

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



PRODUCCION Y TOXICIDAD DE CEPAS NATIVAS DE  
Bacillus thuringiensis EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO  
PARA CONTROL DE INSECTOS PLAGA LEPIDOPTEROS

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA

Q.B.P. GABRIEL GALLEGOS MORALES

MONTERREY, N. L.

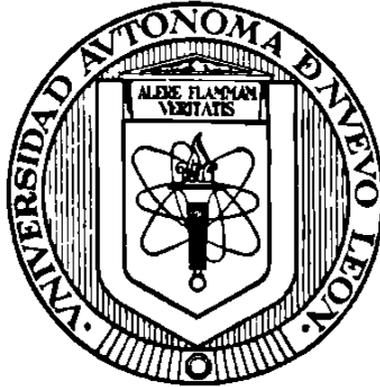
SEPTIEMBRE DE 1985





1080074524

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



PRODUCCION Y TOXICIDAD DE CEPAS NATIVAS DE  
Bacillus thuringiensis EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO  
PARA CONTROL DE INSECTOS PLAGA LEPIDOPTEROS

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA

Q.B.P. GABRIEL GALLEGOS MORALES

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1985

TM  
QR82  
B33  
173



ASESOR Y DIRECTOR DE

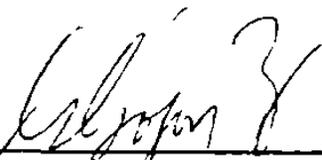
TESIS

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized letter 'L' followed by a series of loops and a final flourish.

---

Q.B.P. M.C. LUIS J. GALAN WONG

COMITE DICTAMINADOR  
DE  
TESIS



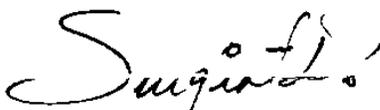
---

DR. GABRIEL BOJON ZORRILLA  
Presidente



---

M.C. JUAN M. CUEVAS MARTINEZ  
Secretario



---

M.C. SERGIO FERNANDEZ DELGADILLO  
Vocal



---

Q.I. YOLANDA M. GARCIA DE ROMERO  
Coordinador de la Maestría  
en  
Ciencias

AREAS DE TRABAJO:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y SUELO,  
FACULTAD DE CIENCIAS BILOGICAS, U.A.N.L.

LABORATORIO DE FERMENTACIONES Y BIOENSAYOS DEL  
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS - -  
UNIDOS DE NORTEAMERICA, EN BROWNSVILLE, TEX.

## RESUMEN

Para determinar la actividad tóxica que presentan dos cepas nativas de B. thuringiensis contra insectos lepidópteros, se produjeron estas cepas en 25 medios de cultivo, diseñados en base a melazas, subproductos de cítricos ó jugo de agave como fuente de carbono, harina de pescado o harina de soya como fuente nitrógeno y líquido de remojo de maíz (L.r.m.) ó Agua de cocimiento de levadura (A.C.L.) como fuente de cofactores de enriquecimiento, así como también sales minerales.

Al ensayar los extractos obtenidos de estos medios por bioensayos contra insectos lepidópteros (Heliothis virescens y trichohusia ni) se encontró que solo la cepa denominada como B. thuringiensis GM-1 poseía actividad insecticida contra estos insectos con mortandades de 20 a 100% en 500 ug del extracto de B. thuringiensis GM-1 por mililitro de dieta del insecto, no así para Bacillus thuringiensis GM-2 que resultó prácticamente atóxica para los insectos antes mencionados.

De los 25 medios de cultivo probados se encontró que los medios con clave E2 y E3, que poseen melazas, líquido de remojo de maíz ó agua cocimiento de levadura y carbonato de calcio son adecuados para producir bioinsecticidas de B. thuringiensis GM-1, dado que los extractos obtenidos de estos medios y probados contra los insectos antes mencionados, poseen mortalidades de 100% a 500 ug del extracto de B. thuringiensis GM-1 por ml. de dieta de ambos insectos.

## INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION .....	1
ANTECEDENTES .....	3
MATERIAL Y METODOS .....	15
RESULTADOS Y DISCUSION .....	19
CONCLUSIONES .....	24
LITERATURA CONSULTADA .....	26
APENDICE DE CUADROS .....	34
APENDICE DE FIGURAS .....	53
APENDICE DE GRAFICAS .....	59

INDICE DE CUADROS

		Página
CUADRO No. I.	Variedades de <u>Bacillus thuringiensis</u> .....	35
CUADRO No. II.	Descubrimiento de variedades de <u>B. thuringiensis</u> ....	36
CUADRO No. III.	Toxinas de variedades de <u>B. thuringiensis</u> .....	37
CUADRO No. IV.	Análisis de Aminoácidos de la -endotoxina de <u>B. thuringiensis</u> .....	38
CUADRO No. V.	Formulaciones comerciales de bacterias patógenas....	39
CUADRO No. VI.	Productos basados en <u>B. thuringiensis</u> .....	40
CUADRO No. VII.	Medios de cultivo para la producción de esporas y - cristales de <u>B. thuringiensis</u> .....	41
CUADRO No. VIII.	Medios de cultivo para la producción de esporas y -- cristales de <u>B. thuringiensis</u> GM-1 y GM-2.....	42
CUADRO No. IX	Medios de cultivo con jugo de agave como fuente de - carbono para producción del complejo insecticida es- pora-cristal de <u>B. thuringiensis</u> GM-1.....	43
CUADRO No. X	Medios de cultivo con jugo de agave como fuente de - carbono para producción del complejo espóra-cristal de <u>B. thuringiensis</u> .....	44
CUADRO No. XI	Medios de cultivo con melazas como única fuente de - carbono para la producción de la espóra-cristal de - <u>B. thuringiensis</u> GM-2.....	45
CUADRO No. XII	<u>B. thuringiensis</u> GM-1 al crecer en medios de cultivo con melazas.....	46
CUADRO No. XIII	<u>B. thuringiensis</u> GM-2 al crecer en medios de cultivo con melazas.....	47
CUADRO No. XIV	Cinética de fermentación de <u>B. thuringiensis</u> GM-1 en medios de cultivo con subproductos de cítricos.....	48
CUADRO No. XV	Cinética de fermentación de <u>B. thuringiensis</u> GM-2 en medios de cultivo con subproductos de cítricos.....	49
CUADRO No. XVI	Cuentas de esporas y actividad de la -endotoxina de <u>B. thuringiensis</u> GM-1 a partir de medios de culti- vo con melazas y subproducto de cítricos.....	50
CUADRO No. XVII	Cuenta de esporas y actividad de la -endotoxina de <u>B. thuringiensis</u> GM-2 a partir de medios con melazas y subproductos de cítricos.....	51

CUADRO No. XVIII Toxicidad de B. thuringiensis GM-2 crecido en me-  
dio con melazas o jugo de agave suplementados con -  
harina de soya. ....

## INDICE DE GRAFICAS

		Página
GRAFICA No. 1	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-1, en medios de cultivo A-1 y A-2.....	60
GRAFICA No. 2	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-1, en medios de cultivo A-3 y A-4.....	60
GRAFICA No. 3	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-1, en medios de cultivo E-1 y E-2.....	61
GRAFICA No. 4	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-2, en medios de cultivo A-2 y A-3 .....	61
GRAFICA No. 5	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-2, en medios de cultivo AE-4 y E-1.....	62
GRAFICA No. 6	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-2, en medios de cultivo E-2 y E-3.....	62
GRAFICA No. 7	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-1, en medios de cultivo D-1 y D-2.....	63
GRAFICA No. 8	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-1, en medios de cultivo C-1 y C-2.....	63
GRAFICA No. 9	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> GM-2, en medios de cultivo D-1 y D-2.....	64
GRAFICA No. 10	Consumo de Azúcares de <u>B. thuringiensis</u> en -- medios C-1 y C-2.....	64
GRAFICA No. 11	Cinética de <u>B. thuringiensis</u> GM-2 en medios - con jugo de agave al 1 %. .....	65
GRAFICA No. 12	Cinética de fermentación de <u>B. thuringiensis</u> GM-2 en medio de jugo de agave al 2 %.....	65
GRAFICA No. 13	Cinética de fermentación de <u>B. thuringiensis</u> en medio de Melazas 2% y líquido de remojo de Maíz.....	66
GRAFICA No. 14	Cinética de fermentación de <u>B. thuringiensis</u> GM-2 en medios con melazas al 2% y Agua de -- Cocimiento de Levadura. ....	66

## INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA I.-	Ciclo de Vida de <u>Bacillus thuringiensis</u> ..... 54
FIGURA II.-	Diagrama básico para la obtención del complejo -- bioinsecticida de <u>Bacillus thuringiensis</u> ..... 55
FIGURA III.-	Descripción general del Bioensayo..... 56
FIGURA IV.-	<u>Bacillus thuringiensis</u> GM-1 al microscopio elec-- trónico de transmisión aplicando la técnica de -- Tinción negativa con Acetato de Uranilo (18,512 -- Aumentos). ..... 57
FIGURA V.-	Corte longitudinal de <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-1 observado al microscopio electrónico de transmi-- sión (30.aumentos)..... 58
FIGURA VI.-	Corte longitudinal de <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-2 al microscopio electrónico de transmisión (30,000 aumentos). ..... 58

## INTRODUCCION

La producción de materiales biológicos para control de insectos plaga de importancia agrícola y salud pública, es actualmente una industria de suma -- importancia en Estados Unidos, URSS y Francia. Estos países producen una gran variedad de microorganismos patógenos de insectos: virus, hongos, bacterias y protozoarios (29).

Por su especificidad, seguridad y eficacia la mayor parte de los patógenos producidos en estos países son bacterias esporuladas, entre éstas destaca Bacillus thuringiensis a nivel comercial, dada la patogenicidad que posee la  $\delta$ - endotoxina que produce a Lepidópteros y Dípteros (29).

El desarrollo industrial de Entomopatógenos es una alternativa a los problemas provocados por insecticidas químicos (mutagénesis en vegetales, mamíferos, aves, peces y el hombre). Esta toxicidad ha originado incrementos de resistencia en los mismos insectos aunado a la poca o nula selectividad que -- poseen, dado que exterminan a los insectos benéficos e inhiben y matan a la ma yor parte de la microflora del suelo, responsable de la fertilidad del mismo.

Hoy en día el uso de Bacillus thuringiensis en el control de insectos se ha generalizado a nivel mundial para control de plagas agrícolas, forestales y de importancia en salud pública. Los productos comerciales de esta bacteria -- poseen el nombre de Dipel, Thurincide, Biotrol, Bactospeine, etc., que se dife -- rencian porque el Bacillus thuringiensis involucrado en su producción es de di -- ferente variedad. La demanda de éstos productos en el mercado cada día es ma -- yor. Hoy en día en los mismos países productores existe escasez del producto de aquí la relevancia de tener nuevas fábricas productoras.

En los estudios hasta hoy realizados con B. thuringiensis por diversos in -- vestigadores del mundo, se sabe que la toxicidad de este microorganismo depen -- de de la cepa, de la variedad involucrada, además del medio de producción (57). Dentro de esos parámetros se trabaja actualmente para lograr obtener productos comerciales más toxigénicos de B. thuringiensis que los que actualmente se pro --

ducen; con el uso de diversas materias primas existentes en el país donde se trabaja sobre éste tópicó.

En México existe escasez de investigación en el campo de control micro- - bial de patógenos, dada la influencia de pesticidas químicos y del poco o nulo conocimiento de los problemas provocados por ellos (mencionados anteriormente) de los que solo por accidente, riesgo de trabajo, ingestión o contacto, se - - tiene conocimientos, de aquí la relevancia de mostrar la eficacia que posee el control microbial por medio de B. thuringiensis sobre insectos fitopatógenos, la cual es comparable y en algunos casos superior al realizado con insectici- - das químicos, sin riesgo de toxicidad de ningún tipo. Por lo anterior en la presente investigación nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Propagar dos cepas nativas de Bacillus thuringiensis a nivel de laborato- - rio en medios de cultivo a base de melazas, jugo de agave o subproducto de cítricos como fuente de carbono.
  
- 2.- Determinar la toxicidad de los extractos de Bacillus thuringiensis contra insectos lepidópteros (Trichoplusia ni y Heliothis virescens).

## A N T E C E D E N T E S

### Generalidades.

La necesidad de buscar alternativas para controlar insectos-plaga disminuyendo el uso de insecticidas químicos, es una realidad hoy en día, dado los problemas ocasionados tales como; resistencia de los mismos insectos y daños ecológicos: toxicidad a suelos, plantas, ríos e incluso al hombre. El control por radiaciones sobre criaderos de insectos es en la actualidad uno de los métodos de mayor relevancia, pero por su metodología, sólo se utiliza en plagas muy específicas y su uso es muy restringido.

El control a través de microorganismos patógenos de insectos es de los más importantes, esto se debe a su mecanismo de acción, selectividad, especificidad y tecnología de producción, la cual generalmente se realiza a través de fermentaciones sumergidas, en propagación "in vivo" en insectos o bien en cultivos de células de ellos (Granados R. 1981). Cabe señalar que por su facilidad de producción y su alta toxicidad a insectos plaga, los bioinsecticidas que más se producen son bacterias y de éstas, Bacillus thuringiensis es de mayor uso en el mundo.

Historicamente el descubrimiento de éste microorganismo es atribuido a Ishiwata en 1901-1902 en Japón, quien lo aisló de larvas enfermas del gusano de seda (Bombyx morii) que presentaban una parálisis típica, denomina al bacilo aislado Bacillus sotto. El nombre de B. thuringiensis es dado por Berliner (1909-1912), quien aísla un bacilo idéntico al de Ishiwata, pero de las larvas enfermas de la "palomilla del mediterráneo" Anagasta kuhniella (Zeller) en Berlín, dentro del distrito de Thuringia, en Alemania, razón por la cual denomina al bacilo esporulado de este insecto como B. thuringiensis, aún sin conocer lo realizado por Ishiwata (29,30).

Años más tarde (1915) Aoki y Chagaski demuestran que la patogenicidad de la especie sotto (Ishiwata) se debe a una tóxima preformada en cultivo esporulados de esta bacteria, experimento que confirman Mitani y Watari en 1916 al aislar un filtrado tóxico de la especie sotto (Ishiwata) (29).

La descripción típica del cuerpo paraesporal de B. thuringiensis fue realizada por Berliner (1915) y Mattes (1927), al observar que cultivos en esporulación de esta bacteria producen una inclusión a parte de la espora, llamándolo "Restkörper" o Cuerpo de desecho". Berliner sugiere que éste cuerpo está formado por material celular no requerido para la formación de espora, que es esférico y su tamaño cambia hasta poseer una forma romboidal, observaciones — que Mattes en 1927 confirma, y añade que el crecimiento del cuerpo paraesporal cambia de posición a la espora (9,30).

Otras investigaciones señalaban ya la importancia que podría tener B. thuringiensis en el control biológico de insectos plaga. La mayor parte de las investigaciones realizadas por científicos de ese tiempo se encaminaban a probar extractos de cultivo de B. thuringiensis con insectos en laboratorio y campo, así en 1924 Shepher menciona el uso de B. thuringiensis para control de la palomilla de la coliflor (Echocerus cornutus). Hust (1927) infecta en el laboratorio con B. thuringiensis al barrenador del maíz (Phiniausta - - - - - imbibalis) y demuestra que esta bacteria es muy patógena, ya que mataba al 100% de los insectos en 1 a 1.5 días, describe también (1929-1930) métodos de control y señala que el de empolvado es el mejor para el combate del gusano -- barrenador del maíz. En igual forma Matalinikoff y Chorine en 1929, prueban en campo mediante aspersiones a B. thuringiensis para control del barrenador del maíz, indicando que los cultivos de maíz infectados con este insecto y no tratados con B. thuringiensis se desarrollan pobremente, mientras que en los tratados, el cultivo crece vigorosamente y produce mazorcas más grandes que el control. Por otra parte B. thuringiensis es también patógeno para la "palomilla gitana" (Porthetria dispar) y larvas de Aporia erataegi y Vanesia urtical. De esta manera, con ello señalaron que B. thuringiensis es un patógeno específico de lepidópteros, ya que al ensayar esta bacteria con cuatro géneros de saltamontes, dos mosquitos y un escarabajo resultaron resistentes a la toxina de este microorganismo (56).

Como resultado de estas investigaciones y conocida la especificidad de la patología para el orden lepidóptera, se produce la alternativa de control de insectos plaga, al fabricar en 1930 el primer producto de B. thuringiensis -- en Francia llamado "Sporine" el cual a nivel de campo contra el gusano barrenador del maíz (Ostrinia rubilalis) se encuentra que es efectivo. Sin embargo -- la destrucción provocada por la segunda guerra mundial, dió como resultado que

la fábrica manufacturadora desaparecería y dejó de producirse Bacillus - - -  
thuringiensis.

Terminada la segunda guerra mundial se renuevan las investigaciones en el campo de patógenos y se hace más palpables los problemas taxonómicos de B. - -  
thuringiensis, ya que la cepa descrita por Ishiwata (B. sotto) y Berliner (B.  
thuringiensis) eran idénticas por lo que no podían estar clasificadas como es-  
pecies distintas. La confusión fué más grande al proponer Smith, Gordon y --  
Clarke (1964) que B. thuringiensis sea clasificado como Bacillus cereus dado -  
que aparte de su patogenicidad para insectos y de la forma oblicua de su espo-  
ra, resulta indistinguible de B. cereus (30), abandonándose por completo la -  
producción industrial de este microorganismo para control de insectos.

Con éstos estudios, Bacillus thuringiensis se considera como variedad de  
Bacillus cereus, así (1951) Toumanoff y Vago (35) aíslan un patógeno esporula-  
do idéntico al de Ishiwata (1901) al cual clasificaron como Bacillus cereus -  
variedad alesti y mencionan la semejanza que existe entre este aislado, B. - -  
cereus, B. sotto y B. thuringiensis (Berliner 1912).

En este año (1951) Steinhaus usa experimentalmente a B. thuringiensis en  
pruebas de campo en los Estados Unidos para control de la "oruga de la alfal-  
fa" (Colias pilodice, euritheme) (Biosduval), sin embargo, la importancia de -  
clasificar taxonómicamente a B. thuringiensis y diferenciarlo de B. cereus era  
de mayor interés en ese tiempo.

Hannay en 1953-1956 da a conocer los principios de una nueva taxonomía pa-  
ra diferenciar a B. thuringiensis de B. cereus, ya que al examinar bacilos es-  
porulados, aerobios, dentro de ellos a B. thuringiensis, encuentra que este --  
produce cristales en forma de diamante, denominándolo "cuerpo paraesporal", al  
cual Berliner (1916) lo llamó "restkorper" o "cuerpo de desecho". Al analizar  
dicho cuerpo (1956) encuentra que éste químicamente es una proteína (31), y --  
asocia al cuerpo paraesporal con la toxicidad de B. thuringiensis a insectos,  
ya que al probar esporas de este microorganismo contra orugas de insectos pro-  
ducen septicemia. Angus (1954-1956) demuestra que el cristal es una toxina -  
soluble en soluciones alcalinas y tóxicas a insectos y aún sin conocer los --  
escritos de Mitani y Watari (1916) sobre extracción de la toxina, utiliza mé-  
todos similares para obtener una solución protéica libre de células, la cual -

produce la parálisis sotto típica, descrita por Ishiwata (31). En ese mismo tiempo, Stainhaus (1954) reafirma lo encontrado por Hannay, Angus y Berliner, ya que al aislar a B. thuringiensis encuentra que este produce inclusiones en forma viable, predominando la romboidal y cuboidal. Al realizar pruebas de infectividad con 15 cepas encuentra que las inclusiones estan relacionadas con la virulencia del bacilo a insectos.

La confirmación de la forma del cuerpo paraesporal fue conocida al publicar Hannay y Fitz-James en 1955, las primeras fotografías del cristal bipiramidal y además que éste es de consistencia protéica.

Con estos hechos es factible distinguir a B. thuringiensis de otros bacilos esporulados, pero aún era problemático distinguir entre sí las cepas de este microorganismo de diversos investigadores. Por otra parte Steinhaus (1951-1956), a través de varias publicaciones demuestra como B. thuringiensis es capaz de controlar insectos plaga principalmente lepidópteros, para tiempo después producirlo masivamente en E.U.A., la Pacific Yeast Products (1957), (tiempo después Bioferm Corp. y luego Chemical Corp.), la cual lanza al mercado un producto llamado "Thuricide". Industrializado, Heimpel y Angus (1958) publican como diferenciar a B. thuringiensis de B. cereus, la describir que B. thuringiensis produce inclusiones paraesporales altamente tóxicas para insectos lepidópteros, lo cual es una diferencia de B. cereus aún y cuando B. thuringiensis sea identico morfológica y bioquímicamente a éste.

Al parecer el interés mostrado por los investigadores para clasificar a B. thuringiensis disminuye al producirse industrialmente éste.

Diez años después de iniciada la industria, Heimpel (1967) en trabajos realizados con diversas cepas de B. thuringiensis agrupa a estas bacterias como "cristalíferas" y denomina al cristal "  $\delta$ -endotoxina" (33), y empíricamente agrupa a las cepas como variedades, debido a que existen diferencias muy marcadas entre éstas, así denomina a B. thuringiensis variedad sotto al aislado por Ishiwata (1901) y B. thuringiensis variedad alestí al realizado por Toumanoff y Vago (1951). En este año, (1967) el producto B. thuringiensis, obtenido industrialmente y al cual Stainhaus (1957) dió la importancia económica para que se produjera en la Pacific Yeast Products (Thuricide), tenía poca demanda en el mercado, ya que sus usos eran limitados, pues el producto no contaba con

alta potencia y estandarización adecuada porque los conocimientos adquiridos - sobre este campo eran escasos. Así DeBerjak y Bonnefai (1962-1973) proponen - la clasificación de B. thuringiensis en variedades de acuerdo a su reacción se - rológica con el antígeno flagelar -H de células vegetativas móviles (cuadro - IV), mencionando que este antígeno (H) es estable y específico. Estos traba-- jos concluyeron con la designación de variedades de B. thuringiensis. Duran- te este tiempo, Dulmage (1969), aisla una cepa de B. thuringiensis (HD-1), - que resulta ser de 20 a 200 veces más potente que todas las cepas conocidas - (4), por lo que las compañías productoras optaron por utilizarla. Así las - formulaciones de B. thuringiensis tuvieron más demanda en el mercado y más aún cuando el mismo Dulmage (1971) desarrolla la estandarización de productos basa - dos en B. thuringiensis, al probar las formulaciones industriales de este mi- croorganismo por bioensayos con larvas de insectos, y utilizar a Trichoplusia ni (Falso medidor del tabaco) como insecto de prueba. En 1972 en Brownsville, Texas, representantes de diversas industrias de Estados Unidos, productores de B. thuringiensis como Abbot Laboratorios, International Minerals y Chemical -- Corp. y Nutrilines Products Inc., junto con representantes de la división de - regulación de parasiticidas (USEPA) y del departamento de Agricultura de E.U.A. (U.S.D.A.) proponen que las formulaciones de la  $\delta$ -endotoxina de B. - - - - - thuringiensis en E.U.A. se estandaricen por bioensayos contra Trichoplusia ni en comparación con un estándar primario y que las actividades de toxicidad de este microorganismo sean reportados en U.I./mg., basándose en el estándar inter - nacional E-61 de referencia. De esta manera una formulación de la cepa HD-1 - fue aceptada como el estándar de referencia (HD-1-S-1971) con una potencia de 18,000 U.I./mg. de productos (6,18,19,20).

Otros avances obtenidos en taxonomía de B. thuringiensis fueron los reali - zados por J. krywienczyt al encontrar que las variedades de B. thuringiensis pueden ser clasificados por antígeno de cristal ( $\delta$ -endotoxina); además, mencio - na que el 85% de las cepas aisladas por ella, poseen antígeno de cristal iden - tico y pertenecen a un serotipo H específico, lo cual puede estar relacionado con la actividad insecticida (3,7,28,41,47).

Hoy en día se sabe que no todas las serovariedades de B. thuringiensis - son tóxicas para insectos plaga lepidópteros, algunas de ellas son atóxicas, - como en el caso de la variedad colmeri y kumamotoensis (Ohba y Aizawa 1981) y tó - xicas para otros insectos como en el caso de variedad isralensis que es tóxica

para mosquitos. Sin embargo existe la posibilidad de que la toxicidad dependa de la cepa aislada, ya que ésta aún no está muy bien definida o delimitada y no hay hasta hoy conocido una estricta relación entre la serovariedad y la toxicidad a un insecto (12,57). Es conocido también que la toxicidad es dependiente de parámetros de fermentación como pH, tiempo, medio de cultivo, etc., por lo cual es difícil aseverar con exactitud cuando una cepa es atóxica, ya que lo puede ser para insectos no probados.

#### BIOQUIMICA DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA DE B. thuringiensis.

Esta proteína (cristal) es el principal producto activo de Bacillus thuringiensis tóxico a insectos plaga y se le conoce como cristal, cuerpo paraesporal o  $\delta$ -endotoxina; se caracteriza por ser insoluble en agua, soluciones buffer y solventes orgánicos, debido a puentes disulfuro e interacciones no covalentes que forman el cristal. En condiciones normales esta toxina es soluble en pH alcalinos superiores a 12 o bien por la acción conjunta de desnaturadores (Angus 1956). Existen varios métodos reportados para conocer la naturaleza del cristal paraesporal de B. thuringiensis, a través de diversos procesos químicos o físicos, como es el caso de reductores de puentes disulfuro (Ac. tioglicólico) y sedimentación por ultracentrifugación (Lacadet 1966-1972), o bien con mercaptoetanol y electroforesis en gel con dodecil sulfato de sodio y urea, y determinación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico y electroforesis en geles entre otros (7, 12,30, 57). Así el uso de metodologías mencionadas anteriormente, reveló que las diversas variedades de B. thuringiensis no muestran variación significativa en el contenido de aminoácidos, encontrándose que el ácido glutámico y el aspártico se encuentran en gran proporción en el cristal (26%) en comparación con los demás aminoácidos, (cuadro II) de aquí que esta toxina tenga bajo punto isoelectrico (4.4) además de que es baja en cistina, lo cual produce su insolubilidad. Otros autores señalan que en el cristal se encuentran alrededor de un 5% de carbohidratos por lo que debe considerarse a este como glicoproteína. (40,46),

Actualmente se conoce que existen cadenas polipeptídicas en la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis, (41,46). Para llegar a concluir esto se trabajó inicialmente en la separación de la espora del cuerpo paraesporal ( $\delta$ -endotoxina) lo cual resultaba difícil dado que en tamaño y características superficiales son casi idénticos, aparte de la insolubilidad del cristal en agua y sol-

ventes orgánicos (Goodman 1967 y Lecadet 1970). Existen varias técnicas de separación de la espora y restos celulares, dentro de ellos los de Vankova 1957 y Fast en 1972 que usan centrifugación en gradientes de densidad de CsCl y sacarosa respectivamente, o bien los de Sharpe (1975) en gradientes isopícnicos de renografina. Separaciones óptimas fueron las encontradas por Angus y Nickerson (1970) al usar centrifugación zonal con bromuro de sodio, método que actualmente se usa para obtener buenas separaciones de cristales, espora y de restos celulares. Sin embargo se encontró que al determinar el peso molecular del cristal obtenido, éste es variable según el método utilizado dado que si se usa electroforesis en gel de poliacrilamida se obtiene un peso molecular de 230,000 (Nabamatsu 1978) y al usar ultracentrifugación 177,000 (Huber 1981) - (40). Por otra parte Takashi Yamamoto encuentra (62,63) que el cristal de cepas de B. thuringiensis variedad kurstaki HD-1 contiene dos proteínas serológicamente distintas y que al analizarlas por cromatografía en serphacryl S-300 presentaron un peso molecular de 135,000 y 65,000 ( $P_1$  y  $P_2$  respectivamente). Menciona también que ambas proteínas son tóxicas a Trichoplusia ni (falso medidor del tabaco) y sólo la de 65,000 daltons es tóxica a mosquitos.

Actualmente se conoce que B. thuringiensis segrega aparte de la  $\delta$ - endotoxina, exotoxinas (39), y que sólo ciertas cepas y bajo condiciones específicas de crecimiento las producen, estas toxinas son:

#### A.- $\alpha$ -Exotoxina.

Esta proteína se produce durante el crecimiento logarítmico de ciertas cepas de B. thuringiensis, es una fosfolipasa de tipo C (lecitinasa) que actúa sobre fosfolípidos de membrana y recibe el nombre sistemático de fosfatidilcolina colinhidrolasa. La biosíntesis de esta enzima ocurre en el intervalo de pH de 6.0 a 9.0. Esta lecitinasa es una proteína termolabil y estable a pH de 3.0 a 9.0 así como en presencia de Tripsina y Urea 8.0 M (39).

#### B.- $\beta$ -Exotoxina.

Ciertas variedades de B. thuringiensis producen y excretan  $\beta$ -exotoxinas dentro de ellas la más importante es la variedad thuringiensis que se produce industrialmente (cuadro III). Esta toxina es termoestable y se produce en el crecimiento vegetativo de B. thuringiensis, es soluble en agua y dializable,

absorbe a 260 nm., químicamente es un derivado de nucleótido (adenosina-4-glucosa-ac. fosfoalárico). Normalmente la variedad *thuringiensis* produce - - 50mg. de  $\beta$ -exotoxina por litro de sobrenadante (39).

La  $\beta$ -exotoxina es también conocida como factor mosca, toxina de moscas y factor MaConnell Richard's. Generalmente es tóxica a moscas, como Mosca doméstica L y ciertos lepidópteros, su uso es restringido dado que causa malas formaciones congénitas en los insectos que atacan, así como los animales de prueba, sin embargo, no atraviesa el intestino de rumiantes por lo que se excreta por heces fecales lo cual sirve para controlar moscas de establo (E. -- kurstak 1982).

#### C.- $\gamma$ -Exotoxina

Actualmente ésta toxina no se encuentra bien definida se conoce que hidroliza el agar yema de huevo y no se ha determinado su toxicidad en la naturaleza, sólo las variedades *subtoxicus* y *entomocidus* la producen (39).

#### D.- Otras toxinas de Bacillus thuringiensis.

Existen tres tipos más producidas por B. thuringiensis de las cuales aún no se determina con exactitud su toxicidad, destacando una exotoxina labil - que produce la variedad *thuringiensis*, una toxina soluble en agua producida - por variedad *alesti* y otra tóxica a ratón (factor ratón).

#### TOXICIDAD DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA.

En contraste con los insecticidas de contacto que matan estadios larvales e insectos adultos, la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis necesita ser ingerida por las larvas del insecto para tener acción toxigénica. El mecanismo de esta acción actualmente se desconoce, ya que al parecer es variable de acuerdo con el insecto y a la vez semejante, dado que la toxicidad se efectúa en el intestino medio del mismo. Así por ejemplo, se ha descrito que las larvas de "gusano de seda" (Bombyx morii) al ingerir esta toxina sufren parálisis rápida del intestino y un incremento en la alcalinidad de la hemolinfa,

ya que altera la permeabilidad celular (8,12,34,35) con cambios de regulación del ión potasio (8). Otros en cambio (42) encuentran un incremento en el volumen, hinchamiento y vacuolización de células del epitelio intestinal (Angus - 1970, Ebersold 1977), causando destrucción de mitocondrias, retículo endoplásmico y microvellosidades (41). Ebersold señala que la  $\delta$ -endotoxina causa segregación de partículas proteicas y cambia las propiedades de transporte de la membrana.

De todos los trabajos anteriormente mencionados, se pueden concluir que la acción toxigénica de la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis tienen lugar en el intestino medio del insecto, aún y cuando no se conozca con exactitud la forma de acción de esta toxina.

#### PRODUCCION Y ESTANDARIZACION DE B. thuringiensis.

La actividad toxigénica de B. thuringiensis radica en la  $\delta$ -endotoxina - (cuerpo paraesporal o cristal paraesporal) que éste produce en su fase estacionaria, de aquí que los métodos ligados a producir este microorganismo hagan referencia principalmente a esta toxina. Sin embargo, una alta producción de  $\delta$ -endotoxina, no necesariamente esta ligada a una alta toxicidad, ya que hasta hoy se desconoce en qué radica la toxicidad de esta toxina, si es en una parte específica o bien en la conformación final de la biosíntesis de aminoácidos que dan origen a esta. (Dulmage, 1978). Takashi Yamamoto (1981). Al analizar la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis var. kurstaki, señala que ésta formada por dos subunidades ( $P_1$  y  $P_2$ ) las cuales difieren en su toxicidad para insectos, dado que una lo es para lepidópteros y otra para mosquitos (62, 63). Actualmente se conoce que la toxicidad del cristal de B. thuringiensis es una característica intrínseca de la cepa y que ésta toxicidad se expresa o se altera dependiendo de las condiciones del proceso de producción y del modo de activación de las proteasas del jugo intestinal del insecto que ataca (40). De aquí que el medio de cultivo, la cepa aislada y condiciones de producción de este microorganismo juegan un papel importante en la toxicidad. Así Singer y colaboradores descubren que B. thuringiensis crece y esporula lentamente en medios definidos o minerales.

En años pasados se pensaba que el conteo de esporas y cristales estaba --

relacionado con la toxicidad de B. thuringiensis por lo que Dubbois (1968) describe que en medios con glucosa, peptona y sales minerales, se produce alta -- cantidad de esporas ( $2 \times 10^8$  esporas/ml). Yousten y Rogoff realiza el mismo -- ensayo anterior, pero en medios con extracto de levaduras, sales minerales y agar, y al igual que Dubbois encuentran  $2.5 \times 10^8$  esporas/ ml en 24 a 36 horas de fermentación (56).

El uso de medios semidefinidos con materias primas baratas como melazas, líquido de remojo de maíz, harina de pescado, harina de soya o de semilla de -- algodón fue dado a conocer por Pendleton (1969) quien usa exitosamente un medio con harina de pescado, almidón, carbonato de calcio y sales para producir a B. thuringiensis, encontrando que éste se reproduce rápidamente (50). Así, para este año (1969) H. Dulmage aisla una cepa (B. thuringiensis HD-1 var. - krustaki) que en medios con triptona, almidón extracto de levaduras y fosfatos es 20-200 veces más tóxica que las cepas encontradas hasta entonces (cuadro V y VI). El mismo Dulmage reportó la producción de esporas  $\delta$  -endotoxina de 12 cepas de B. thuringiensis en dos medios de cultivo uno con dextrosa, - triptona, maizena, extracto de levadura y fosfatos, y otro con proflo-peptona, dextrosa y sales minerales. Encuentra que la actividad toxigénica de los extractos obtenidos de estos medios, no corresponde a la cuenta de esporas ni a rangos de crecimiento de este microorganismos. Concluye que la toxicidad de las preparaciones de B. thuringiensis varía con la cepa aislada, así como con el uso de un medio de fermentación específico. En 1971, al ensayar extractos de espóra-  $\delta$ -endotoxina de 16 cepas aisladas de B. thuringiensis variedad - alesti y dos de la variedad kurstaki, cultivadas en tres medios de fermentación con variabilidad en la fuente de carbono y nitrógeno (triptona, proflo, harina de maíz, extracto de levadura, bacto-peptona y dextrosa), con sales - minerales encuentra que la cantidad de  $\delta$  -endotoxina producida varía ampliamente y depende del tipo de cepa y del medio de producción en el cual crece. En cambio la actividad insecticida no puede ser estimada por serotipos, debido a que varios serotipos idénticos (como en este caso) producen diferentes - grados de actividad toxigénica en un mismo insecto y diversas variedades no - se logran comparar dado que son tóxicas a insectos específicos (Dulmage 1971). Con estos resultados Dulmage y Rhodes (1971), proponen producir a B. - - - thuringiensis en medios con melazas, sólidos de remojo de maíz y carbonato de calcio.

Couch y Ross (1980) recomiendan el uso de productos naturales como fuente de nitrógeno, tales como harina de soya, harina de semilla de algodón, líquido de remojo de maíz, harina de pescado, levadura autolisada y caseína, así como dextrosa, almidón, melazas como fuente de carbono, ya que según mencionan el producto formulado es adecuado para disminuir los costos en el mercado. De esta forma Luthy y Ebersold (1981) utilizan medios complejos con ingredientes de bajos costos, (harina de soya, almidón de maíz, extracto de malta y sales minerales) para producir B. thuringiensis señalando que en menos de 48 horas se logra una esporulación total. De igual manera Nickerson y Bulla describen medios complejos, suplementados con cistina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mencionando que la toxina producida es tóxica a lepidópteros (9).

Con los estudios anteriores descritos, se dio a conocer prácticamente la importancia de los componentes del medio de cultivo en la producción de  $\delta$ -endotoxina-espora de B. thuringiensis, así, Salama, Foda, Dulmage y Sharaby (1981) proponen el uso de subproductos agroindustriales como los de harina de soya, harina de pescado, levadura forrajera, sangre de res, subproductos secos de aves, líquido de remojo de maíz, suero de leche y semillas de leguminosas incluyendo habas, frijol, garbanzos, judías, cacahuates y lentejas incorporadas a un medio mineral para la producción industrial de esta bacteria, dado que el producto obtenido (espora- $\delta$ -endotoxina) de B. thuringiensis en estos medios, de las variedades kurstaki y entomocidus, es de buena toxicidad para insectos lepidópteros plaga, como en el caso de Heliothis armigera y Spodoptera littoralis entre otros (52).

Las primeras formulaciones comerciales de B. thuringiensis fue realizada al probar que éste produce por cada espora un cristal paraesporal ( $\delta$ -endotoxina), pensándose con ello, que la cuenta de esporas viables sería una medida útil para determinar la actividad de las formulaciones de ésta bacteria (15); ello resultó inadecuado, ya que las esporas como tales no participan en la toxicidad y los cristales ( $\delta$ -endotoxina) no tiene relación intrínseca de toxicidad con la espora (Bonnetoi, Burgerjón 1955-1959). Por esta razón y otras la toxicidad de B. thuringiensis a insectos plaga, se expresa actualmente en unidades internacionales basadas en comparación con un estándar de referencia primario que en esa época no existía. Los primeros en señalar la necesidad de usar a los mismos insectos como organismos de prueba para demos-

trar la toxicidad de B. thuringiensis a ellos, fueron Burgejón y Bonnefoi, para tiempo después usarse Trichoplusia ni como organismo de prueba, a través de un bioensayo por incorporación de extracto espóra-cristal de B. thuringiensis a una dieta definida, lo cual es la base del bioensayo moderno (Splittstoesser y Mc. Even 1961) (4).

El año de 1966 en el Colegio Internacional de Patología de insectos y control microbial en Wageningen, países bajos, se acuerda utilizar el estándar -- E-61 (Formulación de la Dra. DeBarjac del Instituto Pasteur), como estándar - primario de referencia internacional asignándole una potencia de 1000 U.I. -- (U.I./mg.) recomendando que la actividad de B. thuringiensis contra lepidópteros se estandarice por bioensayo con larvas de insectos, se compare el valor LD-50 de estos materiales con los de la E-61 de referencia y su potencia sea - expresada en unidades internacionales (Burges 1967). Así Dulmage en 1969 aisla una cepa B. thuringiensis variedad kurstaki (HD-1) que resulta ser de 20 -- 200 veces más toxigénica que las cepas hasta entonces producidas o existentes y que en comparación con el estándar E-61 resultó poseer 18,000 U.I. (U.I./mg) motivo por el cual se tomó como estándar de referencia nacional en Estados - - Unidos (4,12,14,16).

Con lo anterior se tiene que a nivel mundial la actividad de la  $\delta$ -endotoxina-espóra de B. thuringiensis se determina a través de la incorporación de estos en una dieta específica por bioensayos, con larvas de los primeros estadios de insectos y las unidades de toxicidad de esta toxina se expresa en unidades internacionales (U.I./mg) (6).

## MATERIAL Y METODOS

### 1.- Obtención y conservación de cepas de B. thuringiensis.

Se trabajó con dos cepas aisladas de suelo de B. thuringiensis (claves GM-1 y GM-2) proporcionados por el Cepario del Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.. Para su conservación se efectuaron resiembras periódicas en agar nutritivo (Merck) pH 7.0, así como liofilizadas en leche desnatada al 10% como soporte y mantenidas en refrigeración 5°C aproximadamente (59).

### 2.- Preparación de Inóculos.

De cada cepa de B. thuringiensis se activaron sembrándolas en agar nutritivo (Merck) pH 7.0 e incubadas a 30°C por 24 hrs. para posteriormente inocular cada cepa en matraces de 250 ml. con 50 ml. de caldo triptosa fosfato - (Difco) a pH 7.0, en cual se incubó a 30°C  $\pm$  2°C por 14-18 hrs. a 200 r.p.m., para facilitar el crecimiento. Al cabo de este tiempo se inoculó los matraces que contenían el medio de fermentación para producir la  $\delta$ -endotoxina-espora de B. thuringiensis, en relación al 0.5% de su contenido de medio de cultivo.

### 3.- Medios de Fermentación.

Se probaron 25 medios de cultivo para producir esporas y cristales de B. thuringiensis diseñados con base en las necesidades de crecimiento y de biosíntesis de la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis (comunicación personal H. T. Dulmage). De igual manera se tomó en cuenta los posibles efectos inhibidores de algunas concentraciones de componentes como la fuente de carbono. Se consideró como prototipo algunos medios de cultivo reportados para producir B. thuringiensis a partir de los cuales se obtiene buena toxicidad (cuadro No. VI). La composición de los medios utilizados se muestran en los cuadros VIII, IX, X y XI. Estos materiales fueron obtenidos de : Ingenio Azucarero de Cd. Mante, Tamps. (Melaza), harina de soya comercial, harina de pescado,

(Unión de pescadores de Mazatlán, Sinaloa), Subproducto de cítricos húmedo - (citromex, S.A., Montemorelos, N.L.), líquido de remojo de maíz (Productos -- del Maíz, Guadalajara, Jal.), jugo de agave (Destilería la Guadalupeana Bustamante, N.L.).

#### 4.- Condiciones de Fermentación.

Todos los aislados de B. thuringiensis fueron llevados en condiciones idénticas de fermentación a nivel de laboratorio, utilizando para ello las condiciones reportadas por Dulmage y Vandekar, 1982. (59).

#### 5.- Cinética de fermentación.

Durante el transcurso de la fermentación se tomaron alicuotas del medio de producción de 5 a 10 ml. cada 24 hrs., para determinar parámetros del crecimiento de B. thuringiensis.

##### i) pH.

Se colocó 1 ml. de muestra del cultivo en 15 ml. de agua destilada a pH 7.0 y se determinó el pH en un potenciómetro mod. 5, Corning Sc. Inst. (57).

##### ii) Consumo de azúcares.

Las muestras tomadas en el transcurso de la fermentación se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 15' y se descartó el sedimento para el sobrenadante determinar azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. Las lecturas espectrofotométricas de estándares, problemas y patrones de comparación se determinaron a 540 nm en un espectrofotómetro JUNIOR II Coleman -- Mod. 6/20 (58).

##### iii) Número de cristales.

Para obtener un número aproximado de la cantidad de cristales ( $\delta$ -endotoxina) producidos en los caldos de fermentación se realizaron frotis de las muestras to

madas en el transcurso de la fermentación las cuales fueron teñidas con cristal violeta y observadas al microscopio compuesto (Carl Zeiss Mod. 473405). - Se reporta la media del número de cristales por campo microscópico. Esta medida nos sirve para que al existir un 70-80% de esporas y cristales liberados del bacilo al medio de cultivo por lisis celular parar la fermentación, dado que se puede correr el riesgo de que las proteasas que produce el mismo bacilo al lisarse hidrolicen el cristal (11,12).

.iv ) Cuenta de esporas viables.

Para realizar este análisis se utilizó 50 mg. de extracto final del -- producto y se depositaron en 50 ml de solución salina estéril a pH 7.0 se pasurizó posteriormente a 70°C por 10 minutos, para luego efectuar una serie de diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ), para de cada dilución sembrar por difusión en placas de agar nutritivo a pH 7.0 e incubar a 30°C por 24-48 hrs. El número de colonias en cada placa se reporta como número de esporas por miligramo de extracto final (14).

#### 6.- Extracción del complejo spora- $\delta$ -endotoxina.

Al término de la fermentación se mide el volumen de los caldos y se ajusta el pH a 7.0 con HCl 1 N. Las esporas y cristales son precipitados por -- centrifugación así como los sólidos residuales de fermentación no solubles. - El complejo spora cristal se extrae a través del método de coprecipitación - con resuspensión en lactosa al 5% y precipitación con acetona descrito por - Dulmage (1970) para finalmente secar a temperatura ambiente por 12-24 hrs. y pesar el extracto obtenido.

#### 7.- Bioensayos de prueba.

De todos los extractos obtenidos de spora-cristal de B. thuringiensis, se realizaron pruebas de toxicidad en larvas del primer instar de Trichoplusia ni y Heliothis virescens. Para ello se siguió el procedimiento descrito por Dulmage et. al. (1976), partiendo de una dosis máxima de spora-  $\delta$ -endotoxina de 500 ug por ml. de dieta de insecto y una dosis mínima de 50 ug/ml., prepa-

radas en solución salina (0.85 % p/v) buffer de fosfatos a pH de 7.0. Para determinar el grado de actividad de estas preparaciones, se corrió un testigo a la par de B. thuringiensis, el cual es el estándar de referencia de Estados Unidos de América, cuya clave es HD-1-S-1980, y que posee una potencia de -- 16,000 U.I./mg. Cada dilución se homogenizó en dieta artificial de harina - nutritiva de soya de Shaver y Raulston (1971), a razón de una parte de dilución por 50 de dieta, utilizando una licuadora y transfiriendo a recipientes de plástico de color claro de 3 g ., posteriormente con un pincel de pelo de camello se infectaron 25 copas para cada dilución, con una larva cada copa y un total de 25 del primer instar de Trichoplusia ni ó bien de Heliothis virescens procediendo en igual forma para el estándar HD-1-S-1980. El total de reci- -- pientes se incubaron a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una humedad relativa de 50%; al cabo de 7 días de incubación los recipientes fueron removidos, de cada dilución se con-  
tó el número de larvas muertas, posteriormente se registraron y se calculó la Dosis Letal media ( $LD_{50}$ ) de la muestra de prueba (17) (ver diagrama de flujo - página 56).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.- MEDIOS DE CULTIVO.

Con el objetivo de discutir la influencia que los componentes de los medios de cultivo tienen en la producción de la " $\delta$ -endotoxina" de Bacillus thuringiensis (R. Smith 1982), se produjo esta en 25 medios de producción, tomando en consideración las necesidades de crecimiento y de biosíntesis de la  $\delta$ -endotoxina de B. thuringiensis, estos estudios son tendientes a encontrar para cepas nativas de B. thuringiensis medio de cultivo que mantengan e incrementen la toxicidad de la  $\delta$ -endotoxina de este microorganismo hacia insectos lepidópteros, tal y como se ha encontrado con otro tipo de metabolitos; tal es el caso de penicilina (Wang Et. al. 1979 y Comunic. Personal Dr. H.T. Dulmage).

En las tablas VII, IX, X y XI se muestran los medios para producir el complejo espora-cristal de B. thuringiensis, en base a subproductos de cítricos, melazas y jugo de agave como fuente de carbono, harina de pescado ó harina de soya como fuente de nitrógeno y carbonato de calcio como fuente de calcio en el medio de cultivo (14,15).

### 2.- CINETICA DE FERMENTACION DE B. thuringiensis GM-1 Y GM-2 EN MEDIOS DE PRODUCCION, A BASE DE MELAZAS Y SUPLEMENTADOS CON HARINA DE PESCADO.

Como se puede apreciar los medios con melazas suplementados con Harina de pescado (Cuadro VIII) utilizados para producir bioinsecticidas de B. thuringiensis GM-1 y GM-2 presentaron cambios similares al producirse el crecimiento (Cuadros XII y XIII, Gráficas 1 al 5), ya que el pH aumentó progresivamente en todos los medios y los azúcares disminuyeron gradualmente, terminándose éstos entre las 72 y 96 horas de fermentación, lo cual se puede tomar como una indicación indirecta de que el crecimiento fué bueno, ya que es una medición cuantitativa indirecta del crecimiento, según Wang, Et. al. (1979) - Se encontró sin embargo que el número de cristales ( $\delta$ -endotoxina) de B. thuringiensis GM-1 y GM-2 producidos en los mismos medios fué variable de acuerdo a la concentración de la fuente de proteínas y a el factor de creci-

miento utilizado (líquido de remojo de maíz o Agua de Cocimiento de Levadura) ya que en medios con 1 y 4% de harina de pescado (medios E-1 y E-2) y líquido de Remojo de Maíz (L.R.M.) la cantidad de cristales producidos fué variable, 122 y 153 respectivamente para B. thuringiensis GM-1 y 62 y 143 para B. thuringiensis GM-2 y mucho menores en los medios a los cuales se les suprimió la harina de pescado (E-3) o a el factor de crecimiento (Agua de Cocimiento de Levadura) (Medio AE-4). En igual manera aconteció en medios con melazas y Agua de Cocimiento de levadura (A.C.L.) en lugar de Líquido de Remojo de Maíz, (medio E-1, E-2, E-3) en los cuales la producción de cristales ( $\delta$ -endotoxina) fué mucho menor (cuadros XII y XIII). Esto concuerda con lo reportado por H. Dulmage (1971) quien encuentra que la cantidad de la  $\delta$ -endotoxina producida por diversas cepas o por una misma variedad de B. thuringiensis es variable y esta en relación en la composición del medio y a la concentración de sus componentes (14 y 57).

### 3.- CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DE B. thuringiensis GM-1 Y GM-2 EN MEDIOS A BASE DE SUBPRODUCTOS DE CÍTRICOS SUPLEMENTADOS CON HARINA DE PESCADO.

Al utilizar subproducto de cítricos hidrolizados como fuente de carbono (medios C-1 y C-2) se presentaron cambios en el crecimiento de B. thuringiensis GM-1 y GM-2, similares a los observados con los medios a base de melazas (cuadro XII y XIII) ya que el pH y el consumo de azúcares aumentó durante la fermentación (ver cuadro XIV y XV). No sucedió algo así cuando se usó subproducto de cítricos sin hidrolizar (medio C-1 y C-2) ya que el pH descendió en el medio de cultivo (cuadro XIV y XV) para ambas cepas, debido probablemente a la cantidad tan baja de azúcares solubles en el medio y al poco y lento crecimiento de la bacteria (11), en cambio en los medios con subproducto de cítricos hidrolizados, Líquido de Remojo de Maíz y carbonato de calcio el pH aumentó y fué en estos medios donde la producción de cristales fué mayor tanto para B. thuringiensis GM-1 y GM-2 (110 y 132 respectivamente) pero no así para los demás medios (D-1, D-2 y D-3) donde la cantidad de  $\delta$ -endotoxina fué menor (Cuadro XIV y XV).

### 4.- ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS EXTRACTOS DE ESPORA-ENDOTOXINA DE Bacillus thuringiensis GM-1 Y GM-2 EN LOS MEDIOS A BASE DE MELAZAS O SUBPRODUCTOS DE CÍTRICOS.

Para demostrar la toxicidad de los extractos obtenidos de B. thuringiensis se corrieron bioensayos de pruebas en larvas de insectos plaga lepidópteros de cultivos de importancia económica de nuestro país; primeramente con - - - Trichoplusia ni (gusano falso medidor), insecto prueba utilizado para determinar la toxicidad de formulaciones de B. thuringiensis en Estados Unidos, Francia y Rusia, así como también contra Heliothis virescens (gusano cogollero). - Para realizar dichos bioensayos se utilizó en principio una dosis de 500 ug/ml de dieta de insecto, dado que con ésta concentración se logra tener costos comparables a los insecticidas utilizados en campo, además los bioinsecticidas - producidos a nivel industrial poseen concentraciones, letales medias ( $LD_{50}$ ) menores a 500 ug/ml de espora  $\delta$ -endotoxina. (16 y 17).

Como se podrá observar en el cuadro XVI, los extractos de B. thuringiensis GM-1 obtenidos en los medios de cultivo anteriores son altamente tóxicos para Trichoplusia ni, dado que se obtienen mortalidades de 96 a 100 por ciento en - este insecto, con excepción de los extractos, de los medios C-2, D-1 y D-3, a base de subproducto de cítricos y Agua de Cocimiento de Levadura; sin embargo la mayor parte de los extractos son de muy baja toxicidad para Heliothis - - - virescens, con excepción de los extractos E-2 y E-3 que son altamente tóxicos para este insecto, ya que se obtienen mortandades de 100 y 84% respectivamente, aún y cuando es en éstos medios donde se obtiene una menor esporulación - (1 a  $4 \times 10^6$  esporas/mg), pero una mayor toxicidad (cuadro XV). Estos datos - concuerdan con lo reportado por Dulmage en 1970, 1971 y por Saloma, Foda y Ed Sharaby en 1981, quienes señalan que existe una gran variabilidad en la actividad tóxica de las preparaciones derivadas de medios en los cuales crece - - B. thuringiensis, debido a que al medir la actividad toxigenica por bioensayos, esta no corresponde con la cuenta de esporas, ni a medidas de crecimiento del microorganismo, concluyendo que la toxicidad de las preparaciones de estas bacterias varía no solo con la cepa aislada, sino también con el medio usado tal y como se encontró en el presente experimento.

Al analizar los datos de toxicidad de B. thuringiensis: GM-2 producidos en medios idénticos a los empleados para la Cepa GM-1, se encontró que en la - mayor parte de éstos existía una buena esporulación pero una muy baja toxicidad en los insectos prueba (cuadro XVII). Es decir, en dichos medios se lo - gran niveles muy bajos de toxicidad pero muy buenos niveles de crecimiento, - aunque ambos no esten relacionados (Dulmage 1971 y Smith 1982).

En vista de que B. thuringiensis GM-2, resultó sin toxicidad al producirse en medios a base de melazas ó subproductos de cítricos, suplementados con harina de pescado, se decidió probar otros medios para producir dicha cepa y determinar si esta puede incrementar su toxicidad para lepidópteros.

5.- PRODUCCION Y TOXICIDAD DE B. thuringiensis GM-2 EN MEDIOS DE CULTIVO CON JUGO DE AGAVE O MELAZAS COMO FUENTE DE CARBONO, SUPLEMENTADOS CON HARINA DE SOYA.

Como se mencionó anteriormente debido a que los extractos crecidos en los medios a base de melazas o subproductos de cítricos no presentaron toxicidad de B. thuringiensis GM-2 se diseñaron 14 diferentes nuevos medios para producir esta bacteria (cuadros IX, X y XI) a los cuales se les cambió la harina de pescado por harina de soya, adicionandoles sales minerales con el objetivo -- de encontrar, si alguna de éstas influya en la toxicidad y formación de la  $\delta$ -endotoxina, ya sea con Agua de Cocimiento de Levadura (A.C.L.) o con Líquido de Remojo de Maíz como cofactores de enriquecimiento y jugo de agave o melazas como fuente de carbono en el medio de cultivo.

Como se podrá observar (gráficas XI a XIV) los cambios en pH y consumo de azúcares son casi idénticos ya que en todos los medios el pH desciende durante las primeras horas de crecimiento y asciende a partir de las 24 horas lo cual es una característica típica de B. thuringiensis durante su fase exponencial. En igual forma sucede con el consumo de azúcares que aumenta conforme se incrementa el tiempo de incubación de la cepa, por lo que se puede decir que existe un buen crecimiento de esta bacteria (Wang, et. al. 1979).

Al realizar los bioensayos en toxicidad de B. thuringiensis GM-2 en los medios anteriores, se encontró que ésta para fines prácticos es atóxica, ya que las mortandades en insectos lepidópteros (Trichoplusia ni y Heliothis virescens) en la máxima dosis utilizada (500 ug/ml de dieta) era de 0-32% (cuadro XVIII), lo cual es muy baja, por lo que posiblemente no sea tóxica para lepidópteros pero sí para otro tipo de insectos, ya que existen variedades de B. thuringiensis que no son tóxicas a lepidópteros pero si lo son para dípteros tal es el caso de la variedad isralensis (luty E. et. al. 1981). Por otra parte existen variedades prácticamente atóxicas para ambos insectos tal es el caso de thochigiensis (luty y Ebersold 1981). Es importante señalar -

que esta cepa B. thuringiensis GM-2 posee un cristal ( $\delta$ -endotoxina) prismático rectangular a diferencia del bipiramidal reportado en todas las variedades de B. thuringiensis, por lo que probablemente se puede tratar de una nueva variedad ya que hasta las hoy reportadas no existen variedades de B. thuringiensis con este tipo de cristal, y por lo mismo están poco estudiadas por lo cual será motivo de estudios posteriormente. En igual forma a lo encontrado en otros medios y a lo reportado en otros trabajos de este tipo, se encontró un buen crecimiento de esta cepa (B. thuringiensis GM-2) y una pobre toxicidad para lepidópteros (Dulmage 1981; Smith 1982).

### CONCLUSIONES

- 1.- El crecimiento de B. thuringiensis GM-1 y GM-2, se puede considerar como bueno, en todos los medios probados.
- 2.- La toxicidad de B. thuringiensis GM-1, es variable dependiendo del tipo de medio de cultivo utilizado y de la concentración y tipo de componentes del mismo medio.
- 3.- Los extractos de B. thuringiensis GM-2 presentan ausencia de toxicidad a insectos lepidópteros, al cultivarse en medios a base de melazas, jugo de agave, harina de soya o harina de pescado, con o sin suplementación de co factores de enriquecimiento.
- 4.- B. thuringiensis GM-1 es altamente tóxica a Trichoplusia ni (gusano falso medidor) en todos los medios probados con excepción de los que contienen subproductos de cítricos sin hidrolizar.
- 5.- La cantidad de  $\delta$ -endotoxina producida por B. thuringiensis es variable dependiendo del medio de cultivo utilizado, y su toxicidad no esta relacionada con la cantidad de esporas producidas.
- 6.- B. thuringiensis GM-1 posee una alta capacidad toxigénica para - - - - Trichoplusia ni y Heliothis virescens al cultivarse en medios con melazas, harina de pescado y Agua de Cocimiento de Levadura (A.C.L.) y carbonato de calcio (medios E-2 y E-3), siendo recomendable estos medios para la producción de este microorganismo.
- 7.- Es factible que B. thuringiensis GM-2 sea una nueva variedad, dado la forma del cristal que posee y que hasta la fecha no ha sido reportada.

**LITERATURA CONSULTADA**

## LITERATURA CONSULTADA

- 1.- Bechtel, D.B. y Bulla, L.A. Jr. 1976. Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal formulation in Bacillus thuringiensis. J. - Bacteriol 127; (3); 1472-1481.
- 2.- Beegle, C.C. 1979. Use of Entomogenous Bacteria in Agroecosystems. Develop. Ind. Microbiol. 20;97-104.
- 3.- Bulla, L.A., Davidson, L.I., Kramer K.J. y Jones, B.L. 1979. Purification of the Insecticidal Toxin from the Parasporal Crystal of B. thuringiensis susp. kurstaki. Biochem. and Biophys. Res. Communic. C.; - 21 (3); 1123-1130.
- 4.- Bugerjon, A. y Dulmage, H.T. 1977. Industrial and International Standardization of Microbial Pesticides-1. B. thuringiensis Entomoph; 22(2); 121-129.
- 5.- Burgers, H.D. y Thompson, E.M. 1971. Standardization and Assay of Microbial Insecticides. In Microbial Control of Insects and Mites. H.D. Burges y N.W. Hussey. (Eds); 591-622.
- 6.- Calabrese, D.M. Nicherson, K.W., Lane, L.C. 1980. Acomprison of Protein Crystal Subunit Sizes in B. thuringiensis. Can J. Microbiol. 26( 8), 1006-1010.
- 7.- Chestukhina, G.G., Kostina, L.I., Zalunin, I.A., Kotova, T.S., Katruskha, S.P., Kuuznetsov, U.S. y Stepanov, V.M. 1977. Proteins of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin Crystals. All Union Scientific of Industrial Microorganisms, Moscow, 42 (9), 1306-1311.
- 8.- Cooksey, J.E. 1971. The Protein Crystal Toxin of B. thuringiensis; Biochemistry and Mode of Action. In Microbial Control of Insects and Mites. H.

- 9.- Couch, T.L. y Ross, D.A. 1980. Production and Utilization of Bacillus thuringiensis; Biotech and Bioeng. 22; 1297-1304.
- 10.- Delafield, F.P., Somerville, H.J. y Rittenberg, S.C. 1968. Immunological Homology Between Crystal and Spore Protein of Bacillus thuringiensis; J. Bacteriol; 96(3):713-720.
- 11.- Dubois, N.R. 1968. Laboratory Batch Production of B. thuringiensis Spores and Crystals. Appl. Microbiol.: 16;384-389.
- 12.- Dulmage, H.T. 1970. Production of the Spore  $\delta$ -endotoxin Complex by Variants of Bacillus thuringiensis in two Fermentation Media. J. Invertebr. Pathol.; 16;384-389.
- 13.- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of B. thuringiensis var. alesti. J. Invertebr. Pathol. 15;232-239.
- 14.- Dulmage, H.T. 1971. Production of  $\delta$ -endotoxin by Eighteen Isolates of B. thuringiensis. Serotype 3, in 3 Fermentation Media: J. Invertebr. Pathol. 18;353-358.
- 15.- Dulmage, H.T. 1973. U.S. Assay Standar. A Report on the Adoption of a Primary U.S. Reference Standard for Assay of Formulation Containing the  $\delta$ -endotoxin of B. thuringiensis; Bulletin of the Entomology Society of American. 19;200-202.
- 16.- Dulmage, H.T. 1973. Assay and Standardization of Microbial Insecticides. Annals of the New York Academic of Science. 271; 187-199.
- 17.- Dulmage, H.T. 1979. The Standardization of Formulations of the  $\delta$ -endotoxins Produced by Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. 25;279-282.
- 18.- Dulmage, H.T., Beegle, C.C., De Barjac, H. Reich, D. Donaldson, G. y Krywienxzy, J. 1982. Bacillus thuringiensis. Cultures Available from the U.S. Department of Agriculture, U.S. Department of Agriculture, Agriculture, Agricultural Research Service. Agricultural Reviews and Manual, ISSN; 1-42.

- 19.- Dulmage, H.T. Correa, J.A. y Martínez A.J. 1970.. Coprecipitation with -- Lactose as a Means of Recovering the Spore-Crystal Complex of Bacillus -- thuringiensis. J. Invertebr. Pathol.; 15;15-20.
- 20.- Dulmage, H.T. y De Barjac, H. 1973, HD-187, a New Isolate of Bacillus thuringiensis that Produce High Yields of  $\delta$ -endotoxin. J. Invertebr. Pathol. 22; 272-277.
- 21.- Dulmage, H.T., Bioning, O.P., Rehnberg, C.S. y Hunsen, G.D. 1971. A proposed Standardized Bioassay for Formulations of B. thuringiensis (Berliner) Based on the International Unit. J. Invertebr. Pathol. 18,240-245.
- 22.- Dulmage, H.T., Martínez, A.H. y Peña, T. 1976. Bioassay of Bacillus - - thuringiensis (Berliner)  $\delta$ -endotoxin Using the Tobacco Budworm. Technical Bulletin Num. 1528. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture in Cooperation with Texas Agricultural Experiment Station; 1-15.
- 23.- Galán Wong, Barbara Cabrera y Ruiz Ordoñez. 1983. Caracterización Bioquímica de Variedades de Bacillus thuringiensis aisladas de Suelo en México.. Rev. Lat-amer. Microbiol; 25(10), 23.
- 24.- Gallegos Morales, Galán Wong y Lira V. 1984. Producción y Toxicidad de B. thuringiensis GM-1 y GM-2 crecidos en medios con melazas o subproducto de cítricos. Rev. Lat-amer Microbiol. 26(2), 151-152.
- 25.- Gallegos Morales, Galán Wong y Murga González 1983. Bioensayos de toxicidad de B. thuringiensis GM-2, contra Lepidópteros. Rev. Lat-amer. Microbiol 25 (1); 24.
- 26.- Galowallsi M.M.S., Gibson, N.H.E. y Wolf, J. 1973. The Comparative Potencies of the Crystalline endotoxin of Eight Varieties of B. thuringiensis to Larvae of Pieris brassicae, Invertebr. Pathol. 21(3);301-308.
- 27.- Goldberg, I., Sneh, B., E. y Klein, D. 1980. Optimization of a Medium - for a High Yield Production of Spore-Crystal Preparation of Bacillus - - thuringiensis effective Against the Egyptian Cotton Leaf Worm Spodoptera

- Littoralis Biosd. Biotechnol. Leett; 2(10), 419-426.
- 28.- Granados R. 1981. Insecticidas Microbiológicas; IV Simposium de Parasitología Agrícola. Instituto Tecnológico de Monterrey, N.L., México.
- 29.- Hall, I.M., Arakawa, K.Y., Dulmage, H.T. y Correa, J.A. 1977. The Pathogenicity of Strains of B. thuringiensis to Larvae of Aedes ant to Culex - Mosquitoes. Mosquito News: 37(2), 246-251.
- 30.- Hannay, C.L. 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore Forming Bacteria Nature 127; 1004.
- 31.- Hannay, D.L. 1956. Inclusions in Bacteria. Symposium Society General of Microbiology, Science Service Laboratory. Departament of Agriculture, -- Ontario, Canada; 6;318-340.
- 32.- Heimpel, A.M. y Angus, T.A. 1959. The Site of Action of Crystalliferous Bacteria in Lepidoptera Larvae. J. Insect. Pathol. 1;151-170.
- 33.- Heimpel, A.M. y Angus, T.A. 1963. Diseases Caused by certain Spore forming Bacteria. In. Steinhaus E.A. (ed) Insect Pathology an Advanced - - Treatise, New York. (2), 21-73.
- 34.- Krieg, A. 1965. Bioassay and Standardization of B. thuringiensis preparations: Spore-Endotoxin-Complex. Entomoph; 10(2), 49-54.
- 35.- Krieg, A. 1968. A Taxonomic Study of Bacillus thuringiensis Berliner; J. Invertebr. Pathol., 12; 366-278.
- 36.- Krieg, A. 1980. The Genus Bacillus, Insect Pathogens. The Prokaryotes; M.P. Starr; H. Stolp; G. Truper; A. Balows & H. Schlegel (Eds). Springer Verlag, Vol. 11; New York, N.Y.; 1743-1755.
- 37.- Krywienczyk, J. Dulmage, H.T. y Fast P.G. 1978. Ocurrence of Two Serologically Distinct Groups Within B. thuringiensis Serotype 3 ab var. krustaki, J. Invertebr. Pathol.; 31,372-375.

- 38.- Krywienczyk J., Dulmage, H.T., Hall, I.M., Beegle, C.C., Arakawa, K.Y. y Fast, P.G. 1981. Occurrence of Krustaki K-1 Crystal Activity in B. thuringiensis Serotype 3 ab var. krustaki, J. Invertebr. Pathol.; 31;372-375.
- 39.- Krustak. E. 1982. Microbial An Viral Pesticides 1era. Ed. Marcel Dekker Inc.; New York, N.Y.
- 40.- Luthy P. 1980. Insecticidal toxins of Bacillus thuringiensis. Federation of European Microbiological societies (FEEMS). Microbiol. Lett. 8;1-7.
- 41.- Luthy, P. y Ebersold, H.R. 1981. The entomocidal Toxins of Bacillus thuringiensis. Pharmac thert. Pergamon Press. London, England. 12;257-283.
- 42.- Mikkola, A.R., Carlberg, G.A., Vaara, T. y Gyllenberg, H.G. 1982. Comparison of Inclusions in Different B. thuringiensis Strains. An Electron Microscope Study. Microbiol. Lett. 13, 401-408.
- 43.- Milne, R., Murphy, D. y Fast, P.G. 1977. Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxina. An Improved technique for the Sparation of Crystals from Spores. J. Invertebr. Pathol. 29, 230-231.
- 44.- Mohd-Salleh, M.B. y Lewis, L.C. 1982. Toxic. Effects of Spore-Cristal ratios of B. thuringiensis on European Corn Boraer Larvae. J. Invertebr. Pathol. 39;290-297.
- 45.- Moroes, O. y Chaib, M.A. 1978. Bioassay for Microbial Insecticide.Proc. Biochem; 23-24.
- 46.- Nickerson, K.W. 1980. Structure and Function of the B. thuringiensis Protein Crystal. Biotechnol and Bioeng; 22;1304-1333.
- 47.- Norris, J.R. 1971. The Protein Crystal Toxin in B. thuringiensis Biosynthesis and Physical Structure. in Microbial Control of Insects and Mites. H.D. Burges y N.W. Hissey, Eds. Academic Press. New York, N.Y.; -

229-246.

- 48.- Ohba, M. y Aizawa k. 1981. A new subspecies of B. thuringiensis Isolated in Japan: B. thuringiensis subsp. tohokuensis (Serotype 17). Invertebr. Pathol; 38,307-309.
- 49.- Ohba, M., Ono, K. Aizawa, K. y Iwanami, S. 1981. Two New Subspecies of B. thuringiensis Isolated in Japan: B. thuringiensis subsp. kumamotoensis (Serotype 18) and B. thuringiensis (Serotype 19). J. Invertebr. Pathol; 38 184-190.
- 50.- Pendleton, I.R. 1969. Insecticides of Crystal forming Bacteria. Procc. Biochem; 29-32.
- 51.- Prasad, S.S.S.V., Shethna, Y.I. 1976. Biochemistry y Biological activities of the Proteinaceous Crystal of B. thuringiensis. J. Ind. Res. 35; - 626-632.
- 52.- Salama, H.S. Foda, M.S., Dulmage, H.T. y el Sharaby, A. 1981. Novel - Fermentation Media for Production of  $\delta$ -endotoxins form B. thuringiensis J. Invertebr. Pathol. 1-26.
- 53.- Scherrer, P., Luthy, P. y Trumpi, B. 1973. Production of  $\delta$ -endotoxin by B. thuringiensis as a Function of Glucose Concentrations. Appl. Microbiol; 25(4), 644-646.
- 54.- Schesser, J.H. 1977. Bioassay for Homogeneous Parasporal Crystal of B. thuringiensis Using the tobacco Hornworm. (Manduca sexta.) Appl. Environ Microbiol. 33;878-880.
- 55.- Somerville, H.J. 1973. Microbial toxins. Annals of the New York Academic Press; New York, N.Y. 91-93.
- 56.- Smith A.r. 1982. Effect of Strain and Medium variation on mosquito toxin Production by Bacillus thuringiensis var. israelensis Cand. J. Microbiol. 28;1089-1092.

- 57.- Steinhaus, E.A. 1976. B. thuringiensis Berliner, Insect Microbiology. Ed. Academic Press; New York, N.Y.; 91-93.
- 58.- Summer, J.B. 1924. Method 3,5, DNS Acid, J. Biol. Chem. 62;287.
- 59.- Vandekar, M.G., H.T. Dulmage; 1982. Guidelines for Production of B. thuringiensis H-14. Research and Training in Tropical Diseases, Who, Geneva, Switzerland.
- 60.- Wakisaka, Y., Masaki, E., Koizumi, K., Nishimoto, Y., Endo, Y., Nishimoto, Y., Endo, J.Y., Nishimura, Y. Nishiitsutsuji-Uwo. 1982. Asporogenous B. thuringiensis Mutant Producing High Yields of  $\delta$ -endotoxin. -- Appl. Environ. Microbiol.; 43(6) 1096-1300.
- 61.- Wang I.C.D., C.L. Coonew; A. Demin; P. Dunnill; A.E. Humhrey. & M.D. - Lilly. 1979, Fermentation and Enzyme Technology, John Wiley & Sons. - New York, N.Y.
- 62.- Wamamoto T. and McLuglin. 1981. Isolated of Protein From the Crystal of B thuringiensis var kurstaki toxic to the mosquito Larvae, Aedes - - Taeniorhynchus Biochem. and Biophys Res Comunc.. 103(2);414-421.
- 63.- Yamamoto and Izuka, T. 1983. Two types of Entomocidal toxins in the - Parasporal crystals of Bacillus thuringiensis var. kurstaki; Biophys; 227(1);223-241.

APENDICE  
DE  
CUADROS  
FIGURAS  
Y  
GRAFICAS

APENDICE  
DE  
CUADROS

CUADRO No. I  
 VARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis*

Serotipo (Antígeno "H")	Nombre de la Serovariedad (Biotipo)
1,	<i>thuringiensis</i>
2,	<i>finitimus</i>
3a,	<i>alesti</i>
3a3b,	<i>kurstaki</i>
4a4b,	<i>sotto</i>
4a4b,	<i>dendrolimus</i>
4a4c,	<i>kenyae</i>
5a5b,	<i>galleriae</i>
5a5c,	<i>canadensis</i>
6,	<i>entomocidus</i>
7,	<i>subtoxicus</i>
8a8b,	<i>aizawai</i>
8a8c,	<i>morrisoni</i>
9,	<i>ostrinae</i>
10,	<i>tolworthi</i>
11a11b,	<i>dermstadiensis</i>
11a11c,	<i>toumanooffii</i>
12,	<i>kyushuensis</i>
13,	<i>thompsoni</i>
14,	<i>pakistani</i>
15,	<i>israelensis</i>
16,	<i>idiana</i>
17,	<i>dakota</i>
18,	<i>tahokuensis</i>
19,	<i>kumamotoensis</i>
20,	<i>tochigiensis</i>
21,	<i>colmeri</i>
	<i>wuhanensis</i>

Luthy, P. y Ebersold, H.R. (1981)

Krieg, A. (1980)

Dulmage, H.T. (1982)

CUADRO No. II

DESCUBRIMIENTO DE VARIETADES DE *Bacillus thuringiensis*

SEROVARIEDAD	DESCUBRIDOR	AISLADA DE	LOCALIZACION	AÑO
4a4a	Ishiwata	<i>Bombyx mori</i>	Japón	1901
1	Berliner	<i>Anagasta kuehniella</i>	Alemania	1911
6	Steinhaus	<i>Plodia interpunctella</i>	U.S.A	1945
6	Speinhaus	<i>Aphomia gularis</i>	U.S.A.	1950
3a.	Toumanoff y Vago	<i>Bombyx mori</i>	Francia	1951
11a11b	Toumanoff	<i>Galleria mellonella</i>	Francia	1956
4a4b	Talalaev	<i>Dendrolimus sibiricus</i>	U.R.S.S.	1956
2	MacNamee	<i>Malacosoma dissotria</i>	Canadá	1956
5a5b	Isakova	<i>Galleria mellonella</i>	U.R.S.S.	1956
5a5c	Norris y Burges	<i>Ephesia cautella</i>	Inglaterra	1961
10	Kried	<i>Galleria mellonella</i>	Alemania	1961
7	Aizawa	<i>Sericiculturea</i>	Japón	1961
9	Norris	<i>Plodia sp</i>	Inglaterra	1963
8a8b	Norris	<i>Anagasta sp</i>	Escocia	1963
3a3b	Dulmage	<i>Pectinophora gossypiella</i>	U.S.A.	1967
12	Thompson	<i>Galleria mellonella</i>	U.S.A.	1969
5a5c	Norris	<i>Acrinicta grisea</i>	Canada	1972
8a8c	Ren y. coli	<i>Ostrinia nubilalis</i>	China	1975
13	Shaikh	<i>Laspeyresia pomenella</i>	Pakistán	1975
14	Hubei	<i>Anomis flava</i>	China	1976
15	Goldberg y Margalit	<i>Culex sp</i>	Israel	1977
16	DeLuca y Larson	Suelo	U.S.A.	1978
11a11c	DeLuca y Larson	Suelo	U.S.A.	1978
17	Ohba y Aizawa	Sericiculturea	Japón	1979
18	Ohba y Aizawa	Sericiculturea	Japón	1981*
19	Ohba y Aizawa	Sericiculturea	Japón	1981*
	Ohba y Aizawa	Suelo	Japón	1981*
	DeLuca	Suelo	U.S.A.	1981*

Dulmage 1982

\*Ohba y Aizawa 1981.

CUADRO No. III

TOXINAS DE VARIEDAD DE *Bacillus thuringiensis*

SEROTIPO	VARIEDAD	α EXOTOXINA	β EXOTOXINA	γ EXOTOXINA	δ EXOTOXINA	ENDOTOXINA
1	<i>Thuringiensis</i>	+		+		+
2	<i>Finitimus</i>	+		-		+
32	<i>Alesti</i>	+		-		+
32, 3b.	<i>Kunstaki</i>	+		-		+
4a, 4b.	<i>Sotto</i>	+		-		+
4a, 4c	<i>Kenyae</i>	+		-		+
5a, 5b	<i>Gallerie</i>	-		+		+
5a, 5c	<i>Canadensis</i>	-		+		+
6	<i>Subtoxicus</i>	-		-	+	+
6	<i>Entomocidus</i>	-		-	+	+
7	<i>Aizawai</i>	+		+		+
8a, 8b.	<i>Morrisoni</i>	-		+		+
8a, 8c	<i>Ostriniae</i>	+		-		+
9	<i>Toleonthi</i>	+		+		+
10	<i>Darmstadiensis</i>	-		+		+
11a, 11b	<i>Toumanoſſi</i>	+		-		+
11a, 11c	<i>Kyushuensis</i>	+		-		+
12	<i>Thompsoni</i>	+		-		+
13	<i>Pakistani</i>	+		-		+
14	<i>Israaelensis</i>	+		-		+
15	<i>Dakota</i>	+		?		+
16	<i>Indiana</i>	+		?		+
--	<i>Whanesis</i>	-		-		+
17	<i>Tohokuensis</i>	-		-		+
18	<i>Kumamotoensis</i>	+		+		+
19	<i>Tochigiensis</i>	+		-	?	+

{+} Positivo

{-} Negativo

{?} No determinado

Clasificación de serotipos de Bargac, Insituto Pasteur, París, Francia.  
Fuente, Faust 1975 (39).

CUADRO No. IV

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LA δ ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* g. DE aa's/ 100 g.

Referencia	Somersville y col. (1968)	Angus	Lecadet (1965)	Spencer (1968)
Variedad aminoácida.	<i>alesti</i>	<i>sotto</i>	<i>berliner</i>	<i>entomocidus</i>
Ac. Aspártico	10.7	9.6	12.6	14.0
Treonina	4.8	4.5	5.8	6.8
Serina	4.8	4.4	4.4	6.0
Ac. Glutámico	11.6	11.8	12.0	16.0
Prolina	3.5	7.5	4.4	4.4
Glicina	3.3	3.2	4.3	4.4
Alanina	2.9	2.8	3.8	4.8
Cisteína	1.2	1.2	1.4	1.4
Valina	6.0	5.3	5.0	7.8
Metionina	0.9	1.3	1.5	0.7
Iso-leucina	5.1	(-)	4.4	6.6
Leucina	7.1	(-)	7.7	10.5
Tirosina	5.9	6.8	6.6	6.5
Fenilalanina	5.7	8.6	6.8	6.7
Lisina	3.1	3.6	3.4	4.4
Histidina	2.2	2.7	2.7	2.8
Arginina	7.5	9.6	7.8	9.0
Triptófano	1.9	2.6	2.1	2.3

(a) Norris 1964.

(-) No determinado.

## CUADRO No. V

## FORMULACIONES COMERCIALES DE BACTERIAS PATOGENAS

BACTERIAS	NOMBRE COMERCIAL	COMPAÑIA
<i>Bacillus popilliae</i>	Doom, Japidemiz	Fairfax Biological Lab. (U.S.A.)
	Milky Spore Disease	Reuter Lab. Inc. (U.S.A.).
<i>Bacillus thuringiensis</i> $\delta$ -endotoxina + esporas	Dipel	Abbott Labs. --- (U.S.A)
	Thuricide	Sandoz-Wander, - Inc.
	Certan	Sandoz, Inc. --- (U.S.A)
	Bactur	Thompson-Hayward Chem. Co. Distribuidor (U.S.A)
	Bactospéine	Roger Bellon. (Francia)
	Plantibac	Procida. (Francia)
	Sporeine	L.I.B.E.C. (Francia)
	Biospor	Farbwerke Hoechst. (Alemania del este).
	Bathurin	Chemapol-Biokrma. (Checoslovaquia)
	Baktukal	Serum Zavod Kallinovica. (Yugoslavia).
	Dendrobacillin	Glavmikrobioprom (URSS).
	Entobacterin	Glavmikrobioprom (URSS)
	Insektin	Glavmikrobioprom (URSS)
<i>Bacillus thuringiensis</i> $\beta$ -exotoxina	Biotoksybacillin	All-Union Institute of Agricultural Microbiology (URSS).
	Eksotoksin	Glavmikrobioprom (URSS)
	Toxobakterin	Glavmikrobioprom (URSS).
<i>Bacillus moritai</i>	Lavillus M.	Sumitomo Chem. Co.

Fuente: E. Kurstak, 1982.

CUADRO No. VI

PRODUCTOS BASADOS EN *Bacillus thuringiensis*

PAIS	COMPANÍA	NOMBRE COMERCIAL	VARIEDAD
Francia	BioChem Products, A.G.	Bactospeine	<i>thuringiensis</i>
Francia	BioChem Products, A.G.	Leptox	<i>thuringiensis</i>
Francia	BioChem Products, A.G.	Bug Time	<i>kurstaki</i> (HD-1)
U.S.A.	Abbott Laboratories	Dipel	<i>kurstaki</i> (HD-1)
U.S.A.	Nutrilita Products, Inc.	Biotrol	<i>kurstaki</i> (HD-1)
U.S.A.	Sandoz, Inc.	Thuricide	<i>kurstaki</i> (HD-1)
URSS	_____	BIP	<i>alesti</i>
URSS	_____	Dendrobacilline	<i>dendrolimus</i>
URSS	_____	Entobacterine	<i>galleriae</i>
URSS	_____	Insectine	<i>thuringiensis</i>
URSS	_____	Toxobacterine	<i>thuringiensis</i>

CUADRO No. VII

MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE ESPORAS Y CRISTALES DE *Bacillus thuringiensis*.

INGREDIENTES	M E D I O S				
	B - 2a	B - 4	B - 4	B - 5	B - 5
Triptona	10.0				
Proflo <sup>a</sup>		10.0			
Harina de soya			15.0		15.0
Dextrosa	5.0	15.0		5.0	5.0
Fécula de maíz	5.0				10.0
Extracto de levadura	2.0		2.0		
Bacto-Peptona			2.0		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0				
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O		0.3			0.3
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O		0.02			0.02
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O		0.02			0.02
CaCO <sub>3</sub>	3.0	1.0			1.0
Agua destilada 1000 ml.					

a/Harina de semilla de algodón.  
Tomada de H.T. Dulmage (1971).

CUADRO No. VIII

MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION ESPORA-CRISTAL DE  
*Bacillus thuringiensis* GM-1 y GM-2

INGREDIENTES	M E D I O S										
	A-1	A-2	A-3	AE-4	E-1	E-2	E-3	C-1	C-2	D-1	D-2
	Cantidades expresadas en %										
MELAZAS	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0				
SUBPRODUCTO CITRICO								10.0 <sup>a</sup>	10.0 <sup>a</sup>	10.0 <sup>b</sup>	10.0 <sup>b</sup>
HARINA DE PESCADO	1.0	4.0	4.0	4.0	1.0	4.0					
L.R.M.	3.0	3.0	3.0				3.0			3.0	
A.CL.								3.0			3.0
CARBONATO DE CALCIO	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Agua destilada 100 ml.											

pH inicial 7.0

L.R.M.- Líquido de Remojo de Maíz.

a/ Subproductos cítricos Hidrolizados

A.C.L.- Agua de Cocimiento de Levadura.

b/ Subproductos cítricos sin Hidrolizar.

CUADRO No. IX

MEDIOS DE CULTIVO CON JUGO DE AGAVE COMO FUENTE DE CARBONO PARA PRODUCCION DEL COMPLEJO INSECTICIDA ESPORA-CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM-2

INGREDIENTES	M E D I O S			
	I	II	III	IV
	gramos/litro			
Jugo de Agave <sup>a</sup>	10.0		20.0	20.0
Harina de Soya	10.0	10.0	10.0	
A.C.L.	1.0	1.0	1.0	1.0

pH inicial ajustado a 7

a = Ajustado a 10°Brix.

A.C.L. = Agua de cocimiento de Levadura.

CUADRO No. X

MEDIOS DE CULTIVO CON JUGO DE AGAVE COMO FUENTE DE CARBONO PARA PRODUCCION DEL COMPLEJO INSECTICIDA ESPOR-CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM-2

INGREDIENTES	M E D I O S		
	V	VI	VII
	gramos / litro		
Jugo de Agave	10.0	-----	20.0
Harina de Soya	10.0	10.0	10.0
A.C.L.	1.0	1.0	1.0
CO <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.0	1.0	1.0
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2
Agua Destilada (ml ).	1000.0	1000.0	1000.0
			20.0
			-----
			1.0
			1.0
			0.2
			0.2
			0.2
			1000.0

A.C.L.: Agua de cocimiento de Levadura.  
pH: Inicial 7.0

CUADRO No. XII

MEDIOS DE CULTIVO CON MELAZAS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCION DE ESPORA-CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM-2.

INGREDIENTES	M E D I O				
	IX	X	XI	XII	
				gramos/litro	
				XIII	
				XIV	
Melazas	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Harina de soya	40.0	40.0	40.0	40.0	----
L.R.M.	30.0	----	30.0	----	30.0
A.C.L.	----	30.0	----	30.0	----
CaCO <sub>3</sub>	----	----	1.0	1.0	1.0
Agua destilada 1000 ml					

El pH inicial de todos los medios fué ajustado a 7.0

L.R.M.= Líquido de remojo de maíz.

A.C.L.= Agua de cocimiento de Levadura.

CUADRO No. XII

*Bacillus thuringiensis* GM-1 AL CRECER EN MEDIOS DE CULTIVO MELAZAS

PARAMETRO	TIEMPO (Hrs.)	MEDIOS DE CULTIVO						
		A-1	A-2	A-3	AE-4	E-1	E-2	E-3
pH	0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
	24	7.0	6.6	7.0	7.2	7.2	7.1	6.9
	48	7.5	7.4	7.5	7.6	7.3	7.4	7.0
	72	7.7	7.6	7.9	8.0	7.4	7.5	7.2
	96	8.0	8.1			7.6	7.7	
No. APROXIMADO DE CRISTALES POR CAMPO.	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	24	0.0	2.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
	48	17.0	26.0	16.0	1.0	3.0	4.0	5.0
	72	68.0	88.0	28.0	9.0	5.0	11.0	15.0
	96	122.0	153.0		32.0	23.0		
AZUCARES REDUC- TORES (mg/100ml)	0	54.0	170.0	67.1	48.9	27.0	27.0	16.4
	24	19.8	50.4	33.3	30.9	8.8	9.1	13.1
	48	13.1	9.1	6.3	9.7	3.2	5.0	3.2
	72	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

PARAMETROS DE FERMENTACION

Agitación 200 r.p.m. Inóculo 0.5% (V/V) Temperatura 30°C pH inicial 7.0

CUADRO No. XIII

*Bacillus thuringiensis* GM-2 AL CRECER EN MEDIOS DE CULTIVO CON MELAZAS

PARAMETOR	TIEMPO (Hrs.)	MEDIOS DE CULTIVO.						
		A-1	A-2	A-3	AE-4	E-1	E-2	E-3
pH	0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
	24	7.2	7.1	7.3	7.2	7.2	7.2	7.3
	48	7.5	7.5	7.4	7.6	7.5	7.7	7.5
	72	7.7	7.9	7.6	7.8	7.9	8.0	8.3
	96	8.0	8.2	7.8	7.9		8.1	
NO APROXIMADO DE CRISTALES POR CAMPO.	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	24	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	1.0
	48	5.0	4.0	3.0	3.0	15.0	5.0	8.0
	72	37.0	70.0	11.0	3.0	28.0	14.0	17.0
	96	62.0'	143.0	33.0	8.0		35.0	
AZUCARES REDUCTORES (mg/ml)	0	37.0	54.0	41.9	39.2	20.7	25.2	18.5
	24	11.7	12.9	17.4	9.9	7.5	7.0	12.4
	48	10.6	8.8	4.8	4.1	1.8	3.7	5.0
	72	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

PARAMETRO DE CRECIMIENTO

Agitación 200 r.p.m.

Inóculo 0.5%

Temperatura 30°C

pH inicial 7.0 (V/V)

CUADRO No. XIV

CINETICA DE FERMENTACION DE *Bacillus thuringiensis* GM-1, EN MEDIOS DE CULTIVO CON SUBPRODUCTOS CITRICOS: Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% V/V, pH inicial 7.0.

PARAMETRO	TIEMPO	MEDIOS DE CULTIVO			
		C-1	C-2	D-1	D-2
pH	0	7.0	7.0	7.0	7.0
	24	7.2	7.2	7.0	7.0
	48	7.3	7.5	6.9	6.9
	72	7.7	7.9	6.4	6.7
No. APROXIMADO DE CRISTALES POR CAM PO.	0	0	0	0	0
	24	27	0	0	0
	48	85	10	2	7
	72	132	23	14	13
AZUCARES REDUCTORES (mg./100 ml.)	0	34.2	24.3	14.5	12.6
	24	7.2	9.9	10.8	4.5
	48	3.6	0	1.8	3.6
	72	0	0	0	0

CUADRO No. XY

CINETICA DE FERMENTACION DE *B. thuringiensis* GM-2, EN MEDIOS DE CULTIVO CON SUBPRODUCTOS CITRICOS; -  
 Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, inóculo 0.5% (V/V), pH inicial 7.0.

PARAMETRO	TIEMPO	MEDIOS DE CULTIVO <sup>a</sup>			
		C-1	C-2	D-1	D-2
pH	0	7.0	7.0	7.0	7.0
	24	7.2	7.3	7.1	7.0
	48	7.5	7.7	7.0	7.0
	72	8.2	8.1	6.6	6.5
NO. APROXIMADO DE CRISTALES POR CAMPO.	0	0	0	0	0
	24	14	0	0	0
	48	34	7	5	2
	72	110	16	11	9
Azúcares Reductores mg/100 mL.	0	34.9	20.7	11.3	14.9
	24	11.7	7.7	5.4	6.6
	48	9.1	0	0	2.1
	72	0	0	0	0

CUADRO No. XVI

CUENTA DE ESPORAS Y ACTIVIDAD DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* A PARTIR DE MEDIOS DE CULTIVO CON MELAZAS Y SUBPRODUCTOS CITRICOS.

CEPA	CLAVE MEDIO	CUENTA DE ESPORAS (UFC./mg)	% DE MORTALIDAD EN 7 DIAS	
			T. n $\acute{a}$ .	500 $\mu$ g /ml <i>H. virescens</i>
GM-1	A-1	4.76 X 10 <sup>7</sup>	96	44
	A-2	4.99 X 10 <sup>7</sup>	100	44
	A-3	1.43 X 10 <sup>7</sup>	100	36
	AE-4	4.02 X 10 <sup>7</sup>	100	24
	E-1	2.84 X 10 <sup>6</sup>	96	56
	E-2	4.43 X 10 <sup>6</sup>	100	100
	E-3	1.29 X 10 <sup>6</sup>	100	84
	C-1	2.37 X 10 <sup>8</sup>	100	20
	C-2	1.46 X 10 <sup>7</sup>	32	24
	D-1	2.30 X 10 <sup>6</sup>	20	0
	D-2	1.95 X 10 <sup>6</sup>	20	0

CUADRO No. XVII:

CUENTA DE ESPORAS Y ACTIVIDAD DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* A PARTIR DE MEDIOS DE CULTIVO CON MELAZAS Y SUBPRODUCTOS CITRICOS.

CEPA	CLAVE MEDIO	CUENTA DE ESPORAS <sup>1</sup> IFC/mg	% DE MORTALIDAD EN 7 DIAS 500µg/ml	
			T. nú	H. virescens
GM-2	A-1	8,30 X 10 <sup>6</sup>	28	4
	A-2	1.35 X 10 <sup>7</sup>	20	8
	A-3	8.56 X 10 <sup>6</sup>	32	12
	AE-4	4.61 X 10 <sup>6</sup>	28	4
	E-1	4.43 X 10 <sup>6</sup>	20	12
	E-2	5.76 X 10 <sup>6</sup>	36	16
	E-3	1.63 X 10 <sup>6</sup>	28	4
	C-1	2.26 X 10 <sup>7</sup>	24	12
	C-2	1.14 X 10 <sup>7</sup>	16	8
	D-1	2.93 X 10 <sup>6</sup>	12	0
	D-2	1.67 X 10 <sup>6</sup>	8	0

CUADRO No. XVIII

TOXICIDAD DE *Bacillus thuringiensis* GM-2 CRECIDA EN MEDIOS A BASE DE MELAZAS  
O JUGO DE AGAVE SUPLEMENTADOS CON HARINA DE SOYA.

MEDIO	CUENTA DE ESPORAS UFC/mg	% DE MORTALIDAD EN 7 DIAS 500ug /ml T. ml	H. virescens
I	1.8 X 10 <sup>6</sup>	8	8
II	1.6 X 10 <sup>6</sup>	16	*
III	2.2 X 10 <sup>6</sup>	12	*
IV	-----	*	*
V	1.5 X 10 <sup>6</sup>	20	28
VI	1.0 X 10 <sup>6</sup>	32	4
VII	2.0 X 10 <sup>6</sup>	20	8
VIII	-----	*	*
IX	1.0 X 10 <sup>6</sup>	8	4
X	2.5 X 10 <sup>6</sup>	4	0
XI	3.9 X 10 <sup>6</sup>	20	0
XII	1.7 X 10 <sup>6</sup>	20	4
XIII	1.0 X 10 <sup>6</sup>	8	0
XIV	-----	*	*

\* Bicensayo no realizado

**APENDICE  
DE  
FIGURAS**



**DIAGRAMA BASICO PARA LA  
OBTENCION DEL COMPLEJO  
BIOINSECTICIDA DE B. THURINGIENSIS**

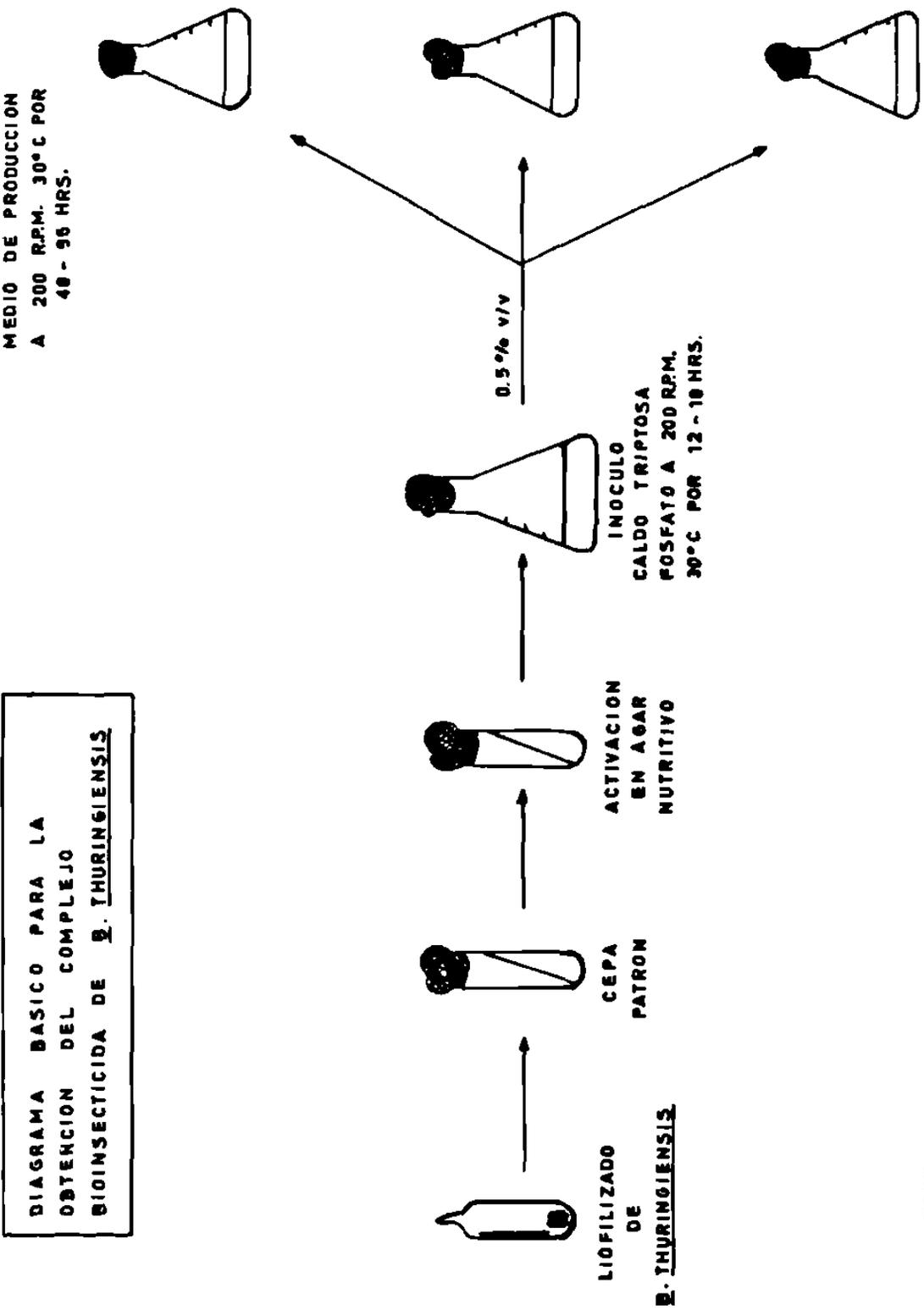


FIGURA II

DESCRIPCION GENERAL DE BIODIAGNOSTICOS

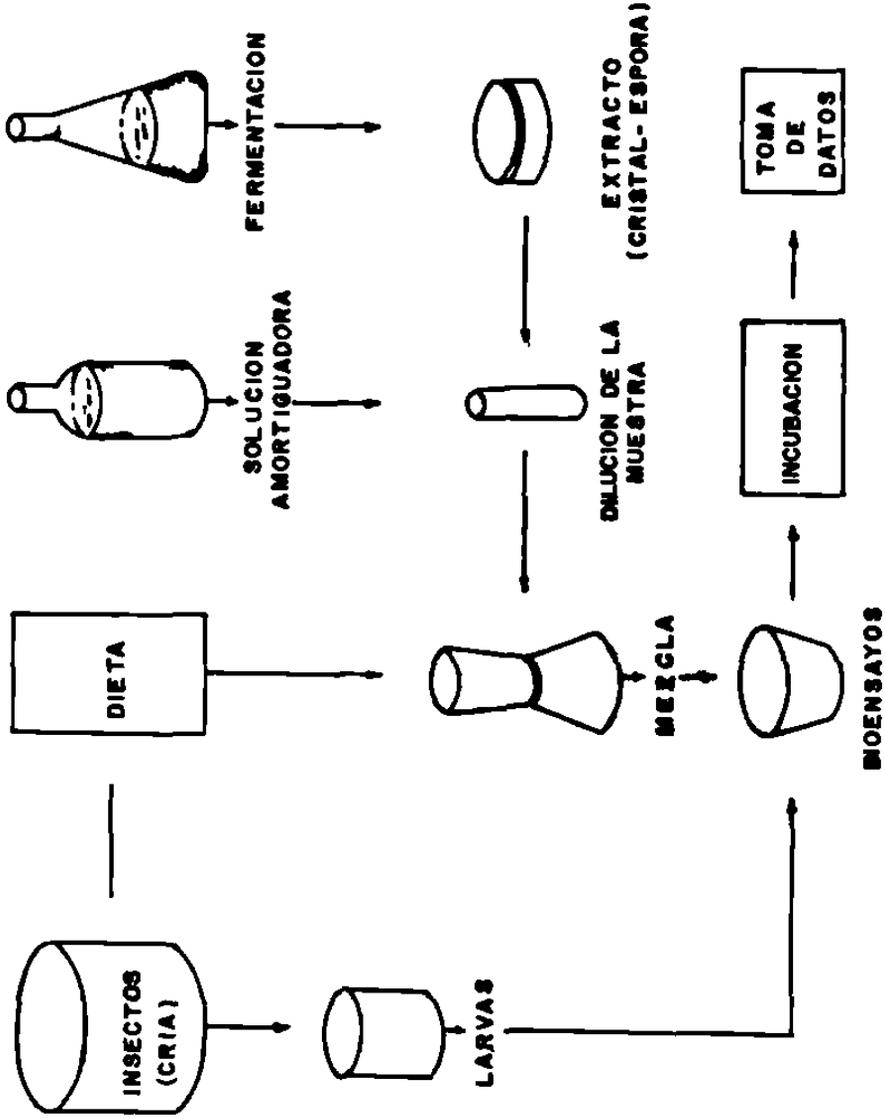
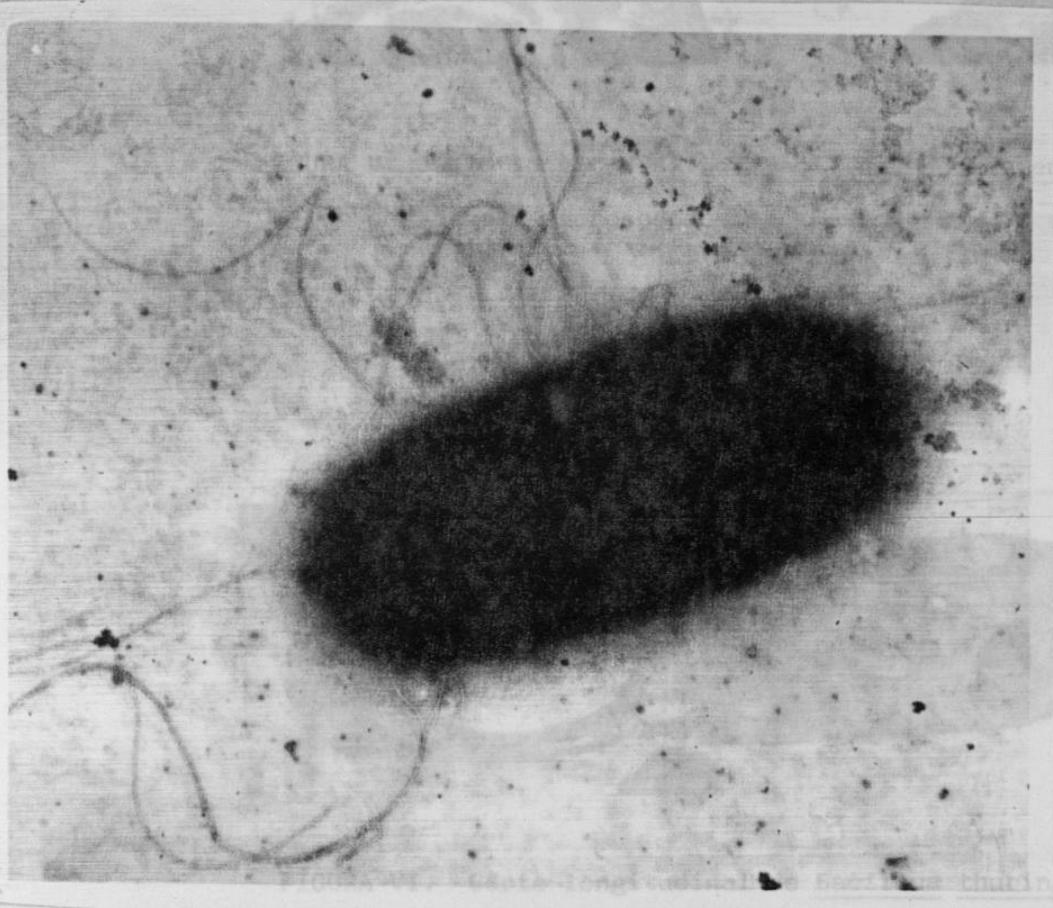


FIGURA III



*Bacillus thuringiensis* GM-2, al microscopio electrónico de transmisión (30,000 aumentos).

FIGURA IV. Bacillus thuringiensis GM-1 al microscopio electrónico de transmisión aplicando la técnica de Tinción negativa con Acetato de Uranilo (18,512 Aumentos).

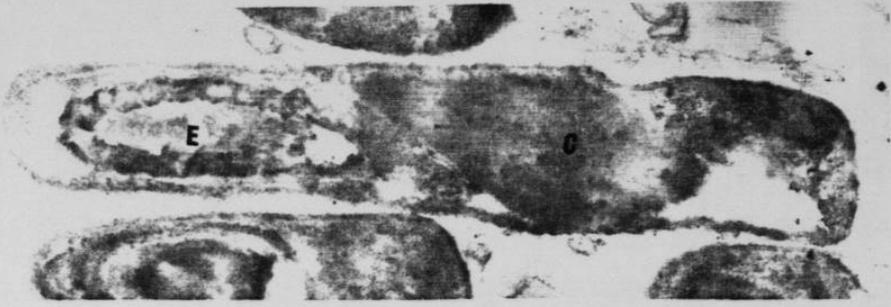


FIGURA V. Corte longitudinal de Bacillus thuringiensis GM-1 observado al microscopio electrónico (30,000 aumentos).

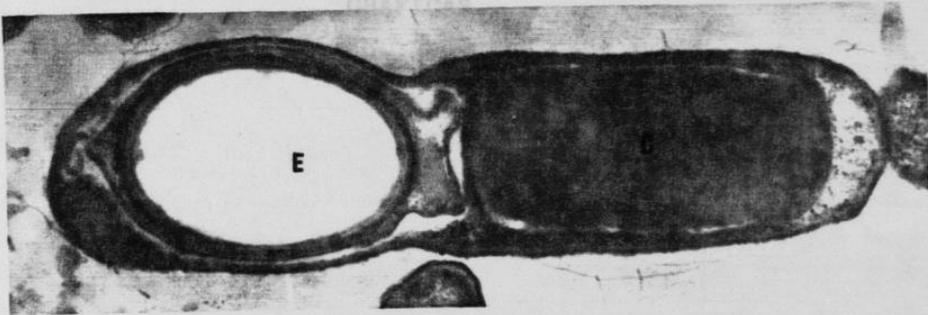
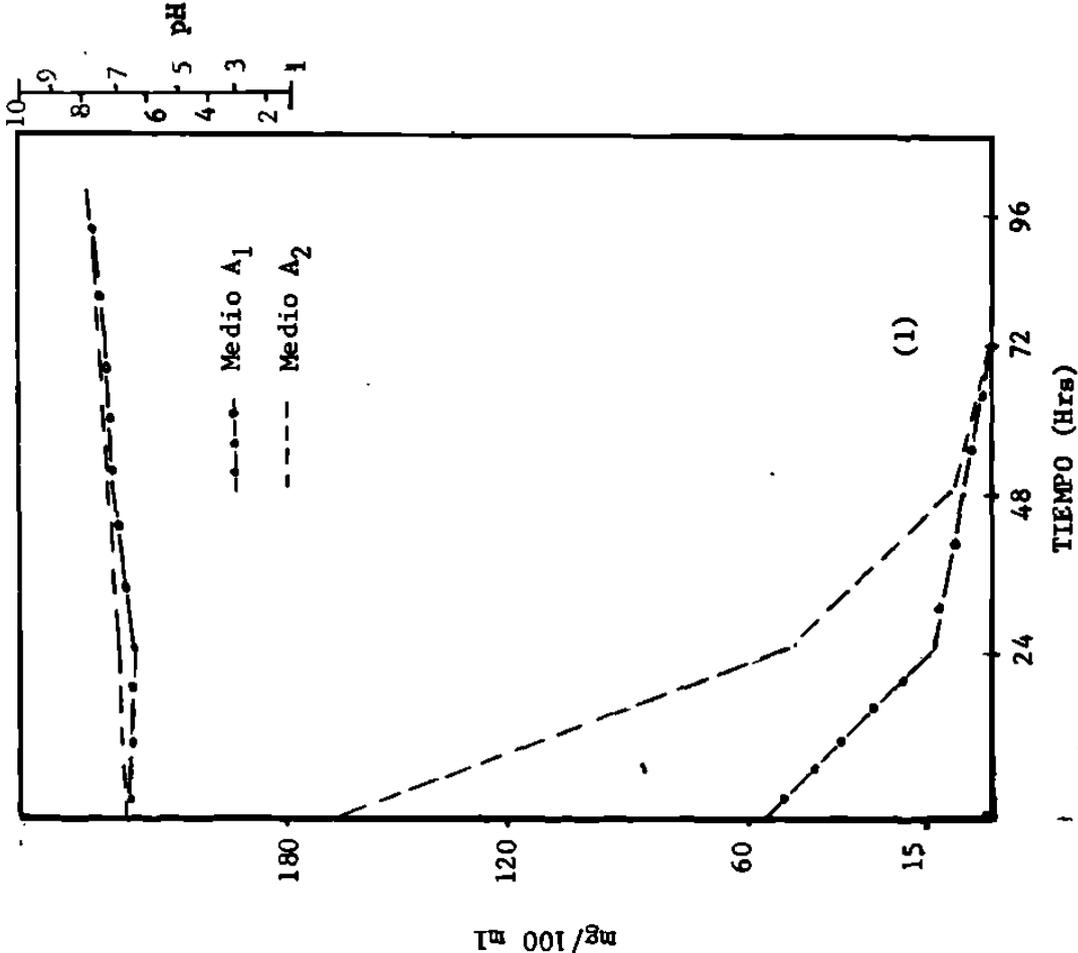


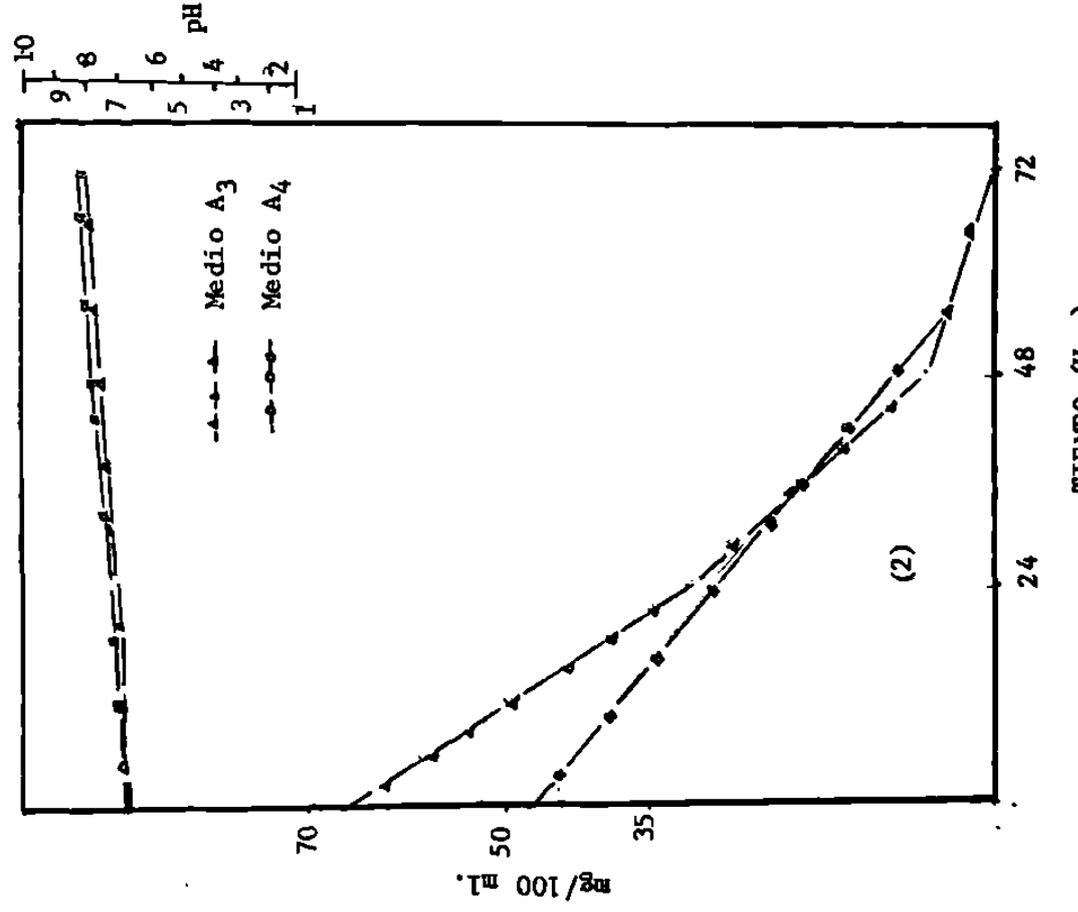
FIGURA VI. Corte longitudinal de Bacillus thuringiensis GM-2, al microscopio electrónico de transmisión (30,000 aumentos).

APENDICE  
DE  
GRAFICAS



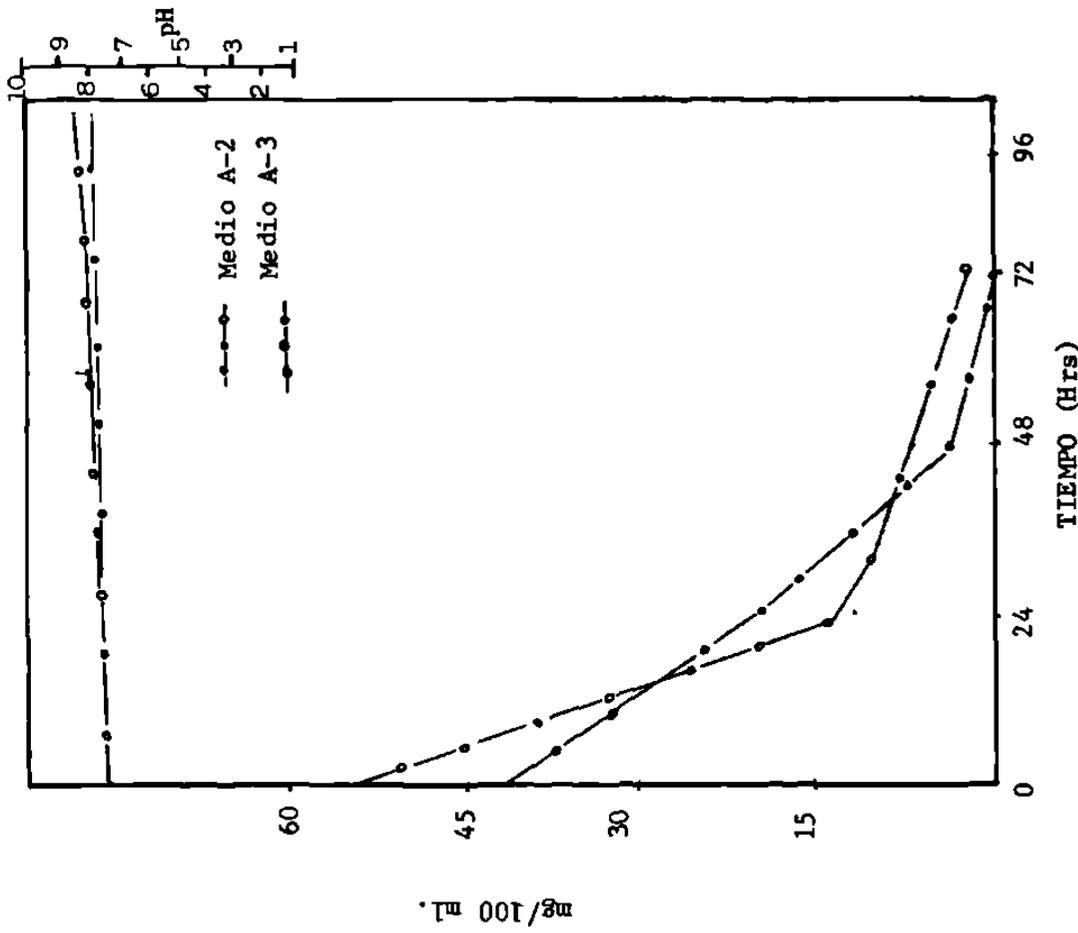
GRAFICA No. 1

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-1 en medios de cultivo A-1 y A-2; Agitación 200 r.p.m.; Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH inicial 7.0.



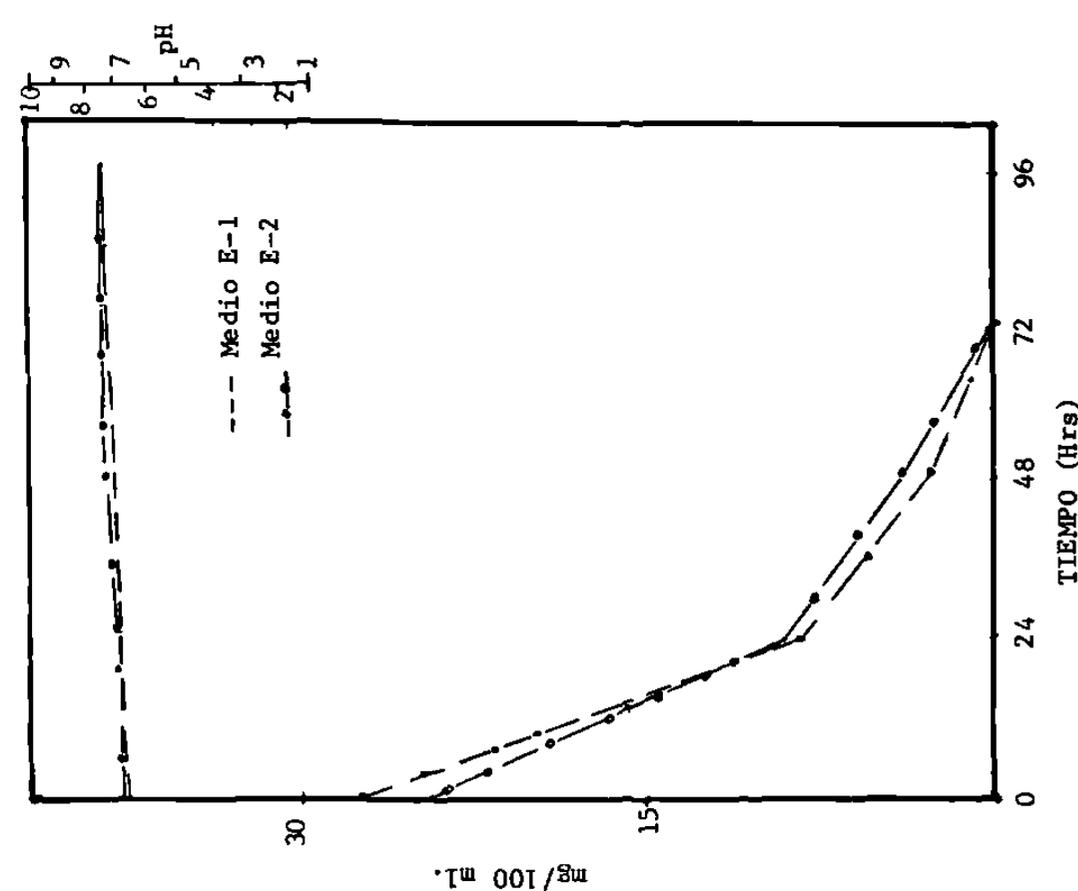
GRAFICA No. 2.

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-1 en medio de cultivo A-3 y A-4; Agitación 200 r.p.m.; Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V) pH inicial 7.0.



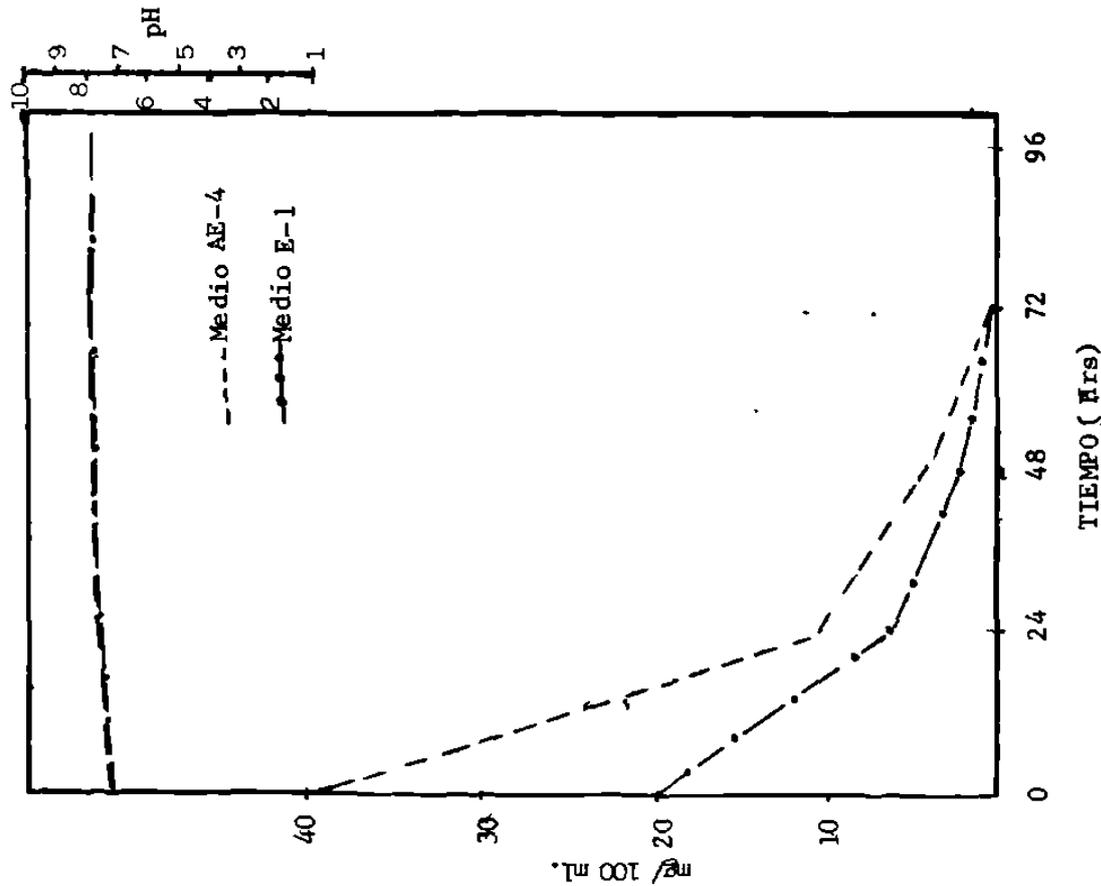
GRAFICA No. 4

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-2 en medios de cultivo A-2 y A-3; Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH - inicial 7.0.



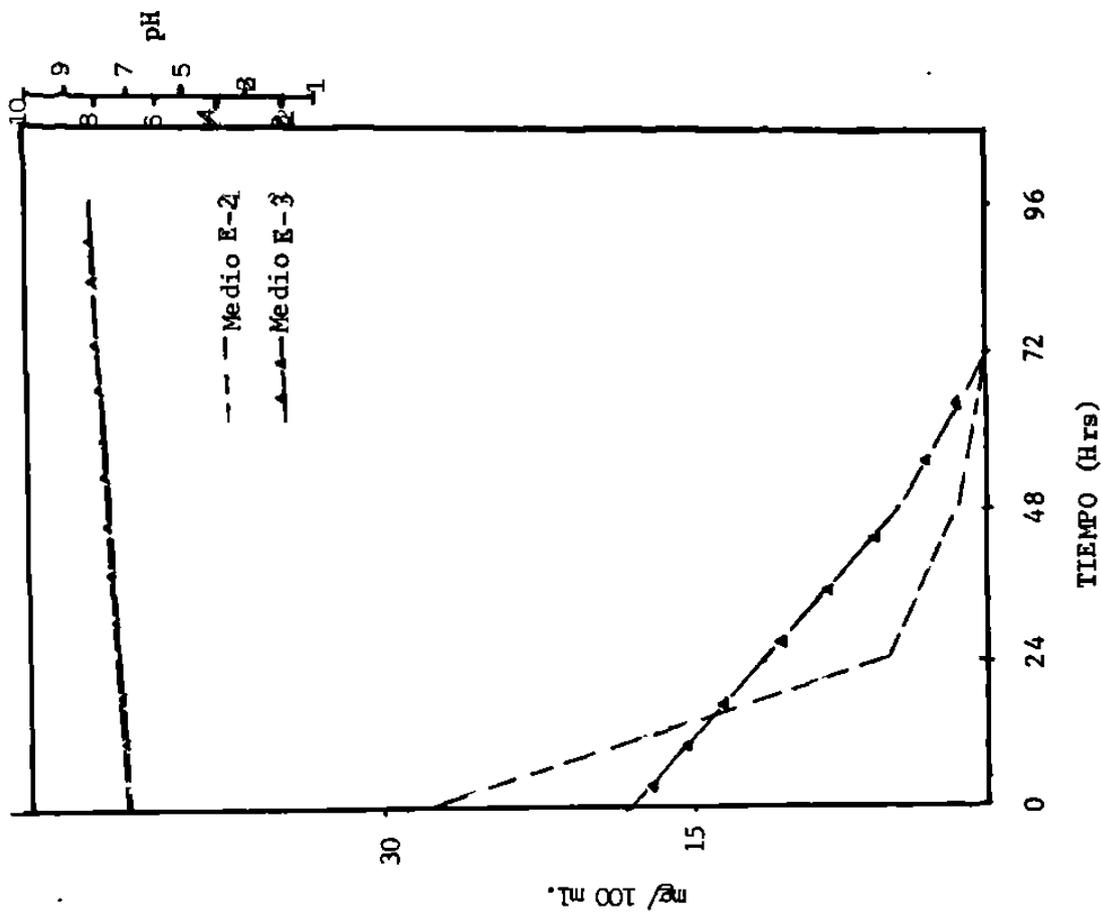
GRAFICA No. 3

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-1 en medios de cultivo E-1 y E-2; Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH - inicial 7.0.



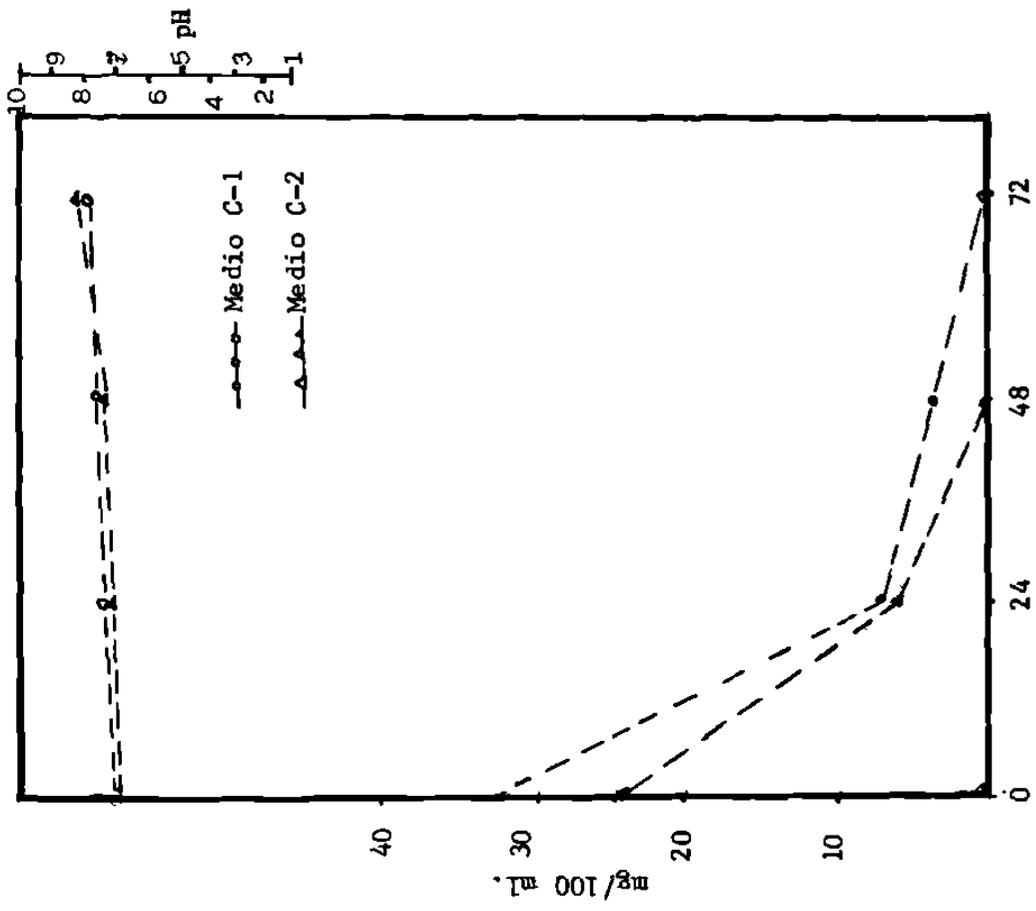
GRAFICA No. 5

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-2 en medio de cultivo AE-4 y E-1; Agitacion 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH inicial 7.0.



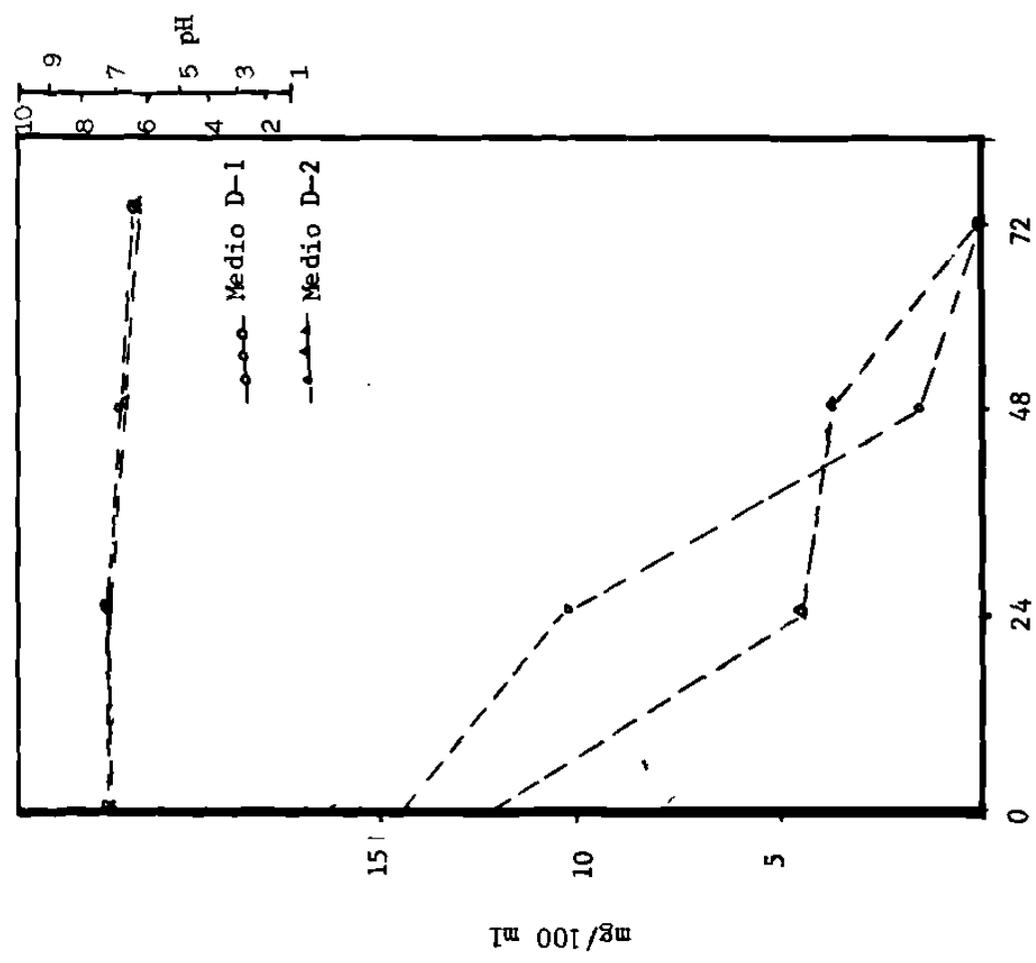
GRAFICA No.6

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-2 en medio de cultivo E-2 y E-3; Agitacion 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH inicial 7.0.



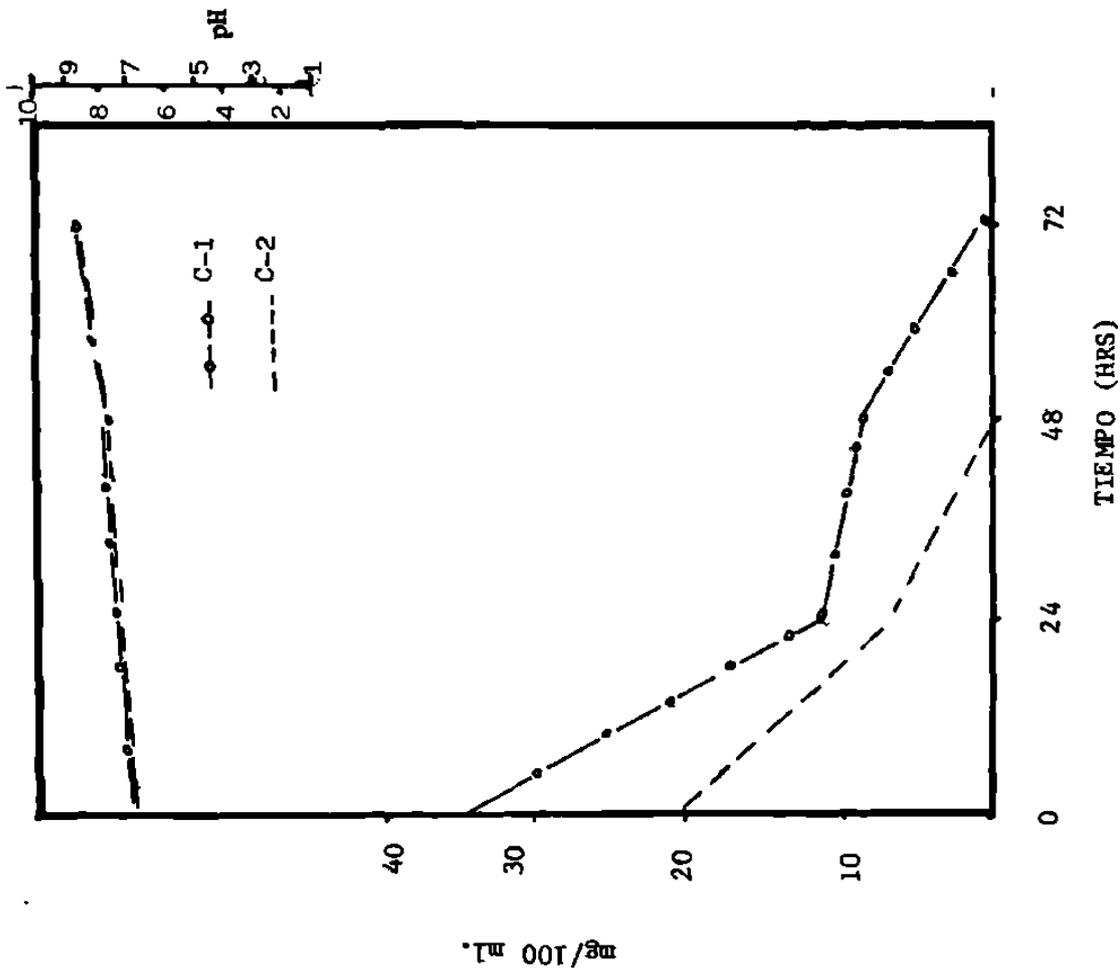
GRAFICA No. 8

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-1 en medio de cultivo C-1 y C-2; Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH inicial.



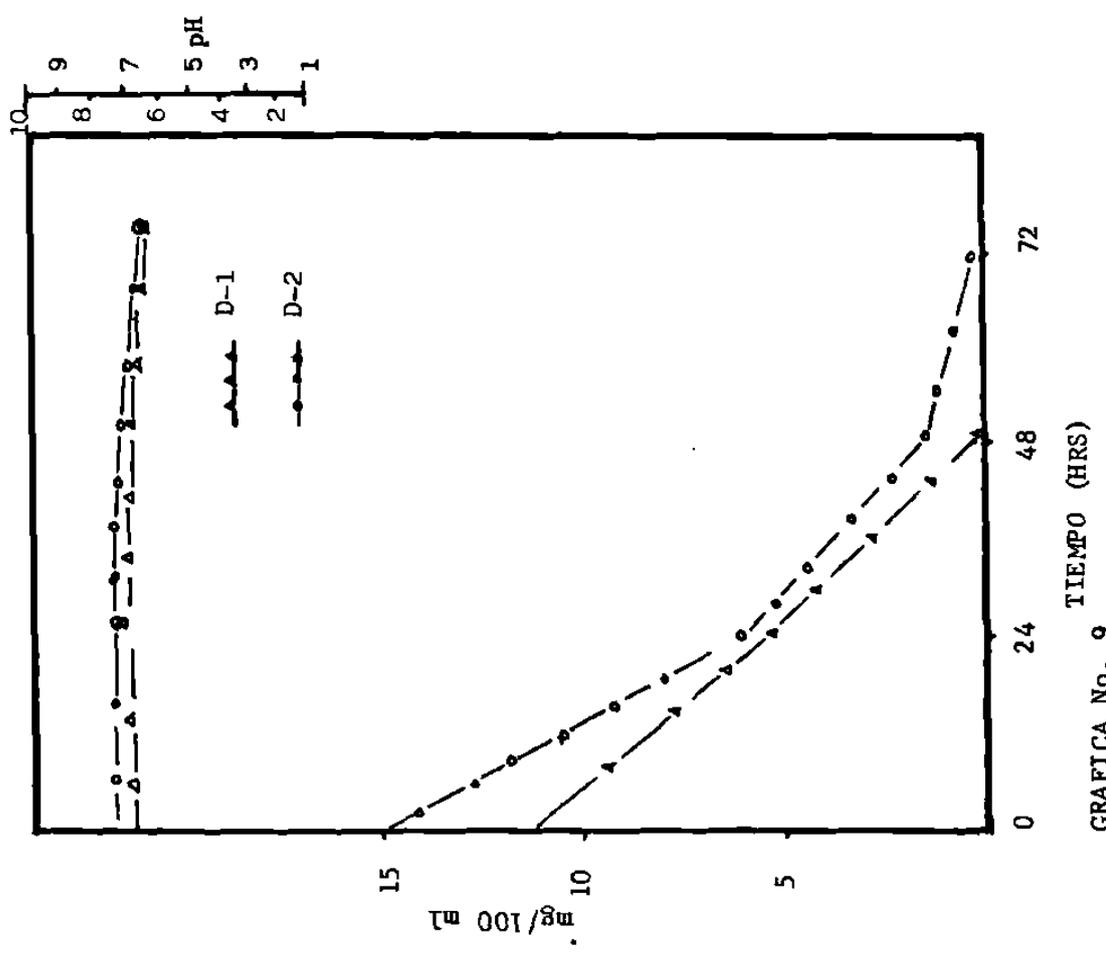
GRAFICA No. 7

Consumo de azúcar de *B. thuringiensis* GM-1 en medios de cultivo D-1 y D-2; Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (V/V), pH inicial 7.0.



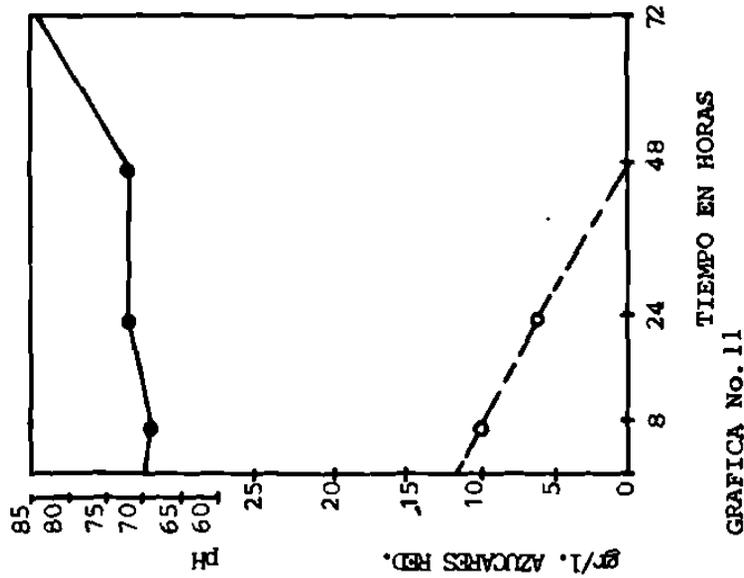
GRAFICA No. 10

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* en medios de cultivo C-1 y C-2; Agitación 200 r.p.m., Temp. 30°C, Inóculo 0.5% (W/V) pH inicial 7.0



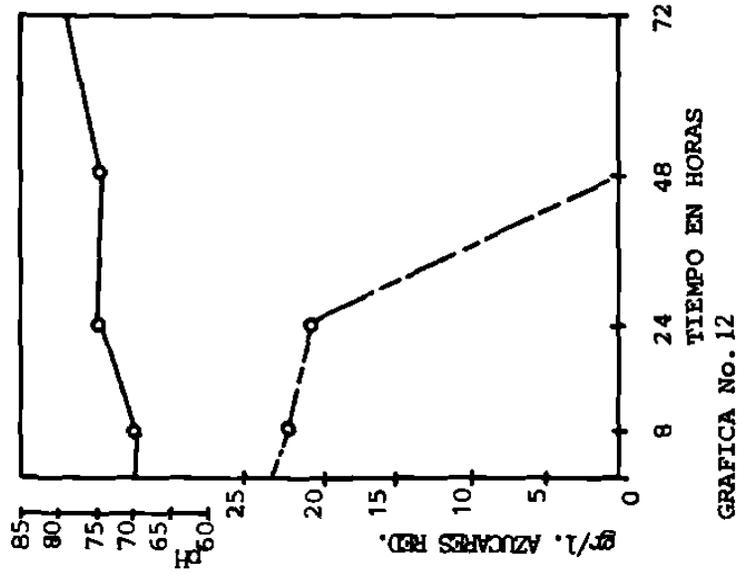
GRAFICA No. 9

Consumo de azúcares de *B. thuringiensis* GM-2 en medios de cultivo D-1 y D-2, Agitación 200 r.p.m., Temperatura 30°C, Inóculo 0.5% (V/V) pH inicial 7.0.



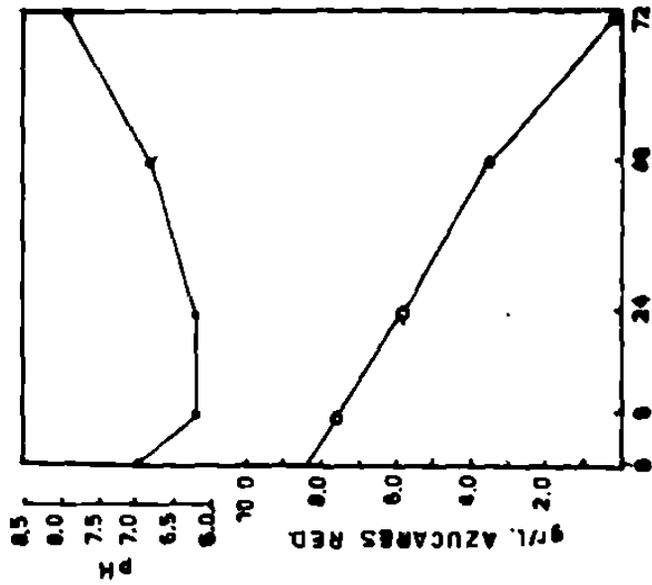
GRAFICA No. 11

Cinetica de Fermentación de *B. thuringiensis* GM-2 en medio de jugo de agave 2%, Harina de Soya y Agua de cocimiento de Levaduras, 200 rpm, Inóculo 0.5% pH inicial 7.0, Temperatura 28-30°C.



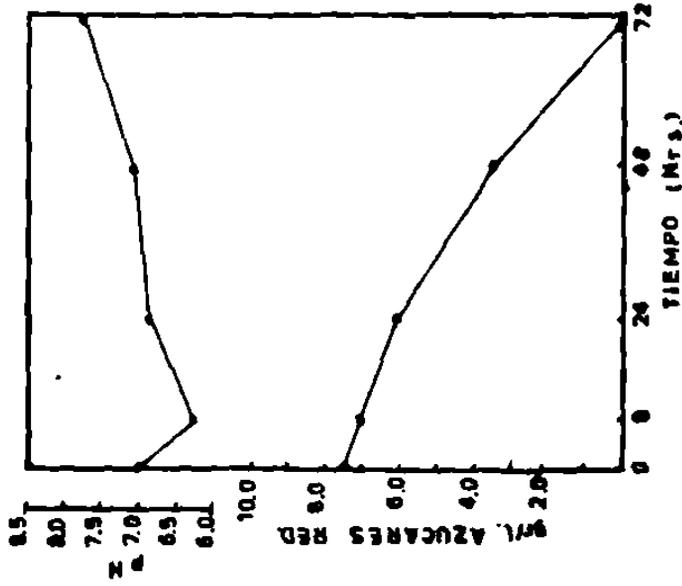
GRAFICA No. 12

Cinetica de Fermentación de *B. thuringiensis* GM-2 en medio de jugo de agave 1%, Harina de soya y Agua de cocimiento de Levaduras 200 rpm, Inóculo 0.5% pH inicial 7.0, Temperatura 28-30°C.



GRAFICA NO. 13  
TIEMPO (Hrs.)

Cinética de Fermentación de *B. thuringiensis* GM-1 en medio de melazas 2%, líquido de remojo de maíz 200 r.p.m., inóculo 0.5%, pH inicial 7.0; Temperatura 28-30°C.



GRAFICA NO. 14

Cinética de Fermentación de *B. thuringiensis* GM-2 en medio de melazas 2%, Agua de cocimiento de levaduras y  $\text{CaCO}_3$ , 200 r.p.m. inóculo 0.5%, pH inicial 7.0, Temperatura 28 - 30°C

