipo Ingood implantado al fermentador durante todo el proceso.
3. Determinación de azúcares: se analizaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

### 3.5.6 Recuperación del complejo espóra-cristal

Se utilizó el método de precipitación lactosa-acetona propuesto por (Dulmage,1970) el cual se explicó con anterioridad.

### 3.5.7 Determinación de parámetros de producción

La producción, el rendimiento, la productividad se determinaron de la misma manera que a nivel matraz utilizando para ello las formulas anteriormente ya señaladas.



### 3.5.8 Bioensayos de los extractos, conteo de esporas, y determinación del coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato ( $Y_{x/s}$ ).

Estos se realizaron siguiendo la metodología aplicada a nivel matraz.

### 3.5.9 Demanda biológica de oxígeno

La demanda biológica de oxígeno ( $N_a$ ) se determinó por el método de Humprey y col. (1976), que consiste en eliminar durante el proceso la aireación y prácticamente la agitación, en éste momento la concentración de oxígeno disuelto se detectó en función de la concentración de células de *Bacillus thuringiensis* presentes, al graficar la disminución del porcentaje de oxígeno disuelto contra tiempo en segundos, el valor de la pendiente representa el requerimiento de oxígeno expresado como  $N_a$  en gramos de oxígeno por litro de medio de cultivo por hora (Medrano, 1992 y Wang, 1979).

### 3.5.10 Velocidad específica del consumo de oxígeno

Para *Bacillus thuringiensis* el  $QO_2$  es un parámetro importante de fermentación, el cual representa la velocidad específica del consumo de oxígeno expresado como g de oxígeno /g de células secas por hora. Este se determinó en razón a la demanda de oxígeno ( $N_a$ ) entre los gramos de células secas existentes en cada litro de medio de fermentación (Demain, 1986).

### 3.5.11 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{La}$ )

La medición de este parámetro se realizó mediante el método dinámico de Humprey (1967), el cual se basa en la variación de la concentración del oxígeno disuelto con respecto al medio que es igual a cero. Sin embargo, al realizarlo en cultivo intermitente es de suponer que esta situación no es así. Para establecer una metodología sencilla de medición se dividió el valor de  $N_a$  determinado anteriormente entre el gradiente de concentración de oxígeno ( $C_1 - C^*$ ), que prevaleció durante la medición con la presencia de células, obteniéndose finalmente el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno expresado como  $K_{La} = h^{-1}$  (Moresi, 1988 y Crueger, 1989).

## RESULTADOS

### 4.1. Selección de extractos

De la revisión realizada a los archivos de la colección internacional de bacilos entomopatógenos (CIE), se seleccionaron 25 extractos clave HD superiores en actividad tóxica al estándar comercial, considerados como los mejores y de éstos se eligieron 7 en base a los criterios señalados anteriormente (Sección 3.1.2), los cuales se muestran en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Características de los extractos seleccionados de la colección internacional de bacilos entomopatógenos para el control biológico de *T. ni* y *H. virescens*.

Extracto (clave)	Cepa HD	Serotipo	Tipo de cristal	Producción (g/l)	Potencia <i>T. ni</i> U. I.	Potencia <i>H. virescens</i> U. I.
FR55C44	187	3a3b <i>kurstaki</i>	k-73	30.87	87,000	Nd
FR84C40	1	3a3b <i>kurstaki</i>	k-1	30.80	775,000	588,000
FR85C25	164	3a3b <i>kurstaki</i>	k-1	26.10	1;510,000	825,000
FR208F36	263	3a3b <i>kurstaki</i>	k-1	43.00	62,900	1;540,000
FR215A42	1	3a3b <i>kurstaki</i>	k-1	Nd	587,000	1;730,000
FR215F42	1	3a3b <i>kurstaki</i>	k-1	Nd	754,000	1;270,000
FR246C36	73	3a3b <i>kurstaki</i>	k-73	26.00	38,400	55,400

\* Nd : no determinada, U. I. : Unidades internacionales.

### 4.2. Estudio de toxicidad de los extractos

A los extractos seleccionados se les determinó su actividad insecticida después de 15 años de almacenamiento. Esto se realizó mediante bioensayos, los resultados se muestran en el cuadro 11. Para observar el efecto de los extractos, los porcentajes de mortalidades fueron sometidos al análisis de varianza donde se determinó que existen diferencias en el comportamiento insecticida de los extractos (cuadro 1A), en cuanto a la comparación de medias (Tuckey), Zar, 1984, se observaron 4 grupos las cuales se muestran en el cuadro 12; en las cepas HD-1, HD-73, HD-187 y HD-263 la actividad insecticida se ha mantenido; las dos primeras presentaron los más altos niveles (superiores al 80%) así como un comportamiento semejante, por su parte se observó que la cepa HD-164 perdió toxicidad.

**Cuadro 11.** Toxicidad presentada por 7 extractos de la colección internacional de bacilos entomopatógenos después de 15 años de almacenamiento.

Clave de Extracto (Cepa)	Insectos probados			
	<i>Trichoplusia ni</i>		<i>Heliothis virescens</i>	
	50 µg/ml	500 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml
FR55C44 (HD-187)	0.0	20.3 ± 8.5	42.3 ± 19.0	80.0 ± 10.0
FR84C40 (HD-1)	31.3 ± 12.5	78.5 ± 8.7	67.9 ± 10.9	90.0
FR85C25 (HD-164)	6.8 ± 6.8	14.9 ± 9.3	0.0	6.5 ± 6.5
FR208F36 (HD-263)	6.5 ± 6.5	44.9 ± 6.3	90.0	90.0
FR215A42 (HD-1)	55.4 ± 16.5	90.0	90.0	90.0
FR215F42 (HD-1)	33.6 ± 13.3	90.0	83.0 ± 6.8	90.0
FR246C36 (HD-73)	33.2 ± 5.7	90.0	90.0	90.0

Nota: Los valores contenidos en la tabla corresponden a la media ± su desviación estándar del % de mortalidad con su respectiva corrección, donde el 0 significa que no presento mortalidad y el 90 corresponde a la eliminación de toda la población

En cuanto al efecto que presentó la dosis, indica que existen diferencias en la concentración de 50 µg/ml y 500 µg/ml en ambos insectos, para ello se realizaron pruebas de  $X^2$ , resultando más tóxica la segunda; por último en relación a los insectos plaga (*Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*) mediante pruebas de  $X^2$  (Cuadro 2A) se observaron diferencias de toxicidad entre los insectos siendo más susceptible *Heliothis virescens* (Ge Z. y col., 1991), lo cual concuerda con los experimentos realizados por Dulmage, quién reporta valores de mortalidad total, esto se debió a que la bacteria fué cultivada en diferentes medios lo cual hizo que la actividad insecticida fuera diferente, inclusive se tratándose de la misma cepa, trabajos de: Dulmage, Salama y Smith afirman lo obtenido, ellos mencionan que la toxicidad de las cepas de *Bacillus thuringiensis* son dependientes del serotipo así como del medio donde se propaga, sin embargo cabe considerar que la estructuración genética es diferente en cada serotipo (Hofte y Whiteley, 1989).

**Cuadro 12.** Comparaciones de medias de la toxicidad de los 7 extractos seleccionados de la colección internacional de bacilos entomopatógenos.

Clave del extracto (Cepa)	Promedio ± desv. Std % de mortalidad	Grupos estadísticos
FR215A42	89.3833 ± 5.5467	a
FR246C36	82.5166 ± 9.1326	ab
FR215F42	81.1583 ± 9.7040	ab
FR84C40	77.2166 ± 8.9793	ab
FR208F36	62.8333 ± 12.3520	bc
FR55C44	38.6250 ± 11.5828	c
FR85C25	2.0000 ± 1.0446	d

Nota: Los valores promedio y la desviación estándar se expresan con su respectiva corrección del %, la literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Zar, 1984).

Mediante los análisis de varianza aplicados a la toxicidad de los extractos así como a las pruebas de comparación de medias de Tuckey y pruebas de  $X^2$ , procedente del paquete Statgraphic 2, se seleccionaron a las cepas HD-1 y HD-73 como las mejores candidatas, para la recuperación de su actividad tóxica.

### 4.3. Evaluación y selección de la cepa más tóxica

Para realizar esto se tomaron en cuenta los factores más importantes que intervienen en el proceso de producción del bioinsecticida y que son los siguientes:

#### 4.3.1 Consumo de materia prima (Azúcares)

El consumo de azúcares en los medios de cultivo fué variable, se observó la utilización de la fuente de carbono del 60 al 70% en los medios con dextrosa y con respecto a los que contenían melaza su rango fué más amplio del 20 al 70 %.

La prueba t de Student´s mostrada en el cuadro 13 compara de forma general a las dos cepas e indica que no existen diferencias significativas entre el consumo de azúcares de ambas.

**Cuadro 13.** Prueba t de Student´s para comparar el consumo de azúcares en los catorce medios por las cepas *B. thuringiensis* HD-1 y HD-73.

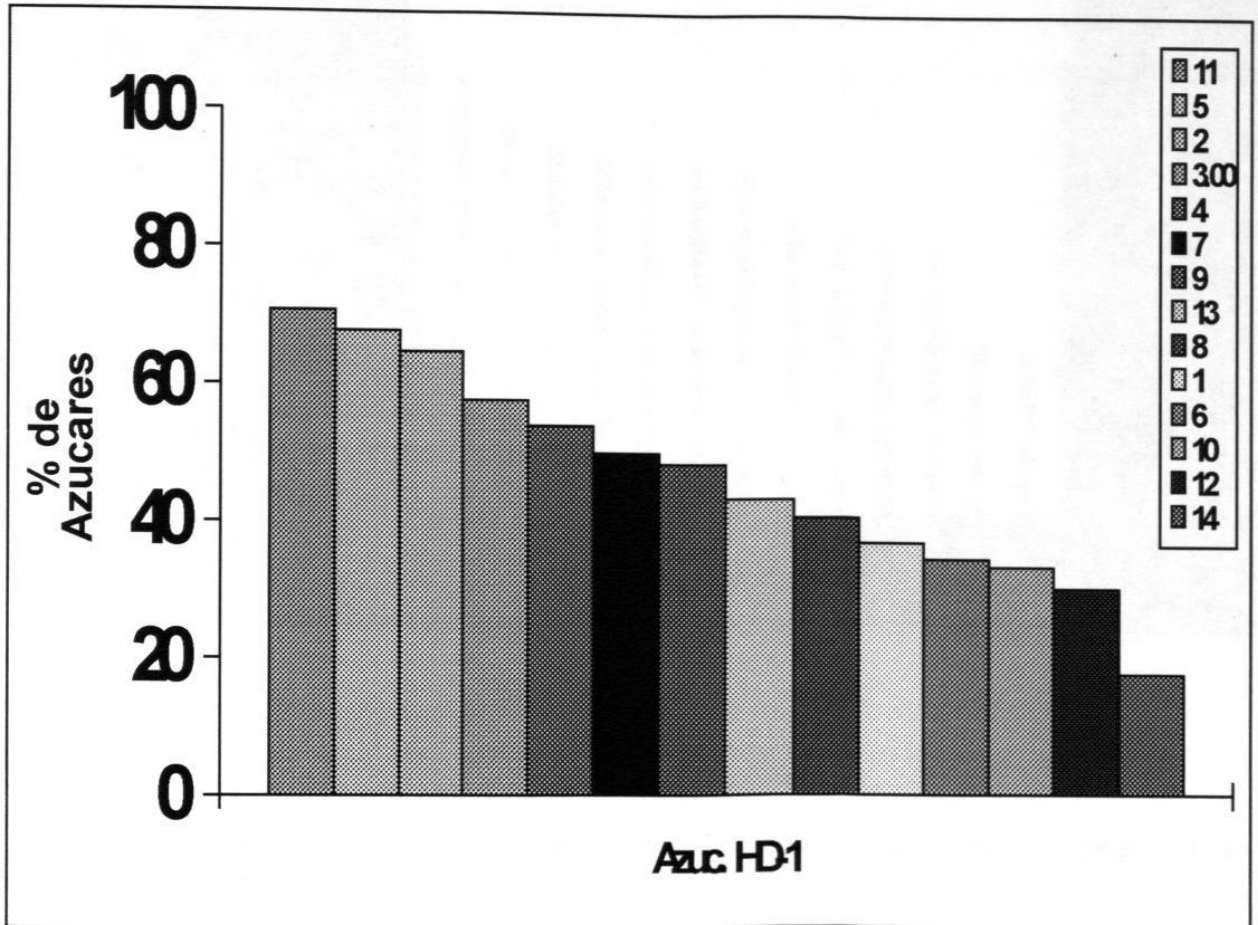
Parámetro	Valor
t	0.423154 NS
Nivel de significancia	0.067390
Tamaño de la población	42 unidades de c/cepa

Nota: NS: no significativa.

Analizando individualmente el comportamiento de la cepa HD-1 en los catorce medios de cultivo de acuerdo a la utilización de la fuente de carbono, el ANOVA presentado en el cuadro 3A, pone en evidencia que existe efecto entre los medios, la prueba de comparación de medias de Tuckey, mostró que existen 8 diferentes grupos, de los cuales los medios que contenían dextrosa como fuente de carbono ( E-2 y E-5) presentaron un alto consumo junto con el medio E-11, en ellos el contenido de harina de soya fue idéntico (10 g/l), resultados semejantes fueron obtenidos por Palacios, quién utilizando un medio de melaza con semejante contenido de azúcares reductores observó el mismo consumo y en el medio con dextrosa la utilización de dicha fuente fué superior al 55 %. Cabe mencionar que en los medios: E-14, E-12, E-10, E-6 y E-1, se observó un mínimo consumo de azúcares reductores, se indica gráficamente en la figura 5.

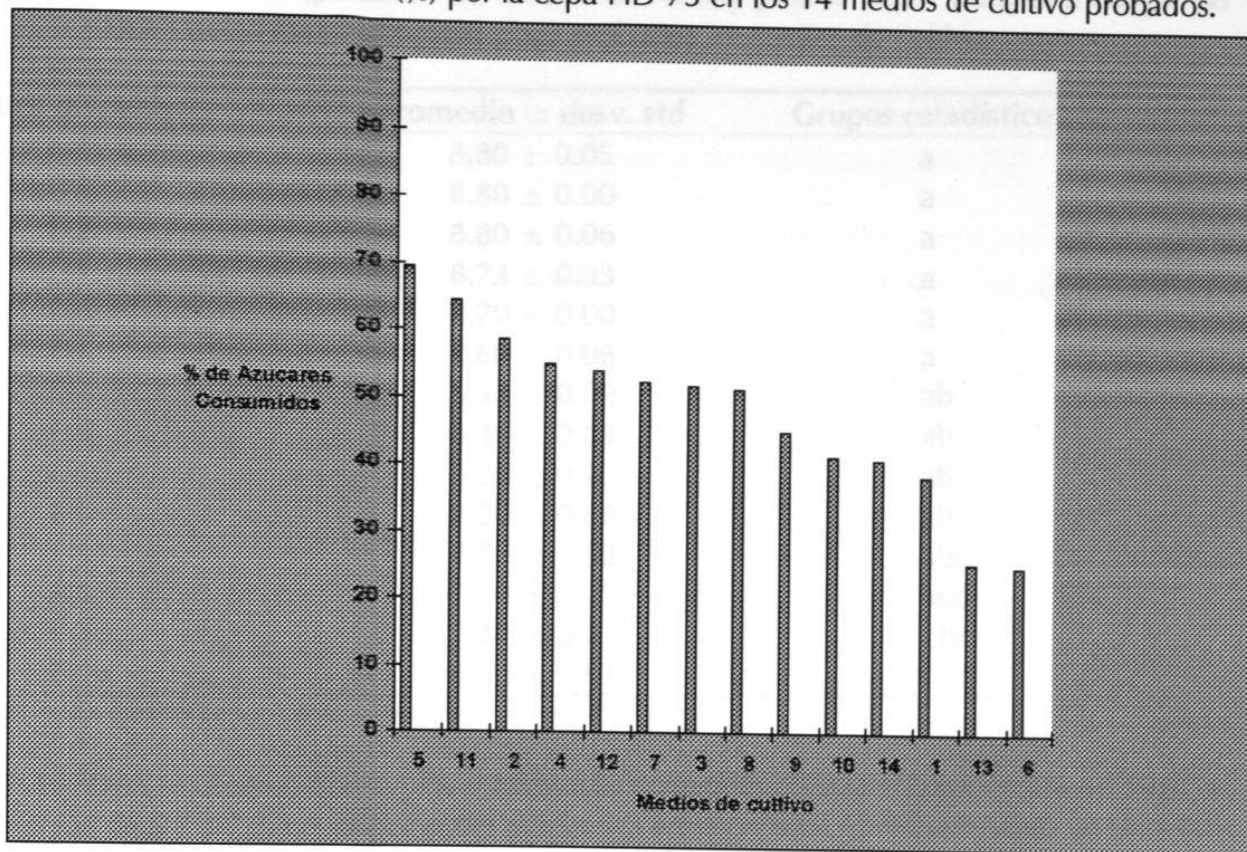
Figura 5. Consumo de azúcares (%)

**Figura 5.** Azúcares consumidos (%) por la cepa *Bacillus thuringiensis* HD-1 en los medios de cultivos probados.



Los resultados obtenidos para la cepa HD-73 indicaron que existen diferencias significativas en el consumo de azúcares en los catorce medios de cultivo con una probabilidad de error de 0.0 (cuadro 4A), las pruebas de comparación de medias de Tuckey mostraron 8 grupos. Los consumos más altos al igual que en la cepa anterior los presentaron los medios E-2, E-5 y E-11, asociándolos a las características antes mencionadas; mientras que los medios E-6, E-13 y E-1 siguen un patrón de consumo bajo sin presentar característica alguna en su composición, esto va de acuerdo con los resultados obtenidos por : Dulmage, Salama y Smith, que indican que el comportamiento de la cepa depende de la composición del medio de cultivo , por otro lado los medios E-9, E-8, E-3, E-7, E-12 y E-14 presentan un comportamiento semejante, en ellos la proporción de la fuente de carbono fue de 10 y 30 g/l y la de nitrógeno y cofactores de 10 a 20 g/l. La representación del comportamiento de estos se muestra en la figura 6.

**Figura 6.** Consumo de azúcares (%) por la cepa HD-73 en los 14 medios de cultivo probados.



#### 4.3.2 pH

El pH fue diferente en ambas cepas, en el cuadro 14 se muestra la prueba t de Student's que determinó esto.

**Cuadro 14.** Comparación de pH para ambas cepas de *B. thuringiensis* mediante la prueba de Student's.

Parámetro	Valor
t	1.4868 NS
Probabilidad de error	0.1409
Número de observaciones	42 unidades/cepa

Nota: NS : no significativa

El análisis de varianza realizado a cada una de las cepas (cuadro 5A y 6A), dedujo que el pH es diferente en cada medio de cultivo donde se desarrollaron, mediante la comparación de medias de Tuckey se observaron diferentes grupos para las cepas HD-1 y HD-73 (cuadros 15 y 16).

**Cuadro 15.** Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa *Bacillus thuringiensis* HD-1 del pH final obtenido al ser probados 14 medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio $\pm$ desv. std	Grupos estadísticos
E-5	8.80 $\pm$ 0.05	a
E-3	8.80 $\pm$ 0.00	a
E-2	8.80 $\pm$ 0.06	a
E-1	8.73 $\pm$ 0.03	a
E-6	8.70 $\pm$ 0.00	a
E-7	8.60 $\pm$ 0.06	a
E-4	8.53 $\pm$ 0.09	ab
E-9	8.36 $\pm$ 0.03	ab
E-10	8.26 $\pm$ 0.20	ab
E-8	8.20 $\pm$ 0.26	ab
E-11	7.80 $\pm$ 0.32	abc
E-13	7.70 $\pm$ 0.15	abc
E-12	7.40 $\pm$ 0.23	bc
E-14	6.70 $\pm$ 0.61	c

Nota: Las literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Zar, 1984).

También se observó que en los medios que contenían melaza en proporción de 30g/l el pH final fue de 6.7 a 7.8 a excepción del medio E-3 en la cepa HD-1 que presentó un pH=8.8; en los medios que contenían 10 g/l su pH fluctuó entre 8.0 y 8.7. Para los medios con dextrosa el pH obtenido fue 8.8 siendo éstos los más altos (Dulmage 1980 y Palacios 1993).

**Cuadro 16.** Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa *Bacillus thuringiensis* HD-73 del pH final obtenido al ser probados en 14 medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio $\pm$ desv. std	Grupos estadísticos
E-2	8.76 $\pm$ 0.09	a
E-5	8.66 $\pm$ 0.03	a
E-6	8.63 $\pm$ 0.09	ab
E-4	8.56 $\pm$ 0.14	abc
E-7	8.43 $\pm$ 0.03	abc
E-9	8.36 $\pm$ 0.18	abc
E-8	8.16 $\pm$ 0.30	abcd
E-10	8.03 $\pm$ 0.35	abcde
E-1	8.03 $\pm$ 0.35	abcde
E-3	7.70 $\pm$ 0.49	abcde
E-11	7.46 $\pm$ 0.23	bcde
E-12	7.40 $\pm$ 0.10	cde
E-14	7.10 $\pm$ 0.06	de
E-13	6.96 $\pm$ 0.09	e

Nota: Las literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Zar, 1984).

### 4.3.3 Producción

Los valores de producción obtenidos varían de 10 a 22 g/l para ambas cepas. Comparando la producción mediante la prueba t de Student's indicada en el cuadro 17, se observó que las cepas HD-1 y la HD-73 presentaron un comportamiento similar.

**Cuadro 17.** Comparación de producciones para ambas cepas mediante la prueba de t Student's.

Parámetro	Valor
t	0.2983 NS
Probabilidad de error	0.3831
Número de observaciones	42 unidades/cepa

Nota: NS : no significativa.

A la cepa HD-1 se le practicó el ANOVA (cuadro 7A), en el que se encontró efecto del medio de cultivo sobre la producción; mediante la prueba de comparación de medias (cuadro 8A) se observó que los medios E-14, E-12, E-8, E-2 y E-10 obtuvieron los valores de producción más altos, en ellos el contenido de fuente de nitrógeno fue común (20 g/l), resultados similares fueron obtenidos por: Goldberg en 1980, Dulmage en 1982, Palacios y Galán en 1993. Sin embargo los medios E-11, E-4 y E-7 presentaron producciones inferiores, su contenido de harina de soya y cofactores fue de 10 g/l, estos resultados concuerdan con los obtenidos por : Smith, 1982; Salama y col., 1983; Arcas y col., 1984 y 1987; Anderson, 1990; Razo, 1990; Rowe, 1990 y Quintero en 1994.

La cepa HD-73, al igual que la cepa HD-1 presentó diferencias en la producción obtenida al propagarse en los diversos medios de cultivo, esto se muestra en el cuadro 9A, las pruebas de comparación de medias indicada en el cuadro 10A, presentaron a los medios E-14, E-12, E-6 y E-10 como los más productores, resultados semejantes los obtuvieron: Goldberg en 1980 utilizando otro medio de cultivo, Palacios y Galán en 1993 en medios con las mismas materias primas y Dulmage utilizando dextrosa como fuente de carbono además de otros constituyentes. En los medios E-2, E-5, E-7, E-11 y E-1 fueron aquellos donde se obtuvo menor producción del complejo espora cristal, estos concuerdan con los reportes de: Anderson, 1990; Arcas y col., 1984 y 1987; Quintero, 1994; Razo, 1990; Rowe, 1990; Smith, 1982 y Salama y col., 1983.

Los medios con dextrosa presentaron baja producción (Dulmage, 1981), sin embargo aquellos que contenían 30 g/l de melaza presentaron los rendimientos más altos a excepción del medio E-6, ésto concuerda con lo reportado por Quintero, 1994, además se analizó que conforme se aumentó el contenido de melaza la producción presentó un incremento.

Se determinó que la cepa HD-1 presenta un comportamiento diferente en los medios de dextrosa en comparación a la HD-73, debido a que el rendimiento es alto e intermedio para



HD-1 y en la cepa HD-73 es bajo, Palacios reportó el mismo comportamiento con diferentes cepas, por su parte Delmas observó comportamientos diferentes dependiendo de la cepa, observando efecto en las diferentes concentraciones de dextrosa. Por lo que respecta a los medios de melaza el E-11 y E-7 para ambas cepas el rendimiento es bajo, similar a lo obtenido por; Anderson, 1990; Arcas y col., 1984 y 1987; Quintero, 1994; Razo, 1990; Rowe, 1990 Salama y col., 1983; y Smith, 1982, así como un comportamiento intermedio en E-3 y E-13; y alto en los medios E-14, E-12, E-10 y E-8 (Dulmage, 1982; Galán, 1993; Goldberg, 1980; y Palacios, 1993).

#### 4.3.4 Conteo de esporas

Los conteos obtenidos se sometieron a la prueba t de Student's donde se compararon a ambas cepas (Cuadro 18), esto pone en evidencia que no existen diferencias en cuanto al desarrollo de las esporas en ambas cepas.

**Cuadro 18.** Prueba t de Student's aplicada para comparar el número de esporas obtenidas en los medios de cultivo para las cepas HD-1 y HD-73.

Parámetro	Valor
t	0.547823 NS
Probabilidad de error	0.058530
Número de observaciones	42 por cepa

Nota: NS: no significativa.

El rango presentado, fué amplio de  $2.24 \times 10^6$  a  $320 \times 10^8$  UFC/g, al utilizar la cepa HD-1 en los medios que contenían dextrosa, como única fuente de carbono, se observó que en el medio con 1.5 g/l el número de esporas era el doble ( $14.1 \times 10^6$  UFC/g) en comparación al medio E-5 (1 g/l); Delmas en 1985, observó con diferentes concentraciones efectos similares, resultando ser más tóxico aquel con mayor concentración de fuente de carbono. Por otra parte, al utilizar medios con 10g/l de melaza se observaron valores superiores de  $5 \times 10^6$  UFC/g, sin embargo al incrementar la concentración a 30 g/l se presentaron valores desde  $2.4 \times 10^6$  hasta  $320 \times 10^6$  UFC/g, siendo más tóxicos los extractos obtenidos de concentraciones menores de melaza.

Para la cepa HD-73 los medios con dextrosa presentaron similitud en cuanto al número de colonias, los medios con 30g/l de melaza presentaron los valores más altos que van de  $2.4 \times 10^6$  a  $300 \times 10^6$  UFC/g (Arcas y col., 1984; CRC, 1978; Goldberg y col., 1980; y Sakharova, 1984) y por lo que respecta a las concentraciones de 10g/l se obtuvieron de  $5.6 \times 10^6$  -  $9.6 \times 10^6$  UFC/g (Smith; 1982).

#### 4.3.5 Coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato

El rendimiento celular presentado fué diferente en ambas cepas, según a la prueba t de Student's (Cuadro 19).

**Cuadro 19.** Prueba t de Student's para comparar el rendimiento celular en las cepas HD-1 y HD-73.

Parámetro	Valor
t	2.40579 **
Probabilidad de error	0.01838
Número de observaciones	42 datos por cepa

Nota: \*\* significativa.

Los valores de coeficiente de rendimiento celular comprenden de: 0.04 - 0.99g de biomasa/ g de sustrato (gB/gS). A la cepa HD-1 se le realizó el análisis de varianza, cuadro 11A, que indica que el coeficiente de rendimiento fué diferente en los medios, mediante las pruebas de comparación de medias se determinó que los medios: E-14, E-1, E-6, E-8 y E-10 (cuadro 20) presentaron los valores más altos, similares a los obtenidos por: Anderson en 1990; Arcas y col., 1987; Holmberg y col., 1980; Medrano, 1992; Rowe, 1990; Sakharova y col. en 1984. Los valores bajos correspondieron a los medios: E-13, E-3, E-11 y E-4 siguiendo un patrón de comportamiento semejante a los reportados por: Arcas y col., 1987; Palacios, 1993; Razo, 1990; y Sakharova, 1984.

**Cuadro 20.** Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa HD-1 del coeficiente de rendimiento obtenido en 14 medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio $\pm$ desv. std	Grupos estadísticos
E-14	0.466 $\pm$ 0.168	a
E-1	0.435 $\pm$ 0.007	a
E-6	0.376 $\pm$ 0.002	b
E-8	0.370 $\pm$ 0.006	b
E-10	0.357 $\pm$ 0.001	b
E-12	0.188 $\pm$ 0.001	c
E-5	0.161 $\pm$ 0.005	cd
E-2	0.142 $\pm$ 0.007	de
E-9	0.119 $\pm$ 0.002	e
E-7	0.119 $\pm$ 0.006	e
E-4	0.078 $\pm$ 0.005	f
E-11	0.046 $\pm$ 0.002	fg
E-3	0.037 $\pm$ 0.000	g
E-13	0.021 $\pm$ 0.001	g

Nota: Las literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Zar, 1984).

En la cepa HD-73 el análisis de varianza reportó diferencias de rendimiento con respecto a la composición de los medios, cuadro 12A. En el cuadro 21 se muestran la prueba de comparación de medias, donde se observa a los medios E-13, E-12, E-11, E-6 y E-8 como aquéllos donde se presentó buena utilización del sustrato concordando con lo obtenido por: Anderson, 1980; Arcas y col., 1987; Holmberg y col., 1980; Medrano, 1992; Rowe, 1990 y Sakharova y col., 1984. Por otra parte los medios E-3, E-1 y E-5 su rendimiento coincide con: Arcas y col., 1987; Palacios, 1993; Razo, 1990 y Sakharova en 1984.

**Cuadro 21.** Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa HD-73 del coeficiente de rendimiento celular obtenido al ser probados en 14 medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio $\pm$ desv. std	Grupos estadísticos
E-13	1.000 $\pm$ 0.000	a
E-12	1.000 $\pm$ 0.000	a
E-11	0.811 $\pm$ 0.000	b
E-6	0.550 $\pm$ 0.029	c
E-8	0.370 $\pm$ 0.011	d
E-10	0.199 $\pm$ 0.006	e
E-9	0.767 $\pm$ 0.002	ef
E-2	0.141 $\pm$ 0.000	fg
E-4	0.127 $\pm$ 0.001	gh
E-14	0.127 $\pm$ 0.001	gh
E-7	0.124 $\pm$ 0.004	h
E-5	0.090 $\pm$ 0.005	hi
E-1	0.077 $\pm$ 0.004	i
E-3	0.062 $\pm$ 0.001	i

Nota: Las literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Zar, 1984).

#### 4.3.6 Toxicidad

La cepa HD-1 de manera global fué más tóxica que la HD-73, pero al compararse éstas contra el estándar (mediante la prueba t de Student's presentada en el cuadro 22 y 23 respectivamente), en general no fueron superiores.

**Cuadro 22.** Prueba t de Student's aplicada a la cepa HD-1 comparando el promedio de la toxicidad obtenida en los 14 medios de cultivo contra el estándar.

Parámetro	Valor
t	1.99042 *
Probabilidad de error	0.03399
Número de observaciones	14

Nota: \* : significativo.

**Cuadro 23.** Prueba t de Student´s aplicada la cepa HD-73 para comparar el promedio de la toxicidad obtenida en los 14 medios de cultivo contra el estándar.

Parámetro	Valor
t	1.80894 *
Probabilidad de error	0.04681
Número de observaciones	14

Nota: \* significativo.

Al analizar el desarrollo en cada medio se observó que en algunos se incrementó y en otros no (cuadro 24). Para la cepa HD-1 en los medios E-3, E-4, E-5, E-6 y E-13 la actividad tóxica fue superior al estándar, a excepción del E-5, su proporción de LRM y harina de soya fue de 10 y 15 g/l, con pH superior a 8.5 excepto en el medio con alto contenido de melaza (E-13), resultados superiores al estándar han sido obtenidos por: Dulmage 1980 y Sánchez, 1985. Para la cepa HD-73 los medios E-1, E-4, E-5, E-6 y E-8 su contenido de LRM fue de 10 g/l, su contenido de melaza de 10 y 20 g/l, y con valores de pH de 8 - 8.6 (Dulmage, 1980).

**Cuadro 24.** Toxicidad presentada por las cepas HD-1 y HD-73 en los 14 medios de cultivo probados.

Medio de cultivo	Cepa HD-1	Cepa HD-73
E-1	16.29	7.15
E-2	64.27	12.12
E-3	6.00	671.49
E-4	6.03	7.95
E-5	6.00	6.59
E-6	6.05	11.59
E-7	24.06	13.53
E-8	20.42	8.74
E-9	22.91	21.42
E-10	48.29	41.31
E-11	13.45	16.11
E-12	36.52	40.54
E-13	10.07	129.96
E-14	200.00	200.00

Nota: Las unidades de los valores contenidos en la tabla son microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ) el estándar presentó un valor de  $12.053\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.3.7 Selección de la cepa más tóxica

La elección se realizó de acuerdo a los parámetros de toxicidad, producción, rendimiento, factor de producción así como del consumo de materia prima para el análisis de costos del proceso. Se muestra en el cuadro 25 las seis mejores cepas en base a los parámetros arriba mencionados.

Se seleccionó en base a lo anterior, a la cepa HD-1 en el medio E-6, debido a que presentó un alto valor del factor de producción (2.46) en comparación a otros medios, en cuanto al consumo de la fuente de carbono no es alto comparado con los medios que utilizaron dextrosa, pero al realizar un análisis de costos del proceso y obtención del bioinsecticida es más factible éste medio (E-6) que los de dextrosa, ya que se obtuvo el mismo producto, con igual toxicidad y potencia, con buen rendimiento en relación al sustrato y con un costo menor, que hace más atractiva la producción. Es debido a estos atributos por lo que se eligió para producirse a nivel fermentador de 14 litros.

**Cuadro 25.** Cepas seleccionadas como mejores a nivel matraz.

Cepa	Medio	LD <sub>50</sub>	Producción Global	Nivel de Prod.	% Az. Cons.
HD-1	E-3	6.000	10.075	1.679	87.603
HD-1	E-5	6.000	14.825	2.470	85.976
HD-1	E-4	6.032	12.020	1.990	65.273
HD-1	E-6	6.053	14.850	2.460	32.726
HD-73	E-5	6.599	11.740	1.770	87.603
HD-73	E-1	7.155	13.470	1.880	38.743

Nota: Nivel de . Prod.: Nivel de producción, % Az. Cons.: porcentaje de azúcares consumidos con su respectiva corrección, Producción : gramos/litro, LD<sub>50</sub> : microgramo/mililitro

#### 4.4 Experimentos a nivel fermentador 14 litros.

Seleccionada la cepa HD-1 así como el medio (E-6) se procedió a propagar a nivel fermentador 14 litros, donde se analizaron los siguientes parámetros: utilización de la fuente de carbono, pH, consumo de oxígeno, producción, productividad, conteo de esporas, rendimiento, toxicidad y potencia.

##### 4.4.1 Utilización de la fuente de carbono

La utilización de azúcares durante la producción del bioinsecticida, utilizando el medio de cultivo E-6, mostró el mismo comportamiento que a nivel matraz con un consumo de azúcares de 33 %, esto indica que no existen diferencias al realizarlo en escala mayor (7 litros). Este hecho permite que se pueda incrementar el tamaño del inóculo para el total consumo o bien la implementación de un proceso de recuperación. Se tienen reportes de consumos similares hechos por Palacios, 1993.

#### 4.4.2 pH

El efecto del pH durante el proceso presentó niveles de 7.0 a 8.0, ésto debido a la formación del cristal, no es recomendado utilizar valores superiores a 8.0 ya que se afecta la estructura del cristal insecticida, comportamiento semejante lo observaron Dulmage, 1980; Maldonado, 1982 y Palacios, 1993. La ventaja controlar el pH hasta 8.0 durante la producción del bioinsecticida es por razones prácticas y más aún económicas ya que la toxicidad se mantiene.

\* Trabajo en prensa

#### 4.4.3 Producción

La producción obtenida a este nivel no presentó diferencias significativas con respecto a lo obtenido a nivel matraz, lo cual indicó que es probable que al incrementarse la escala bajo las mismas condiciones se mantenga el valor de producción. El valor obtenido fué de 14.0 g/l, lo cual concuerda con los valores obtenidos por: Goldberg y col. en 1980, Salama y col. en 1983 y Razo en 1990. quienes trabajaron con la variedad *kurstaki*, pero empleando otros medios de cultivo de mayor costo.

#### 4.4.4 Productividad

La productividad obtenida fué de 0.466 g/l/h similar a la obtenida por: Razo y Rowe 1990. Comparando la productividad de nivel matraz y nivel fermentador se observó gran diferencia ya que se redujo casi a la mitad el tiempo de procesamiento de 56 a 30 h, similar a lo reportado por Galán y Palacios en 1993. Esto refleja que al controlar las condiciones del proceso como aireación y agitación, se incrementan el área de superficie de las células eficientizando la producción del bioinsecticida. Al disminuir el tiempo se minimizan las posibilidades de riesgo de contaminación, así como la reducción del costo del proceso.

#### 4.4.5 Conteo de esporas

Presentó un valor superior al obtenido a escala menor, quizá sea debido al espacio disponible y al acondicionamiento que representa la aireación y agitación, así como al mayor control de pH, temperatura, antiespumante que sean óptimos para la producción del complejo, Arcas, 1987; Drake, 1963; Rowe, 1990 y Smith, 1963; obtuvieron valores similares.

#### 4.4.6 Coeficiente de rendimiento celular en base al sustrato

El valor obtenido a nivel fermentador fué de 0.470 g B/g S, éste indica que la mitad del sustrato es convertida a complejo espora-cristal, comparado con los experimentos a nivel matraz

se observó un ligero incremento, ésto se atribuye a que al tener un mejor control de las condiciones del proceso pueda eficientizarse el mismo. Estos datos coincidieron con los obtenidos por: Anderson y Razo, 1990 y Arcas y col., 1987.

#### 4.4.7 Demanda de oxígeno

El requerimiento de oxígeno para el desarrollo de las células en cultivo a las 8 horas fue de 0.04441 g de O<sub>2</sub>/l/h, valores que por tratarse de una fermentación aeróbica son relativamente bajos al compararse con los que otros autores reportan que varían de un rango de 1.2 a 3.5 g de O<sub>2</sub>/l/h (Palacios, 1993).

#### 4.4.8 Coeficiente de respiración

Se obtuvo el valor de 0.1162 g de O<sub>2</sub>/g de cél./h como QO<sub>2</sub>, éste valor representa la velocidad específica de la utilización de oxígeno, ésto coincide con los parámetros antes mencionados es de esperarse que si la bacteria requiere poco oxígeno para desarrollarse el consumo de éste también sería bajo; resultados similares reportó Galán en 1993.

#### 4.4.9 Coeficiente de transferencia de oxígeno KL<sub>a</sub>

Con un valor de KL<sub>a</sub> de 31.48 H<sup>-1</sup>, de acuerdo al método de Humprey, 1976, se condujo la producción del complejo espora-cristal, éste es similar al obtenido por Galán en 1993, para la cepa GM-10 en condiciones de aireación y agitación idénticas. Aunque este valor no es elevado, se obtuvieron buenos resultados quizá se deba a que *B. thuringiensis* es una bacteria que requiere baja demanda de oxígeno y ello no afecta su desarrollo.

#### 4.4.10 Toxicidad y Potencia

La toxicidad se relacionó con la dosis letal media, y la potencia con la medición de la actividad insecticida con respecto a un estándar expresada en Unidades Internacionales. El extracto recuperado presentó un incremento de la actividad a nivel matraz alcanzándose una potencia de 34,698 U. I. para *T. ni* valor que representa más del doble del estándar comercial (16,000 U.I.), pudiéndose recuperar de acuerdo al método de extracción lactosa - acetona el 85.25 % de actividad insecticida del extracto almacenado y en relación al procedimiento de caldo recuperado, se logró alcanzar la actividad original, el valor reportado en archivo corresponde a 0.33 µl/ml y el obtenido de 0.296 µg/ml contra *H. virescens*, éstos se encuentran en relación al DL<sub>50</sub> valores de potencia superior al estándar lo presentan algunos productos comerciales como : Javelin®, Dipel®, etc., productos importantes como bioplaguicidas.

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Actualmente es escasa la información sobre el estudio de persistencia de toxicidad en extractos de fermentación almacenados por períodos superiores de 15 años. Solo se tienen dos reportes uno de Vandekar en 1983, quién estudió a *B. thuringiensis* variedad *israelensis* donde observó que después de 8 años de almacenamiento mantuvo toxicidad, y el otro corresponde a Galán quien en 1993, reportó que la cepa HD-263 variedad *kurstaki* conserva buena actividad tóxica después de 12 años de almacenamiento. De acuerdo a los resultados de la evaluación de los 1,215 extractos de la colección internacional de bacilos entomopatógenos, se dedujo que aquellos pertenecientes a la variedad *kurstaki* son los más tóxicos destacándose entre ellos las cepas HD-1, HD-73, HD-164, HD-187 y HD-263. Estas cepas fueron originalmente producidas por el Dr. Howard T. Dulmage hace 20 años y consideradas por él mismo como tóxicas ya que su potencia contra los insectos plaga *T. ni* era el doble al estándar y hacia *Heliothis virescens* más potente. Al probarse su actividad insecticida al inicio de la investigación tóxica se observó que en concentraciones de 50 y 500  $\mu\text{g/ml}$  para la cepa HD-1 clave FR215A42 fue de 55.4% y 100% contra *T. ni* y de 100% en ambos casos para *H. virescens*, por lo que respecta a la cepa HD-73 clave FR246C36 su actividad tóxica presentada fué de 33.2 % en la primera concentración y de 100% en la segunda contra el insecto *T. ni*, y para *Heliothis virescens* se mantuvo igual que la anterior con un 100% de mortalidad. Al presentar mayor actividad contra *H. virescens* se hacen estos extractos más atractivos, debido a la resistencia que presenta éste lepidóptero.

En cuanto al medio de producción se puede decir que se redujo significativamente la composición, ya que la fuente de carbono original (dextrosa) se empleó en concentración de 30g/l y la requerida en éste trabajo es de 1.5 g/l con una utilización del 85 %, quedando sin utilizarse solo 15 % de dicha fuente, por lo que respecta a la fuente de nitrógeno también hubo una reducción en menor grado de 30 a 20 g/l. Esto permite hacer factible el proceso. Además se propone un medio de cultivo en base a melaza, que resultó ser más económico y con el cual su producción, rendimiento y actividad tóxica no mostró diferencias comparado con el antes mencionado, obteniéndose el mismo producto en ambos casos .

En relación al proceso de producción del bioinsecticida, se redujo el tiempo del proceso de 42 a 30 h, beneficiando esto el costo del proceso, así como la disminución de riesgos de contaminación. Cabe señalar que el pH de 8 no afecta la toxicidad del extracto, permitiendo tener un rango más amplio de control y no restringirlo a un valor neutro (7).

Se vió la ventaja de utilizar el medio de cultivo total y obtener excelentes resultados, que los obtenidos por el método de extracción lactosa-acetona, ya que no muestra diferencias y en ambos casos el efecto del cristal es mostrado al utilizarse en concentraciones similares, esto permite innovar una tecnología que permita conservar viable el extracto por períodos de tiempo largo eliminando el proceso de lactosa-acetona el cual es sumamente caro.



Los logros más importantes del presente trabajo fueron los siguientes:

- Se establecieron criterios para la selección de extractos almacenados activos contra lepidópteros.
- Se encontró una cepa que resultó ser tan tóxica y/o superior contra *T. ni* y *H. virescens* con relación a los productos comerciales.
- La aplicación de métodos estadísticos para la evaluación de la producción del bioinsecticida.
- Se determinaron y evaluaron las características fisicoquímicas del reactor necesarias para la elaboración de extractos, de acuerdo a la cepa HD-1 clave FR215F42.
- Los resultados mostraron que tanto a nivel de matraz como a nivel fermentador de 14 l., el comportamiento de la bacteria es el mismo. Esto sirve de referencia para en estudios posteriores de escalamiento.

Finalmente, la hipótesis planteada es cumplida, por el hecho de haber encontrado extractos de fermentación almacenados tan tóxicos como los productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* HD-1 contra los insectos probados, así como la selección de un medio de cultivo accesible en la región y por consiguiente de menor costo que el medio propuesto originalmente por Dulmage, 1980.

Consideramos que la información generada a través de este estudio cubrió las expectativas planteadas.

## RECOMENDACIONES

- Rediseñar el medio de cultivo E-6 :
  - Disminuir el contenido de melaza ó
  - Aumentar el tamaño de inóculo para una utilización completa de la fuente de carbono; o bien
  - Implementar un método de recuperación que permita utilizar de nuevo los nutrientes no utilizados (extracción de melaza).
- Realizar pruebas de toxicidad a los extractos obtenidos en diferentes períodos de tiempo, que nos permitan observar como ocurre el descenso de la actividad insecticida.
- Utilizar como estándar internacional al extracto HD-1 recuperado, ya que mostró estabilidad después de 15 años de almacenamiento.
- Probar otros extractos de la colección internacional de bacilos entomopatógenos en los medios E-5 y E-6, parra observar si es recuperable en ellos la actividad tóxica.
- Se recomienda poner énfasis en el efecto del pH, ya que la adición de éste incrementa costo y riesgo de contaminación.
- Efectuar bioensayos de los extractos obtenidos contra otros insectos blanco como: *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella*, etc.
- Eficientizar el consumo de oxígeno, al disminuir el O<sub>2</sub> disponible en el fermentador, donde los valores de aireación y agitación sean bajos, para que el oxígeno suministrado sea consumido en un 80%, con un rango de error del 20%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aizawai, K. 1971.** Strain improvement and preservation of virulence of pathogen. En: Microbial control of insect and mites, Burges D. y H. Hussey (ed.), Academic, Press, London. pp 655 - 672.
- Aizawai, K. 1978.** Recent development in the utilization of *Bacillus thuringiensis* preparations in Japon. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis*. Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China, Octubre 14-18.
- Anderson, T. B. 1990.** Effects of carbon: nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal crystal protein. London, Ontario, Canadá. M.E.Sc. p 193.
- Arcas, J.; O. Yantorno; E. Arraras and R. Ertola. 1984.** A new medium for growth and delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biotechnol. Lett. 6 8 : 495 - 500.
- Aronson, J. N. 1976.** Ammonia assimilation and glutamate catabolism by *Bacillus thuringiensis*. En "Microbiology-1976". (Schlesinger, D. De.) American Society for Microbiology, Washington D.C. p. 444 - 449.
- Barak, B., Zaritsky, A. and J. Margalit. 1988.** The fate of *B. t.* (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*) in the natural habitat. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis* Hubei. Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China. October 14 - 18.
- Burges, H. D. 1969.** Control of insects by *Bacillus thuringiensis*. Proc. 5th. Br. Insectic Fungic. Conf. p : 405 - 411.
- Beegle, C. C. 1979.** Use of entomogenous bacteria in agroecosystems. Development in Industrial Microbiology 20 p: 97 - 104.
- Benz, G. A. 1986.** Introduction: Historical Perspectives. En: R. R. Granados and B. A. Federici (Eds.) The Biology of Baculovirus, Vol. 1. CRC Press. Boca Raton, Florida. p: 1- 35.
- Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F. 1990.** Baculovirus Diversity and Molecular Biology. Annu. Rev. Entomol. 35: 127 - 155.
- Brooks, W. M. 1988.** Entomogenous Protozoa. En: C. M. Ignoffo (ed.) Entomogenous Protozoa and Fungi. Microbial Insecticides. Vol: V Part A. CRC Handbook of Natural Pesticides. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. p: 1 - 149.

- Buchner, G. E. 1960.** Potencial bacterial pathogens of insects and their characteristics. *J. Insect Pathol.* **2**: 172 - 195.
- Burgeron, A. and Dulmage, H. T. 1977.** Industrial and Internacional standarization of microbial pesticides *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga.* **22**: 121 -129.
- Burges, H. D. and Thompson, E. M. 1971.** Standarization and assay of microbial insecticides. En: *Microbial control of insects and mites*. H. D. Burges and N. W. Hussey, ed. London. p: 591 - 622.
- Burges, H. D., Thompson and Latchford. 1976.** Importance of spore and  $\delta$ -endotoxin protein crystal *Bacillus thuringiensis* in *galleria mellonela*. *J. Invertebr. Pathol.* **27** : 87 - 94.
- Burges, H. D. 1986.** Impact of *Bacillus thuringiensis* on pest control with emphasis on genetic manipulation. *J. Mircen.* **2** : 101 - 120.
- Cantwell, E. G.; Heimpel, A. M. and Thompson, M. J. 1964.** The production of an Exotoxin by various Crystal forming Bacterial Related to *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol.* **6**: 466 - 480.
- Cantwell, E. G. 1982.** Activity of a Thermostable Exotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* in the *Salmonella*/Microsomal Assay for the Bacterial Mutagenicity. *J. Invertebr. Pathol.* **40**: 350 - 358.
- Carlberg, G. 1973.** Biological Effects of the Thermostable beta exotoxin produced by differents serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Academic Disertation for Public Criticism, Univ. of Helsinki.
- Carlton, B. C., Gawron-Burke, C. and Johnson, T. B. 1990.** Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new bioinsecticides. Abstracts of V<sup>th</sup> International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaida, Australia. p : 18 - 22.
- Carter, L. J. 1971.** Use of bacteria for microbial control. En: *Microbial control of insects and mites*. Burges, H. D. and N. W. Hussey (ed.) Academic Press, N. Y.
- Carter, L. J. 1976.** Pest control: NAS panel warns of possible technological breakdown. *Science* **91**: 836 - 837.
- Couch, T.L. and Ross, D. A. 1980.** Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechn. and Bioeng.* **22** : 1296 - 1304.
- Crueger, W. and Crueger, A. 1989.** *Biotechnology. A textbook of industrial Microbiology.* Sinauer Associates. Sunderland MA. p : 338 - 340.

**Deacon, J. W. 1983.** Microbial control of plant pest and diseases. Aspects of Microbiology. Amer. Soc. for Microbiology Washington, U.S.A.

**De Barjac H. and Lecadet, M. R. 1976.** Dosage Bioquimique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN polymerases bacteriennes (Note) C. R. Acad. Sc. Paris.

**De Barjac, H. 1978.** Une nouvelle veriete de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* serotype 14. R. Acad. Sc. Paris. T. 268, D : p 797 - 800.

**De Barjac, H and E. Frachon. 1990.** Clasification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga. 35 2 : 233 - 240.

**De la Garza Lopez, Samuel. 1984.** *Bacillus thuringiensis* como agente de control microbiológico de insectos plagas. Facultad de Cienncias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N.L., México. (Tesis de licenciatura, inédita).

**Delmas Mata, Juan Teodoro. 1985.** Efecto de la adicción de la fuente de carbono en la germinación de esporas de *Bacillus thuringiensis* en suelo. Facultad de Cienncias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N.L., México. (Tesis de licenciatura, inédita).

**Demain, A. L. and Solomon N. A. 1986.** Industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

**Dharmstithi, S. C.; Pantuwatana, S. and Bhumiratana, A. 1985.** Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1583 on media using a by product from a monosodium glutamate factory. J. Invertebr. Pathol. 46: 231 - 238.

**Dixon, B. 1991.** *Bacillus thuringiensis* toxins studied. Bio/Technology. 9 : 415.

**Douglas, W. R. 1969.** Automatic assesment of respiration during growth in stirred fermentors. Americann Soc. for Microbiol, Washintong. 18: 438 - 443.

**Dubois, J. R. 1968.** Laboratory batch produccion of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. Appl. Microbiol. 16: 1098 - 1099.

**Dulmage, H. T. 1970.** Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. J. Invertebr. Pathol. 15 : 230 - 239.

**Dulmage, H. T. 1970.** Production of the spore-endotoxin complex by variants *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 16 : 385 - 389.

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

**Dulmage, H. T. 1971.** Production of d-endotoxina isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3 in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol. **18** : 353 - 358.

**Dulmage, H. T. and Rhodes. 1971.** Producción of pathogens in artificial medium. En: Microbiaal control of insects and mites. (Burgess, H. D. and N. W. Hussey, ed.). Acad. Press.

**Dulmage, H. T. 1973.** Assay and standarization of microbial insecticides. Annals of the New York. Academic of Science. **217** : 187 - 199.

**Dulmage, H. T. and De Barjac, H. 1973.** HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of d-endotoxina. J. Invertebr. Pathol. **22** : 273 - 277.

**Dulmage, H. T. 1975.** The Sytandarization of Formulation of the d-endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **25**: 279 - 281.

**Dulmage, H. T. 1976.** Bioassay of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxina using the tobacco budworm. Tecn. Bulletin No. 1528 U.S. Rept. of Agricult. U.S.A. 1 - 15.

**Dulmage, H. T. and Orlin. 1977.** A proposed standarized bioassay formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. J. Invertebr. Pathol. **18** : 240 - 245.

**Dulmage, H. T. and Aizawai, K. 1980.** Distribution of *Bacillus turingiensis* in nature. Published by U.S.D.A., Brownswille, Texas, U.S.A. No. 4 : 209 - 236.

**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. Allanhed, Osmun and Co., Totowa, N.J. **5** :129.

**Dulmage, H. T. and Aizawai, K. 1982.** Distributions of *Bacillus thuringiensis* in nature. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker. New York, N. Y. p209- 237.

**Dulmage, H. T. and Clayton C. Beegle, Huguette de Barjac, Delores Reich and Gaild Donaldson, Janina Krywreezyle. 1982.** *Bacillus thuringiensis* cultures availables from the U. S. Departament of Agriculture, Agricultural Research Service, Agricultural Reviews and Manuals. ARM-S 301 October 1982.

**Dulmage, H. T. 1982.** Aspect of the Industrial production of Microbial Insect control agents. Insect pathology and microbial control. **IV-2**: 120 - 124.

**Dulmage, H. T. 1989.** Production and use of *Bacillus thuringiensis* perspective from, 1989. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. Río de Janeiro. Supl. III. **84** : 113 - 122.

**Dunn, P. H. 1960.** Control of house flies in bovine feces by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect. Pathol.* **2**: 13 - 16.

**Edlund, T., Siden, L. and Boman, H. G. 1976.** Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. *Infect. Immun* **14** : 934 - 941.

**Falcon, L. A. 1971.** Use of bacteria for microbial control. En: *Microbial control of insect and mites*. Burges, H. D. y N. W. Hussey (eds.) Academic Press, N. Y.

**Faust, R. M. and Bulla. 1982.** Bacteria and their toxins as insecticides in microbial and viral pesticides. De. Edouard Kurstaki. Marcel Dekker, New York, N. Y. **3** : 75 - 206.

**Farkas, J.; Sebasta, K.; Horska, K.; Samek, Z. and Sorm, F. 1976.** Structure of *thuringiensis*, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **42**: 909.

**Foda, M. S., Salama, H. S. and Selim, M. 1985.** Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22** : 50 - 52.

**Freese, E. and Fujita Y. 1976.** Control of enzyme synthesis during growth and sporulation. En "Microbiology-1976". (Schlesinger, D. de.). American Society for Microbiology, Washington. D. C. p 164 - 168.

**Frost and Sullivan. 1990.** Biopesticides: A technology impact report, Frost & Sullivan Inc. New York, N. Y. p : 1 - 341.

**Gabriel, C. J. and Cook, C. R. 1990.** Biological control the need for new scientific framework. *Biofeedback Bioscience.* **40** : 204 - 207.

**Galán-Wong, L., Donalson, G., Dulmage, H. T. y Rodríguez Padilla, C. 1982.** Serotipos de *Bacillus thuringiensis* aislados del suelo. XIII Congreso Nacional de Microbiología, Guanajuato, Gto., México.

**Galán, W. L. y Rodríguez, P. C. 1989.** Bioinsecticidas, Microbiología Industrial para su producción. *Información Científica y Tecnológica.* **11** : 44 - 47.

**Galán Wong, L. J. 1993.** Selección de cepas nativas y extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Huber) y *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidóptera: Noctuidae). Facultad de Ciencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N.L., México. (Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología, Inédita).

- García, R., Des Roches, B. and Tozer, W. 1981.** Studies of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito larvae and other organisms. Proc. Calif. Mosq. Vector. Contr. Assoc. **49** : 25 - 29.
- Gill, S. A., Dai, S. M., Chang, C., Georghiou, G. P. and Chow, E. 1989.** Mosquito resistance to the 72 kDa toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Mosquito control research, Annual Report, University of California.
- Goldberg, L. and Margalit, J. 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.
- Goldberg, L., Sneh B., Battat, E. and Klein, D. 1980.** Optimization of medium for high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisdu. Biotechnol. Lett. **2** : 419 - 426.
- Granados, R. R. 1981.** Simposium de insecticidas microbiológicos. Resumen del IV Simposio sobre parasitología agrícola. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, N.L., México. p : 8.
- Granados, R. R.; Dwyer, K. G. and Derksen, A. C. G. 1987.** Production of viral insecticides in invertebrate cell culture. En: K. Maramorosch (De.) Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. Academic Press. New York. p: 167 - 181.
- Heimpel, A. M. 1967.** A taxonomic key proposed for the species of the "Crystalliferous Bacteria". J. Invertebr. Pathol. **9**: 364 - 375.
- Heimpel, A. M. and Angus, T. A. 1963.** Diseases caused by creating spore-forming bacteria. En: Steinhaus E. A. (eds.) *Insect Pathology and Advances Treatise*, New York. **2**: 21 -73.
- Henry, J. E. 1971.** Experimental application of *Nosema lacustae* for control of grasshoppers. J. Invert. Pathol. **18**: 389 - 394.
- Hernandez Mendoza, J. L. 1984.** Patogenicidad de cinco cepas de *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda*, al utilizar medios de cultivo en base de agua de coco. Facultad de Ciencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N. L. México. (Tesis inédita).
- Herrnstadt, C., Soares, G. G., Wilcox, E. R. and Edwards, D. L. 1986.** New strains of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. Biotechnology. **4** : 305 - 309.
- Hofte, H. and Whiteley, H. R. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Reviews. **53** : 242 - 255.



**Ignoffo, C. M. and Hink, W. F. 1971.** Propagation of arthropod pathogens in living system en: *Microbial control of insects and mites*. Burges, H. D., N. W. Hussey (ed). Academic Press. New York.

**Ignoffo, C. M. and B. Gregory. 1972.** Effects of *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin on larval mutation, adult longevity, fecundity and egg viability in several species of Lepidoptera. *Entomological Society of America* **1**: 269 - 272.

**Ignoffo, C. M. 1974.** Microbial control of insects: Viral pathogens en: *Proceedings of the summer institute on biological control of plant insects and diseases*. Maxwell, F. G. y F. A. Harris (ed.) Jackson: Univ. Mississippi.

**Ignoffo, C. M. and Couch, T. L. 1981.** The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* Species as a microbial insecticide. En H. D. Burges (De.) *Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980*. Academic Press. New York. p: 330 - 362.

**Jain, D. and Bukland, B. C. 1988.** Scale-up of the eritromicin fermentation using a computer-controlled pilot plant. *Bioprocess Eng.* **31** : 31 - 36.

**Jamieson, K. B. 1990.** Thirty years of *Bacillus thuringiensis*. Research pay of bulletin. De L'Institut pour la repression des ravageurs. Forestiers, Canada. **9** : 2 - 7.

**Johanson, E. Donovan. 1978.** Inhibition of RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by beta exotoxin. *Can. J. Microbiology.* **24**: 537 - 543.

**Jutsum, A. R. 1988.** Comercial application of biological control: Status and prospects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **318** : 357 - 373.

**Kahkonen, M.; Gripenberg, U.; Carlberg, G. and Sorsa, M. 1979.** Mutagenicity of *Bacillus thuringiensis* exotoxin III. Sister Chromatid Exchange in Rats in vivo. *Hereditas.* **91**: 1 -3.

**Kenney, D. S. and Couch, T. L. 1981.** Biological control in crop production. Beltsville Symposia in Agncultural Research. **5** : 161 - 180.

**Knowels, B. H. and Ellar, D. J. 1987.** Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta* **924**: 509 - 518.

**Krieg, V. A. 1969.** In vitro determination of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* and related bacilli. *J. Invertebr. Pathol.* **15**: 313 - 320.

**Krieg, A. and Langenbruch, G. A. 1981.** Suceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. En *Microbial control of pest and plant diseases*, H. D. Burges (ed.), Academic Press, London. p : 837.

**Krieg, A., Huger, A., Langenbruch, G. and Schnetter, W. 1983.** *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*: A new pathology effective against larvae of coleoptera. J. Appl. Entomol. **96**: 500 - 508.

**Krieg, A., Huger, A. M., Langenbruch, G. A. and Schnetter, W. 1984.** Nene ergebniss uber *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* unter besonderer Berncksichtigny seiner wirkung anf den kartofel kafer (*Leptinotarsa decemlineata*) Ang. Schadhingskde, Pflanzenschute, Umwestschutz. **57** : 145 - 150.

**Krieg, A. and Miltenburger, H. G. 1984.** Bioinsecticides: *Bacillus thuringiensis* Adv. in Biotechnological Processes. **3** : 273 - 290.

**Krieg, W., Schnetter, A. N., Huger and Langenbruch, G. A. 1987.** *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis*, strain. Bl 256-82: A third pathotype within the H serotype 8a8b. System. App1. Microbiol. **9** : 138 - 141.

**Kume Takashi, Taguchi Ryo and Hiroh Ikezawa. 1991.** Action of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* is significantly influenced by coexisting lipids in substrate-detergent micelles. Chem. Pharm. Bull. **39** : 2063 - 2069.

**Lambert, B. and Peferoen, M. 1992.** Insecticidal promise crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Bio/Science. **42** : 112 - 122.

**Lecadet, M. and De Barjac H. 1975.** *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin. Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Davidson De. Chapter 11.

**Linnainmma, K.; Sorsa, Maarja; Carlbere, G.; Gripenberg, U. and Meretoja, T. 1977.** Mutagenicity of *Bacillus thuringiensis* exotoxin. Hereditas. **85**: 113 - 122.

**Luthy, P. 1980.** Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. **8** : 1- 7.

**Luthy, P. and Ebersold, H. R. 1981.** The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Pharmac ther pergamon press. Great Britain. **13**: 257 - 283.

**Maldonado, B. M. G. 1981.** Producción de bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis* GM-i utilizando tres diferentes medios de cultivo. Facultad de Cencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N. L. México (Tesis inédita).

**Marec, F. C. Matha and Weiser, J. 1989.** Analysis of Genotoxic Activity of *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin by means of the Drosophila wing spot test. J. Invertebr. Pathol. **53**: 347 - 355.

**McCoy, C. W.; Samson, R. A. and Boucias, D. G. 1988.** Entomogenous Fungi En: C. M. Ignoffo (Ed.) Entomogenous Protozoa and Fungi. Microbial Insecticides. Vol. V, Part A. CRC Handbook of Natural Pesticidews. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. pp: 151 - 236.

**Meadows, J., Grill, S. S. and Bone, L. W. 1990.** *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *turbatrix acetii*. Invertebr. Reprod. Dev. 17 : 73 - 76.

**Medrano-Roldán, H., Casillas, Solís, Pérez, Sifuentes S., Reveles, V., Galán-Wong, L. J., Rodríguez-Padilla, C. y García Guitiérrez, C. 1987.** Production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis* HD-1 al pilot plant level and its use on insect pest maize *Spodoptera fugiperda*. 4th European Congress on Biotechnology. Bruselas Bélgica.

**Medrano-Roldán, H., Solís, H., Pérez, Casillas, Vega, Córdoba, Peraza, García, Rodríguez-Padilla, C. y Galán-Wong, L. J. 1988.** Production of bioinsecticide from a native *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* and its applications against insect pest maize *Spodoptera frugiperda*. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis*. Whuan, Republic of China. October 14 al 18.

**Medrano-Roldán, H. 1992.** Estudio sobre los parámetros de fermentación de importancia industrial durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 para la producción de bioinsecticidas. Tesis doctoral inédita. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.

**Metcalf, C. L. y Flint, W. P. 1982.** Insectos destructivos e insectos útiles: su costumbre y su control. 15a. edición Editorial Continental. México. p : 670 y 749.

**Moresi, Mauro and Patete Michele. 1988.** Prediction of  $K_{La}$  in conventional stirred fermentors. J. Chem. Tech. Biotechnol. 42 : 197 - 210.

**Moroës, O. and Chaib. 1978.** Bioassay for microbial insecticide. Process Biochem. pp : 23 - 24.

**Murga G. M. A. 1983.** Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-2 en diferentes medios de cultivo. Facultad de Ciencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey , N. L. México. (Tesis inédita).

**Nickerson, W. K. and Bulla L. 1974.** Physiology of bacteria associated with insects: minimal nutritional requeriments for growth, spolutation; and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. 28 (1): 124 - 128.

**Nordlung, D. A. 1984.** Biological control with entomophagous insects, J. Ca. Entomol. Soc. 19: 14 - 27.

**Norris, J. R. 1978.** Microbial control of pest insects. En: Companion to microbiology, Bull and Meadow (eds.), Longmang. p : 459 - 480.

**Ode, P. E. and Matthyse, J. G. 1964.** Feed additive larvaciding to control face fly. J. Econ. Entomol. 57 : 637.

**Ohba, M. and Aizawa, K. 1989.** New flagellar (H) Antigenic Subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 with description of two new subspecies, *Bacillus thuringiensis* subsp. *sumiyoshiensis* (H serotype 3a:3d) and *Bacillus thuringiensis* *fukuokaensis* (H serotype 3a:3d:3e). J. Invertebr. Pathol. 54: 208 - 212.

**Olvera Carranza, C. 1992.** Toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith) y *Spodoptera exigua*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México (Tesis inédita).

**Palacios Cortés, L. L. 1993.** Aspectos de la fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* a nivel de planta semi-piloto. Tesis de Maestría (inédita). Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.

**Panda, B. B.; Sahu, R. K. and Sharma, C. B. S. R. 1979.** Selective Clastogenesis and Spindle Inhibition in some plant mitotic systems by the exotoxin and the ineffectiveness of the delta endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis*. Mutation Research. 67: 161 - 166.

**Payne, C. C. 1988.** Insect pest management concepts: The role of biological control. In: Biotechnology biological pesticides and novel plant. Pest resistance for insect pest management, Roberts D. W. and R. R. Granados (ed.), Proceeding of the Center Boyce Thompson Institute for Plant Research. Cornell University, U. S. A. July. p : 1 - 7.

**Pearson D. and Ward, O. P. 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.

**Pendleton, I. R. 1969.** Insecticides of crystal forming bacteria. Process. Biochem. p : 29 - 32.

**Peña Wing, Dinorah Georgina. 1993.** Optimización de las condiciones operacionales de un proceso de fermentación de *Bacillus thuringiensis* variedad *aizawai* a nivel planta semipiloto . Facultad de Ciencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N.L., México. (Tesis de licenciatura, inédita).

**Prasad, S. and Shetna, Y. I. 1976.** Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Rev. 47 : 70 - 77.

**Prasad, S. and Shetna, Y. I. 1976.** Mode of action of a purified protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma. Cells. Antimicrob. Agents and Chemoth. 10 : 293 - 296.

**Publicación Técnica. 1980.** División Agrícola de Bayer de México, S. A. Agosto.

**Quintero Zapata, I. 1994.** Optimización de un medio de fermentación a base de malaza para dos diferentes serovariedades de *Bacillus thuringiensis* activas contra larvas de *Trichoplusia ni* (Huber). Facultad de Ciencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N.L., México. (Tesis de licenciatura, inédita).

**Remington, A. 1989.** The production and use of microbial pesticides in the URSS. *Int. Ind. Biotechnol.* 9 : 10 - 14.

**Roberts, D. W.; Fuxa, J. R.; Gaugler, R.; Goettel, M.; Jaques, R. and Madox, J. 1991.** Use of pathogens in insect control. En: D. Pimentel (De.) *Handbook of Pest Management in Agriculture*, 2nd De. Vol. 2. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. p: 243 - 278.

**Rodríguez, M. M., M. de la Torre, M. & E. de Urquijo, N. 1991.** *Bacillus thuringiensis*: Características biológicas y perspectivas de producción. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 33 : 279 - 292.

**Rodríguez, P. C.; Galán, W. L. J.; De Barjac, H.; Roman, C. E.; Tamez, G. R. S. and Dulmage, H. T. 1990.** *Bacillus thuringiensis* subsp. *neolonensis* serotype H-24: a New subspecies with produce triangular crystal. *J. Invertebr. Pathol.* 56 : 280 - 282.

**Rodríguez-Padilla, C. y Galán-Wong, L. J. 1992.** Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos: Catálogo de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. Monterrey, N.L., México.

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

**Rogoff, M. H. and Yousten, A. A. 1969.** *Bacillus thuringiensis* microbiological considerations. *Annual Rev. Microbiol.* 23 : 357.

**Rowe, G. E. and Margaritis, A. 1987.** Bioprocess developments in production of Bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. En: *Critical Reviews in Biotechnology*, G. G. Stewart and Inge Rusell (ed.), CRC Press. Boca Ratón, Florida. 6 : 87 - 123.

**Rowe, G. E. 1990.** Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London. Ontario. Canadá. Ph. Doc. p: 295.

**Rupper, M. J., Donovan, W. P., Groat, R. G., Slaney, A. C., Mattison, J. W., Johnson, J., Charles, F. Dumanoir, V. C. and De Barjac, H. 1991.** Two novel strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3337 - 3344.

**Salama, H. S.; Foda, M. S.; Dulmage, H. T. and Elsharsby. 1983.** Novel fermentation media for production of d-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 8 -19.

**Sakarova, Z. V.; Ignatenko, Yu N.; Khourychev, M.P.; Likov, V. P.; Rabotnova, Y. L. and Shevtson. V. V. 1984.** Sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* with growth limitation via the nutrient sources. *Microbiology* 53 (2): 221.

**Sánchez Novoa, Alberto. 1985.** Propagación y toxicidad de *Bacillus thuringiensis* (GM-1 a GM-19) en un medio a base de melaza contra *Spodoptera frugiperda* y *Heliothis virescens*. Facultad de Ciencias Biológicas. U. A. N. L. Monterrey, N.L., México. (Tesis de licenciatura, inédita).

**Scherrer, P., Luthy, P. and Trumphy, B. 1973.** Production of d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentration. *Appl. Microbiology*. 25 : 644 - 646.

**Sebasta, K. & Horska, K. 1968.** Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*. *Biochem. Biophys.* 164 : 281 - 282.

**Sebasta, K., Horska, K. and Ankova, J. 1969.** Inhibition of the novo RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Collect. Czach. Chem. Commun.* 34 : 891.

**Sebasta, K.; Farkas, J.; Horska, K. and Vankov, J. 1981.** Thuringiensin, the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. En "Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980". (Burges, H.D. de.). Acad. Press London. p: 249 - 282.

**Sherman, K. E. 1985.** Considerations in the large-scale and commercial production of viral insecticides. En: K. Maramorosch and K. E. Sherman (ed.) *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press. New York. pp: 757 - 774.

**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.

**Sneath Peter, H. A. 1986.** *Bergey's Manual of Systematics, Bacteriology*. Williams & Wilkins Baltimore. 2: 1104 - 1135.

**Solama, H. S., Foda, M. S., Dulmage, H. T. and El Sharaby A. 1981.** Novel fermentation media for production of endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* p : 1 - 26.

**St. Leger, R. J.; Hajek, A. E.; Staples, R. C. and Roberts, D. W. 1992.** Fungi for the biocontrol of insects: Tools and trends. En: P. Tudzynski and U. Stahl (ed.) *Molecular Biology of Filamentous Fungic*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, FRG.

**Stairs, G. R. 1971.** Use of viruses for microbial control of insects en: *Microbial control of insects and mites*. Burges, H. D. and N. W. Hussey (ed.). Academic, Press. New York.

**Stanbury, P. F. and Whitaker. 1984.** Media for industrial fermentation. *Principes of fermentation technology*. Pergamon Press, London. p : 78 - 192.

- Thompson, M. 1992.** Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent. Application number: 91305048.0. Publication number: 0461799A3.
- Undeen, A. H. and Nagel, W. L. 1978.** The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Golberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. Mosq. News. **38** : 524 - 527.
- Valenzuela, L. E. 1987.** Microorganismos entomopatógenos, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Wolfenbarger Dan A.; Guerra, A.; Dulmage, H. T. and García R. D. 1972.** Properties of the beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis* IMC 10 001, against the Tobacco Budworm. J. of Economic Entomology. **65** (5): 1245 - 1248.
- Young, T. K. and Huang, H. T. 1970.** The beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **15**: 100 - 108.
- Zar J. H. 1984.** Bioestatistical Analysis. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N. J. p: 718.

## APÉNDICE

**Cuadro 1A.** Análisis de varianza del efecto de la toxicidad en los 7 extractos de *Bacillus thuringiensis* punto de partida en la investigación.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	70,997.30	6	11,832.88	11.96	0.0000
Dentro gpo.	76,137.14	77	988.79		
Total (corr.)	147,134.48	83			

Nota: G.L.: grados de libertad

Prob. error :Probabilidad de error

**Cuadro 2A.** Pruebas de  $X^2$  del efecto de la dosis e insecto con respecto a los 7 extractos seleccionados de cepas de *B. thuringiensis*.

Parámetros a evaluar	g. de libertad	$X^2$ calculada	$X^2$ teórica
Dosis 50 $\mu$ g/ml	6	65.1983	12.5916
Dosis 500 $\mu$ g/ml	6	43.0149	43.0149
Insecto <i>Trichoplusia ni</i>	13	151.9482	22.3620
Insecto <i>Heliothis virescens</i>	13	87.2966	22.3620

Nota: g de libertad: grados de libertad.

**Cuadro 3A.** Análisis de varianza que del efecto del consumo de azúcares en los diferentes medios de cultivo con la cepa *B. thuringiensis* cepa HD-1.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	9,297.95	13	715.23	30.14	0.0000
Dentro gpo.	627.60	28	22.41		
Total (corregido)	9,952.58				

Nota: G.L.: grados de libertad

Prob. error :Probabilidad de error



**Cuadro 4A.** Análisis de varianza del comportamiento del consumo de azúcares en los 14 medios de cultivo probados con la cepa *B. thuringiensis* HD-73

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	6,458.35	13	496.79	7.12	0.0000
Dentro gpo.	1,952.58	28	69.73		
Total (corregido)	8,410.94	42			

Nota: G.L.: grados de libertad  
 Prob. error :Probabilidad de error

**Cuadro 5A.** Análisis de varianza del efecto del pH en los medios de cultivo utilizando la cepa *B. thuringiensis* HD-1

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	10.64	13	0.81	11.61	0.0000
Dentro gpo.	1.97	28	0.07		
Total (corregido)	12.61	41			

Nota:G.L.: grados de libertad  
 Prob. error :Probabilidad de error

**Cuadro 6A.** Análisis de varianza del pH en los medios de cultivo donde se propagó la cepa *B. thuringiensis* HD-73

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	14.13	13	1.08	6.96	0.0000
Dentro gpo.	4.37	28	0.15		
Total (corregido)	18.51	41			

Nota:G.L.: grados de libertad  
 Prob. error :Probabilidad de error

**Cuadro 7A.** Análisis de varianza de la cepa *B. thuringiensis* HD-1 para mostrar el efecto de producción en los medios de cultivo probados.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	801.73	13	61.67	5.95	0.0000
Dentro gpo.	290.16	28	10.36		
Total (corregido)	1,091.89	41			

Nota: G.L.: grados de libertad Prob. error :Probabilidad de error

**Cuadro 8A.** Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa *B. thuringiensis* HD-1 analizando la producción en los medios de cultivo.

Medios de cultivo	Grupos estadísticos
E-11	a
E-4	a
E-9	a
E-7	ab
E-3	ab
E-13	abc
E-5	abc
E-6	abc
E-1	bcd
E-10	cd
E-2	cd
E-8	de
E-12	de
E-14	de

**Cuadro 9A.** Análisis de varianza de la cepa *B. thuringiensis* HD-73 para observar el efecto de la producción en los medios de cultivo probados.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	801.73	13	61.67	5.95	0.0000
Dentro gpo.	290.16	28	10.36		
Total (corregido)	1,091.89	41			

Nota: G.L.: grados de libertad

Prob. error : Probabilidad de error

**Cuadro 10A.** Prueba de comparación de medias de Tuckey para la cepa *B. thuringiensis* HD-73 donde se compara la producción obtenida en los medios de cultivo analizados.

Medio de cultivo	Grupos estadísticos
E-2	a
E-5	ab
E-7	abc
E-11	abcd
E-1	bcde
E-9	cdef
E-13	def
E-3	ef
E-4	efg
E-8	fg
E-10	gh
E-6	gh
E-12	h
E-14	h

**Cuadro 11A.** Análisis de varianza del efecto de rendimiento en la cepa *B. thuringiensis* HD-1 al utilizar 14 medios de cultivo.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	0.9742	13	0.3621	999.99	0.0000
Dentro gpo.	0.0029	28	0.0002		
Total (corregido)	0.9771	41			

Nota: G.L.: grados de libertad

Prob. error :Probabilidad de error

**Cuadro 12A.** Análisis de varianza del efecto de rendimiento en la cepa *B. thuringiensis* HD-73 al propagarse en 14 diferentes medios de cultivo.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado Medio	F calc.	Prob. error
Entre gpo.	4.7077	13	0.3621	999.99	0.0000
Dentro gpo.	0.0064	28	0.0002		
Total (corregido)	4.7142	41			

Nota: G.L.: grados de libertad

Prob. error :Probabilidad de error



