

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



PRODUCCION DE CEPAS NATIVAS DE Bacillus thuringiensis
Y SU ACTIVIDAD EN Aedes aegypti Linnaeus y
Culex pipiens quinquefasciatus Say.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CATALINA RIVAS MORALES

DIRECTOR:

M.C. LUIS J. GALAN WONG

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1988

TM

QR82

.B3

R5

C.1



1080074555

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



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. CATALINA RIVAS MORALES

DIRECTOR:

M.C. LUIS J. GALAN WONG

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1988

TM
QR 82
.B3
RS



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

Producción de cepas nativas de Bacillus thuringiensis
y su actividad en Aedes aegypti Linnaeus y Culex - --
pipiens quinquefasciatus Say.

TESIS COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS (ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL)

QUE PRESENTA: Q.F.B. Catalina Rivas Morales

SEPTIEMBRE DE 1988



PRESIDENTE: M. en C. Luis J. Goján Wong

SECRETARIO: M. en C. Juan M. Cuevas Martínez

VOCAL: Dr. Gabriel Gojon Lorrija

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

Sr. Ignacio Rivas Flores (+)
Sra. Justina Morales de Rivas
Con amor y eterna gratitud.

A MI ESPOSO:

Q.F.B. Manuel Leos Leos
Con amor.

A MIS HIJOS:

Manuel, Catalina y Francisco Fernando
Con cariño.

A MIS HERMANOS:

Ignacio, Dolores, Francisco, Mercedes, Eguenia, Rocío y
Justina.
Con cariño

Al M.C. Luis J. Galán Wong

Por su dirección, orientación y asesoría para el presente trabajo.

A mis sinodales:

Dr. Gabriel Gojón Zorrilla y M.C. J. Manuel Cuevas Martínez por su acertada revisión.

A mi maestro:

Dr. Jorge Valenzuela Pérez. Por sus enseñanzas

Al Biol. Ma. Luisa Rodríguez Tovar

Por la realización de los bioensayos

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Por la clasificación serológica

Al Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo Q.B.P. Marivel Gómez Treviño, M.C. Gabriel Gallegos Morales y Q.B.P. Lucía Leticia Palacios Cortéz, por su apoyo y colaboración.

Al Dr. Salvador Contreras B, a la Dra. Julia Verde Star al Q.F.B. Azucena Oranday C, al Q.B.P. Eduardo Martínez V, por su amistad y estímulo para culminar el presente trabajo.

Al Ing. Jorge A. Rivera C.

Por la reproducción de ésta tesis

A la Sra. Yolanda Castillo de Hernández por la mecanografía

Al Personal del Depto. de Bioquímica por su compañerismo

A mis amigos.

Mi sincero agradecimiento a:

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
U. A. N. L.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
U. A. N. L.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	3
METODOLOGIA	19
RESULTADOS	25
DISCUSION	28
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
LITERATURA CITADA	51

INDICE DE TABLAS

TABLAS:

1	INGREDIENTES EN MEDIOS USADOS EN EL ESTUDIO DE <u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u> .	35
2	CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS DE <u>Bacillus</u> - - <u>thuringiensis</u> .	36
3	PROCEDENCIA DE LAS CEPAS UTILIZADAS DE <u>Bacillus</u> - - - - <u>thuringiensis</u> .	
4	CLASIFICACION SEROLOGICA PARA LAS SIGUIENTES CEPAS DE - <u>Bacillus thuringiensis</u> .	38
5	PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS PARA LA IDENTIFICACION - DE LAS CEPAS DE <u>Bacillus thuringiensis</u> .	39
6	MEDIOS DE CULTIVO UTILIZANDO MELAZA COMO FUENTE DE CARBONO PROBADAS CON LAS CEPAS DE <u>Bacillus thuringiensis</u> .	43
7	MEDIOS DE CULTIVO UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO PROBADAS CON LAS CEPAS DE <u>Bacillus thuringiensis</u> .	44
8	MEDIO DE CULTIVO Y TIEMPO DE FERMENTACION UTILIZADOS PARA LAS CEPAS DE <u>Bacillus thuringiensis</u> .	45
9	CINETICA DE FERMENTACION DE <u>Bacillus thuringiensis</u> .	46
10	RELACION DE CEPA, MEDIO DE CULTIVO, VOLUMEN FINAL, PESO EXTRACTO Y CUENTA VIABLE DE FERMENTACION DE <u>Bacillus</u> -- <u>thuringiensis</u> ,	47
11	PORCENTAJE DE MORTALIDAD <u>Aedes aegypti</u> CON <u>Bacillus</u> - - <u>thuringiensis</u> .	48

12	PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN <u>Culex pipiens quinquefasciatus</u> CON <u>Bacillus thuringiensis</u> .	49
13	CONCENTRACION LETAL MEDIA (LC_{50}) DE <u>Bacillus thuringiensis</u> PARA <u>Aedes aegypti</u> .	50
14	CONCENTRACION LETAL MEDIA (LC_{50}) DE <u>Bacillus thuringiensis</u> PARA <u>Culex pipiens quinquefasciatus</u> .	50

FIGURAS:

1	FERMENTACION Y RECUPERACION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE <u>Bacillus thuringiensis</u>	23
2	BIOENSAYOS DE LOS EXTRACTOS DE <u>Bacillus thuringiensis</u> CON - LARVAS DE MOSQUITO.	24
3	CINETICA DE FERMENTACION DE <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-49 IV	33
4	CINETICA DE FERMENTACION DE <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-50 II	34

ABREVIATURAS

LC ₅₀	dosis letal media
RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desocirribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
P/V	peso/volumen
g/cm ³	gramos/centimetro cúbico
ppm	partes por millón
mg/l	miligramos por litro
mg	miligramos
esporas/ml	esporas por mililitro
g/l	gramos por litro
VVM	volumen a volumen de medio
UI/mg	unidades internacionales por miligramos
Ug/ml	microgramos por mililitro
°C	grados centígrados
%	por ciento
min.	minutos
hr.	hora
Std.	estándar
l	litro

RESUMEN

Siete cepas nativas de Bacillus thuringiensis fueron aisladas de muestras de suelo o mosquitos muertos, tres de ellas GM-7, GM-49 y GM-50 pertenecientes a la var. aisawai, serotipo 7, mostraron diferencias en sus pruebas bioquímicas y toxicidad, indicando que el serotipo no está relacionado con la toxicidad. Los aislados se propagaron en once medios de cultivo distintos con la finalidad de seleccionar las cepas y medios de cultivo que favorecieran la toxicidad. Solamente exhibieron toxicidad las cepas GM-49 y GM-50 al cultivarse en los medios a base de melaza, harina de soya, agua de cocimiento de levadura; al medio IV se adicionó carbonato de calcio. Los bioensayos con Aedes aegypti presentaron una dosis letal media de 102.1 mg/l, 69.68 mg/l y 8.05×10^{-3} mg/l para GM-49 y GM-50 y el estándar IPS-82 respectivamente, para Culex pipiens quinquefasciatus fué de 50.04 mg/l, 102.48 mg/l y 1.5×10^{-2} mg/l para GM-49 y GM-50 y el estándar IPS-82 respectivamente.

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

Los mosquitos Aedes aegypti Linnaeus y Culex pipiens quinquefasciatus - - Say, transmiten las enfermedades de Dengue y Filariasis, respectivamente; - - - 13,534 casos de Dengue clásico se presentaron en el país, en 1985, según reportes realizados por la Secretaría de Salubridad y Asistencia; 130 millones de ca-
sos de Filariasis se presentaron a nivel mundial, en 1982, reportadas por la or-
ganización mundial de la salud.

Los datos anteriores muestran la importancia de encontrar una medida efec-
tiva y complementaria, para controlar los vectores que transmiten estas enferme-
dades. Estos mosquitos son plagas domésticas; se crían en cisternas y todo tipo
de recipientes, que se encuentran al rededor de donde vive el hombre. Los mos-
quitos presentan resistencia a diferentes insecticidas químicos, cuyo almacena-
miento y uso inadecuado de ellos, son factores que bajan su eficiencia, surgien-
do problemas ecológicos (7,65).

Los problemas anteriores despiertan un gran interés en utilizar microorga-
nismos, para control biológico de insectos plaga. Los bioinsecticidas de - - --
Bacillus thuringiensis presentan grandes ventajas, respecto a los insecticidas -
químicos, como: especificidad, efectividad, selectividad e inocuidad para el hu-
mano. Bacillus thuringiensis produce una delta endotoxina o cristal que se uti-
liza como agente entomopatógeno (7).

El laboratorio de Microbiología Industrial, FCB-UANL cuenta con un cepario
de Bacillus thuringiensis, del cual se seleccionaron siete cepas, para el pre-
sente trabajo. La toxicidad y forma de la toxina de Bacillus thuringiensis de-
penden de la variedad y medio de cultivo; debido a esto, se considera de vital
importancia, determinar que variedad y medio de cultivo producen mayor toxici-
dad.

Objetivo General: Producir y determinar la toxicidad de siete cepas de Bacillus
thuringiensis, crecidad en once medios de cultivo diferentes, probándolas en --
larvas de Aedes aegypti Linnaeus y Culex pipiens quinquefasciatus Say.

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

HISTORIA:

Las primeras observaciones de una bacteria, con las características de -- Bacillus thuringiensis, se realizaron por Ishiwata en 1901-1902, quien aisló la bacteria de una oruga enferma del gusano de seda (Bombyx mori), denominándola Bacillus sotto (31).

Bacillus thuringiensis se aisló originalmente en Berlín en el distrito de Thuringen, de orugas enfermas de la palomilla del Mediterráneo Anagata - - - - kunniella, por Berliner, en 1909-1912, quién descubrió el bacilo y su patogenicidad (41).

Berliner, en 1911, aisló una bacteria de palomillas enfermas de la harina Ephestia kuhniella; a la cual denominó Bacillus thuringiensis en 1915, ésta bacteria la describió como: un bacilo esporulado, Gram (+), flagelar; observó que el bacilo en esporulación, contenía una inclusión, aparte de la espora, designándolo como Restkörper o cuerpo de desecho; sugirió que este cuerpo, está formado por material, el cual no es utilizado en el proceso de esporulación, este cuerpo de desecho primero es esférico, luego cambia a forma romboidal. Mattes, en 1922, confirma esta observación, agregando que la posición de la espora cambia con el crecimiento del cuerpo (12,30).

Metałnikov y Chorine, en 1929, reportaron que Bacillus thuringiensis es - fuertemente patogénico para la palomilla gitana (Porthetria dispar) y larvas de Aporia erataegi y Vanessa urticae; los mismos investigadores observaron que su patogenicidad era específica para larvas de Lepidópteros (63).

Smith y col., en 1946, describieron a Bacillus thuringiensis como una variedad de Bacillus cereus por su especificidad para ciertos insectos, así como su morfología (1,28,29).

Steinhaus, en 1951, reportó por primera vez, el uso exitoso de B. - - - - thuringiensis en Estados Unidos, contra la oruga de la alfalfa Colias philodice eurytheme Boisduval. Realizó aplicaciones en campo con B. thuringiensis, obtuvo una reducción rápida en la población de insectos (11,29).

Hannay, en 1953-1956, encontró en esporulados de Bacillus thuringiensis, cristales libres en forma de diamante, denominándolos cuerpos paraesporales, los cuales estaban constituidos químicamente de proteínas. Sugirió que los -- cristales, probablemente se relacionaran con una sustancia tóxica, inductora de la septicemia de orugas de insectos (11,29).

Angus, en 1954-1956, demostró que el cristal contenía una toxina soluble en álcali y tóxica para los insectos, probándolo experimentalmente (19).

Steinhaus, en 1951-1956, motivó con sus publicaciones el uso y explotación comercial de B. thuringiensis, como agente microbiano, contra algunas -- plagas de lepidópteros en Estados Unidos. La Pacific Yeast Products en 1957 fué la primera, en producir preparaciones comerciales a base de Bacillus - - thuringiensis (3).

En la actualidad varios países elaboran productos a base de Bacillus - - thuringiensis (49).

Barjac y Bonnefoi, en 1962-1973, propusieron que Bacillus thuringiensis fuera clasificado en variedades de acuerdo a las reacciones antigénicas del - flagelo (Antígeno "H"), éste lo presentan las células vegetativas móviles, - de estas especies; este antígeno es estable y específico, en algunos casos se complementa con pruebas bioquímicas específicas. Los aislados de Bacillus - - thuringiensis son llamados Serovariedades (23).

H A B I T A T

Bacillus thuringiensis es un parásito facultativo de insectos, se encuen - tra también como saprófito en suelo, sus endoesporas permanecen latentes en - condiciones adversas, por años; si este encuentra un medio propicio, germi - na cuando el huésped es un insecto, favorece su multiplicación y al esporular produce el cuerpo paraesporal, el cual resulta tóxico (1).

Smirnoff y Mac Leod, en 1961, demostraron que B. thuringiensis no presen - ta efectos tóxicos en aves y mamíferos. La ausencia de toxicidad en estos ani - males, confiere a la bacteria importancia como insecticida biológico y la po - sibilidad de diseminarlo en la naturaleza, (20,51).

Tony de Lucca y col., en 1981, realizaron un estudio, sobre la persistencia de B. thuringiensis en el medio ambiente de suelos agrícolas de U.S.A., - estos no habían estado en contacto con formulaciones de este tipo y en suelos que se encuentran lejos de criaderos de insectos lepidópteros o granos almacenados; de 46,373 colonias de bacilos que encontraron solo 250 (0.05%) pertenecían a B. thuringiensis, de las variedades que existen, aislaron 5 de ellas: - galleriae, kurstaki, indiana, damstadiensis y dakota (15).

Samples y Buettner, en 1983, descubrieron una cepa de B. thuringiensis, aislada de una úlcera de córnea humana, que presenta tres cuerpos paraesporales y una espora, manifestando un desacuerdo con las publicaciones realizadas anteriormente (57).

AISLAMIENTO:

- a) Método físico .
- b) Método químico

a) Método físico:

Aizawa y col., en 1961, desarrollaron un método basado en la " Termoresistencia " de Bacillus thuringiensis, el cual consiste en suspender un gramo de tierra en 10 ml de agua estéril, agitando por 5 min; el sobrenadante se transfiere a tubos que se calientan a 65°C, por 30 min, se realizan diluciones en agua destilada o solución salina, se sembró en agar nutritivo (pH 7.4), se incubó de 4-7 días a 28°C y se realizaron observaciones microscópicas de las colonias (48,50).

b) Método químico:

Saleh y col., en 1969, utilizan la selectividad de los antibióticos, en placas de agar nutritivo, que contienen sulfato de polimixina B (5ppm) y penicilina G (4ppm), se inoculó con una serie de diluciones y se incubó a 37°C, por 48 hrs.; se confirma con microscopía, la presencia del cristal paraesporal característico (56).

Una combinación de ambos métodos fué realizada por Ohba y col., en 1980, quienes aislaron dos nuevas subespecies, Bacillus thuringiensis subsp. - - kumamotoensis (Serotipo 18) y Bacillus thuringiensis subsp. tochigiensis - - (Serotipo 19) (49).

TOXINAS:

Bacillus thuringiensis produce varios metabolitos tóxicos activos:

δ -exotoxina.- Es una protefna, termolábil, producida por - - - - -
Bacillus thuringiensis y Bacillus cereus, en la fase logarítmica de su crecimiento a pH 6.0 - 9.0, esta enzima actúa afectando los fosfolípidos de la membrana, causando lisis o necrosis.

β -exotoxina.- Es un nucleótido, termoestable, producido por ciertas variedades de Bacillus thuringiensis (Serotipo 1, 4a, 4c, 8, 9 y 10), durante la fase vegetativa y soluble en agua. Farkas y col., en 1969, determinan su estructura química, compuesta por adenina; ribosa; glucosa y ac. alárico con un grupo fosfato. Este nucleótido produce deformación y muerte durante la fase pupa; actúa interfiriendo la RNA-polimerasa dependiente del DNA, bloqueando la formación del RNA (26).

γ -exotoxina.- Es una enzima no identificada, responsable del aclaramiento del agar yema de huevo; su toxicidad no está determinada (26).

δ -endotoxina.- Es un cristal protéico, que proporciona la principal actividad insecticida a los extractos de Bacillus thuringiensis, es formada en el proceso de esporulación, se deposita en forma cristalina, dentro del esporangio. Es una característica que permite diferenciar a Bacillus thuringiensis (29).

El cristal de la δ -endotoxina al ser ingerido, se hidroliza por enzimas proteolíticas, que actúan en el proceso de digestión.

Efectos de la δ -endotoxina. Esta cuando es ingerida por larvas de lepidópteros, mosquito y mosca negra, produce toxicidad (6,12).

El cristal protéico es una protoxina, que es hidrolizado por enzimas que intervienen en el proceso de digestión, en combinación con el pH alcalino del intestino medio, donde actúa y causa destrucción del epitelio (12).

La acción específica de la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis depende de:

- a) La variedad de B. thuringiensis, la cual produce cierto tipo de cristal.
- b) La activación por proteasas del jugo intestinal.
- c) El tipo de células epiteliales del intestino donde actúa la toxina activada (40).

Cooksey y col., en 1969, reportaron que la conducción nerviosa es bloqueada por los cristales de proteína en Periplaneta americana, produce un rompimiento en la regulación del ión potasio en la sinápsis, afecta la conducción de impulsos. Estos investigadores sugirieron que el cristal actúa disminuyendo la permeabilidad de la membrana, por rompimiento en la regulación del ión potasio (10,53).

Harvel y Wolfersberger, en 1979, demostraron en larvas de Manduca sexta, dos mecanismos de acción propuestos para la toxina, estos pueden ocurrir simultáneamente; encontraron un polipéptido, proveniente de la hidrólisis de la toxina capaz de inhibir el transporte de potasio, provocando desacoplamiento primario en la fosforilación oxidativa (34).

De Barjac, en 1978, realizó un estudio histopatológico en larvas expuestas a la toxina; observó que el epitelio del intestino medio es afectado, presentando hinchamiento típico y seguido de una destrucción del tejido (31).

BIOSINTESIS:

Hannay, en 1953, estudió la formación de esporas en Bacillus sotto, por medio de Microscopio Electrónico, observó un cuerpo paraesporal, el cual es un pequeño cristal en forma de diamante, constituido de proteína, presentó atención a su naturaleza e importancia como agente microbial (47).

Norris, en 1969, observó el cristal de proteína, por microscopía electrónica, contraste de fases y técnicas inmunológicas; dicho cristal no se sinte--

tiza en forma soluble antes de la cristalización, originalmente el cristal se empieza a formar inmediatamente después que se presentan las proteínas en la célula en esporulación (53).

Betchel y Bulla, en 1976, estudiaron la esporulación y formación del cristal paraesporal, encontraron que no existe relación del exosporium con el cristal protéico, se determinó que el cristal, es formado durante el envoltamiento de la espora, concluyeron que el cristal de Bacillus thuringiensis se forma en el citoplasma, sin intervención de los mesosomas, septo de la forespora o exosporium (4).

Mikkola, en 1982, determinó que los serotipos 5, 10, 11 y 14, presentan inclusiones pleomórficas, ausentes de toxicidad sobre lepidópteros; estas cepas empiezan a formar sus inclusiones, antes de la formación del septum, en el estado I de la esporulación, durante la formación del filamento axial y cerca de la membrana celular; se sugiere que Bacillus thuringiensis se subdivide en 2 grupos entomopatógenos y la toxicidad se relacione con la morfología de las inclusiones, resultando inadecuado asociar la toxicidad con serotipos a base del antígeno "H" (43).

METODOS PARA ESTUDIAR EL CRISTAL:

- a) Microscopía de luz
- b) Microscopía electrónica
- c) Difracción de rayos "X"

a) El cristal se observó fácilmente con microscopio de luz, mediante la fijación con calor y teñido con colorantes fuertes como fuchsina, negro de naftaleno, gíemsa, cristal violeta, azul victoria; los cristales se tiñen y las esporas quedan libres de pigmentos.

Hannay, en 1953, utilizó microscopía de fases, con nigrosina para facilitar la observación dentro del esporangio (28).

b) Se utilizó microscopía electrónica.

Hannay, en 1953, observó que los cristales de Bacillus thuringiensis - -
 -- /son bipiramidales, con estriaciones prominentes en la superficie de 2.9 -
 nm aproximadamente.

Labaw, en 1964, utilizó una técnica de réplica al carbón, indicó que la subunidad de proteína básica tiene 8.7 nm (47).

c) Holmes y Monro, demostraron por difracción de rayos "X", que el cristal es una subunidad proteolítica cilíndrica o bola acampanada de 4.7 nm de ancho y 11.8 nm de largo aproximadamente (47,53).

METODO DE PURIFICACION:

En Bacillus thuringiensis resulta difícil separar espora y cristal, por su similitud en tamaño y características superficiales (45).

Para estudios analíticos del cristal se requiere alta pureza. Cuatro propiedades se utilizan en la separación de espora y cristal que son: densidad - relativa, propiedades de superficie, solubilidad y germinación de la espora (54,58). Los primeros métodos probados para separar el cristal, se basan en - sistemas difásicos, empleando varios solventes orgánicos y polímeros de alto peso molecular (45).

Angus, en 1954, desarrolló un método para separar espora y cristal, en - una fase líquido-líquido, dando origen a muchas variaciones. Hannaig utiliza un método para la separación de esporas y cristales, combinando carga de su-
 -perficie y densidad con electroforesis continua (10)

Vanková, en 1957, utilizó centrifugación con gradientes de densidad de - sucrosa (45). Pendleton y Marrison, en 1966, propusieron un método que se - basa en la hidrofobicidad de las esporas, las cuales son separadas por espuma y flotación, removiendo 60% de esporas y recuperando 76% de cristales (52).

Fast, en 1972, purificó el cristal con ultracentrifugación isopícnica, - utilizó gradientes de CsCl a una conc. 40% p/v v 50,000 rpm, durante 16 hrs. en rotor 5W 65, obtuvo 4 bandas, una de cristales puros 1.30 g/cm^3 y la de es

poras 1.35 g/cm^3 .

Sharpe y col., en 1975, encontraron que los cristales, pueden separarse de las esporas a velocidades moderadas de centrifugación (10,000-12,000 rpm) en gradientes de renografin, presentó para esporas 1.30 g/cm^3 y para los cristales 1.27 g/cm^3 , en diatrizato de sodio 1.32 g/cm^3 y 1.27 g/cm^3 , para esporas y cristales respectivamente (45, 58).

Ang y Nickerson, en 1978, utilizaron centrifugación zonal con gradientes de NaBr, encontraron banda de cristales 1.32 g/cm^3 y de esporas 1.38 g/cm^3 . La producción de cristales tuvo un rango de 15-20%, la densidad difiere de la observada en CsCl y renografin, aunque las densidades no son comparables en diferentes tipos de gradientes (45).

Nishitsutsuji-Wwo Makisaka, en 1975, probaron con mutantes no esporulados para facilitar la purificación (45, 66).

Rao y Shethna utilizaron una técnica, basada en la propiedad preferencial de agregación de cristales y subsecuente separación de esporas, en columna con NaH_2PO_4 ; NaCl y glicerol pH 5.5, obtuvieron 99% cristales puros (54).

MEDIOS DE FERMENTACION:

La actividad insecticida de Bacillus thuringiensis se determina por la presencia de la δ -endotoxina producida durante la fase de esporulación, su producción y toxicidad dependen del medio de cultivo en que es producido.

Dubois, en 1968, cultivó Bacillus thuringiensis mediante un procedimiento Batch de laboratorio en un medio constituido por: glucosa 2.0g; Bactopeptona -- (Difco) 2.0g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0mg; K_2HPO_4 ; MgSO_4 0.03g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 18 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.5mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 40.0mg; por litro de agua destilada; de este medio obtuvo 2×10^8 esporas/ml (2×10^7 esporas/ml termorresistentes) (16, 27).

Pendleton, en 1969, probó un medio a base de 2% de harina de pescado; 1% de almidón; 0.1% CaCO_3 ; 0.001% de niacina y mezcla de sales (51).

Dulmage, en 1970, aisló Bacillus thuringiensis var. kurstaki y obtuvo concentraciones altas de δ -endotoxina, en un medio a base de triptona 10.0g/l; dextrosa 5.0g/l; almidón 5.0g/l; extracto de levadura 2.0g/l; K_2HPO_4 1.0g/l; KH_2PO_4 1.0g/l. Este investigador recomienda utilizar sustratos baratos, como: harina de soya (15g/l) y harina de semilla de algodón (10g/l) (20).

Norris, en 1971, comprobó que Bacillus thuringiensis, se desarrolla en medios específicos y esporula en presencia de sales (Singer 1966), su producción es mejorada por la adición de aminoácidos en un medio constituido por: glucosa 0.1%; extracto de levadura 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.02%, KH_2PO_4 0.05% y sales minerales, la glucosa se utiliza en la primera fase exponencial cuando se produce ácido acético y pirúvico, los cuales producen un descenso en el pH 5.0; el ácido acético posteriormente se metaboliza y eleva el pH 7.0 (2-3 hr); algunos agentes que interfieren en el metabolismo del acetato previenen la esporulación de Bacillus thuringiensis e inhiben la síntesis del cristal, un ejemplo es el fluoroacetato, el cual impide el metabolismo del acetato, por inhibición; la aconitasa hidratasa es un inhibidor efectivo de formación de esporas y cristal; otro inhibidor es el ácido picolínico (Yousten 1969). La eritromicina a bajas concentraciones inhibe el crecimiento de bacterias, impide el desarrollo de esporas maduras y permite la formación del cristal.

El esporangio no se lisa en presencia de antibióticos y el cristal permanece en el interior de las paredes celulares (Arescaldino 1969). La síntesis de una enzima proteolítica extra celular, es indicio de la iniciación en la es población (47).

Goldberg y col., en 1980, optimizaron la producción del complejo espora -- endotoxina de Bacillus thuringiensis, a escala piloto (500:1), en un medio de: glucosa 30.0 g; peptona de soya 2.0 g; extracto de levadura 4.5 g; líquido de remojo de maíz 5.0 ml; (76% de sólidos); KCl 3.0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g; H_3PO_4 7 ml; MgSO_4 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 36.0 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 13.5 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; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 40 mg por cada litro de agua - destilada; incubó a 32°C, con aereación de 0.3 VVM agitación de 120-150 rpm, a pH 6.2 - 7.4, de donde obtuvieron 4×10^6 UFC/ml en 60 hrs. aproximadamente -- (26).

Dulmage, en 1971, recuperó los complejos de δ -endotoxina de 16 aislados - de Bacillus thuringiensis var. alesti (serotipo 3a) y 2 aislados de Bacillus thuringiensis var. kurstaki (serotipo 3a, 3b), los cuales fueron producidos en 3 medios a base de sales minerales, diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, tales como: triptona, proflo, harina nutrisoya, almidón de maíz, extracto de levadura y bactopectona. Con esta investigación se reenfatisa que la producción de la δ -endotoxina, es un problema de fermentación; para medir la potencia de la δ -endotoxina, se realizó una cuenta de esporas viables presentes en la preparación, para determinar la actividad insecticida. La cuenta viable de esporas se generalizó como método para medir la potencia de las formulaciones de Bacillus thuringiensis, esta determinación resultó inadecuada (20).

Scherrer y col., en 1973, cultivaron Bacillus thuringiensis, en diferentes concentraciones de glucosa determinaron que a mayor concentración de glucosa, - se obtiene cantidades mayores de la δ -endotoxina, con alto contenido de proteína y actividad insecticida. La máxima producción de δ -endotoxina, se obtuvo en un medio semisintético con 6-8 g/l de glucosa; a esta concentración de glucosa los cristales alcanzaron un tamaño de 2.0 μm de longitud aproximadamente; a niveles mayores de glucosa la producción de la δ -endotoxina aumenta; se requiere de 9,000 cristales para inhibir la alimentación de la larva; en ausencia de glucosa, esta se redujo a 8,000 cristales en un medio que contenía 1.0 g de glucosa por litro; las condiciones óptimas se alcanzaron con 8.0 g de glucosa por litro

y se requirió de 2,200 cristales para frenar la toma de alimento del insecto - (2).

Gouch y Ross, en 1980, recomendaron fuentes naturales de nitrógeno, tales como: harina de pescado, harina de semilla de algodón, líquido de remojo de -- maíz, harina de soya, levadura autolisada y caseína. Entre las fuentes de carbono se incluyen productos de maíz hidrolizados: almidón y dextrosa; éstas - - fuentes permiten bajar los costos (11).

Salama y col., en 1981, utilizaron varios subproductos industriales y - - agrícolas, como: harina de pescado, harina de semilla de algodón, levadura de forraje, sangre de res, subproductos secos de ave, líquido de remojo de maíz, - suero de queso, líquido de la centrifugación final en la producción de almidón de maíz; leguminosas como: habas, frijol de soya, garbanzo, judías, cacahuate y lentejas; estas se incorporaron a un medio a base de glucosa 6.0g/l; extracto de levadura 2.0 g/l; K_2HPO_4 4.3g/l; $CaCO_3$ 2.0g/l, y sales minerales 2.0g/l. Estos medios se utilizaron para producir Bacillus thuringiensis, variedades -- kurstaki y entomocidus; se encontró que la producción de esporas en estos productos, es diferente en ambas variedades, se obtuvo que las mezclas con levadura de forraje, dieron cuentas mas altas, cuando se añade sangre de res; tuvo - actividad insecticida apreciable contra Heliothis armigera y la variedad entomocidus presentó buena actividad sobre Spodoptera littoralis (48).

Maldonado, en 1981, reportó la actividad insecticida de Bacillus - - - - thuringiensis GM-1, en un medio constituido por: jugo de agave, harina de soya al 1%; presentó una potencia de 10,900 UI/mg; Dulmage, en 1970, reportó para -- Bacillus thuringiensis HD-1, una potencia de 18,000 UI/mg, la de mayor activi-- dad hasta la fecha (42).

Smith, en 1982, determinó el efecto de la cepa y variación del medio de - cultivo, en la producción de toxina por Bacillus thuringiensis variedad israelensis (serotipo H-14), observó variación en la producción de la toxina, letal en larvas de mosquito, dependiente de la cepa y medio de crecimiento (composición de medios, Tabla 1). En medios amortiguados no se observó mejor toxicidad, que en medios sin amortiguar; el rango de pH 5.7-8.1 en el cultivo. Concluyó en este estudio, que es inadecuado depender de un conjunto simple de cri

terios cuando se valoran nuevas cepas, donde el producto de interés es una toxina para el insecto; el indicador principal de toxicidad es la habilidad de causar la muerte a la larva. Es interesante señalar que la variación de la producción de toxina es una respuesta a la composición del medio por aislados naturales; consideró que la producción in-vitro de Bacillus thuringiensis var. israelensis (serotipo 14) es prometedora (62).

ESTANDARIZACION:

Dulmage y col., en 1971, propusieron una estandarización de bioensayos para las formulaciones de Bacillus thuringiensis, basada en unidades internacionales utilizando el rizador de coliflor (Trichoplusia ni), el producto es incorporado a una dieta a base de harina de alfalfa, para larvas de 15-25 mg; se alimentan por 5 días; se determinó LC_{50} de la formulación a prueba, se compara con una preparación estándar, la toxicidad se expresa en UI/mg. En el Coloquio Internacional de Patología de Insectos y Control Microbial en Weegingen, en 1966, los Países Bajos recomendaron que E-61, una formulación del Instituto Pasteur, Francia, se adoptará como estándar internacional, asignándole una potencia de 1,000 IU/mg. Sugirieron, preservar el mantenimiento de la E-61 y que cada laboratorio prepare sus propios estándares secundarios; determinar la potencia en IU/mg en bioensayos comparados con E-61 y utilizar -- este estándar secundario para todos los bioensayos de rutina (Burges 1967) (19).

Dulmage, en 1973, obtuvo una formulación de δ -endotoxina producida por Bacillus thuringiensis var. kurstaki aislado HD-1, este fué adoptado como el estándar primario de referencia en Estados Unidos, se determinó HD-1-S-1971, asignándole una potencia de 18,000 IU/mg comparado con el estándar internacional E-61 (22).

BIOENSAYO:

El hombre desea controlar las plagas de insecto, sin riesgo de envenenamiento del cultivo y otras especies o causar daños secundarios. Los insecticidas químicos carecen de estas características. El uso y almacenamiento inadecuado de los insecticidas afecta su eficiencia, surgiendo problemas de conta-

minación ambiental, de agua y alteraciones ecológicas (6,8).

Los mosquitos son insectos-plaga abundantes, se alimentan de sangre caliente, causan molestias al hombre y otros animales; además, son vectores de muchas enfermedades; entre ellos se encuentra Aedes aegypti Linnaeus, comúnmente conocido como Mosquito Tigre, transmisor de los virus del Dengue y fiebre amarilla y Culex pipiens quinquefasciatus Say, denominado Mosquito casero del norte, este último se alimenta de sangre de aves, ocasionalmente pica al hombre, la hembra de este mosquito puede transmitir el virus de Encefalitis y las filarias -- Wuchereria bancrofti y Dirofilaria immitis (9,33,36).

Debido a estos problemas, se buscan alternativas para controlar los vectores transmisores de estas enfermedades. Los insecticidas biológicos a base de bacterias, producen enfermedad y muerte de los insectos, logrando así el control de dichas plagas. Las bacterias formadoras de esporas tienen ventaja sobre otro tipo de bacterias, debido a que producen esporas, que sobreviven en almacenamiento por largo tiempo y tienen larga vida después de la aplicación.

Las enfermedades son más efectivas contra insectos que viven bajo stress, como alimentación pobre o condiciones de sobrepoblación.

Bacillus thuringiensis produce una protoxina que se divide en fragmentos tóxicos por proteasas en el intestino medio del insecto, intervienen importantes factores como: proteasas presentes en intestino y pH.

Los insecticidas de contacto matan todos los estadios de un insecto por contacto con sus superficies corporales, a diferencia de los insecticidas biológicos a base de Bacillus thuringiensis; la infección se presenta principalmente en el estadio larval, por ingestión con el alimento. Los cultivos esporulados de bacterias, pueden ser secados y formar un polvo fino durable, que es aplicado como suspensión; se utilizan técnicas desarrolladas para químicos, como aplicación con adhesivos, agentes humectantes, emulsificadores diluyentes y acarreadores, los cuales están libres de efectos bactericidas y bacteriostáticos. Se encontraron compuestos satisfactorios para la aplicación de los insecticidas biológicos tales como: leche en polvo descremada, lacas de vinil, mezclas de aminoestearato, agua, aceite y algunas arcillas.

Para el diagnóstico de Bacillus thuringiensis se utilizan 3 métodos que son:

- 1) Pruebas bioquímicas
- 2) Pruebas serológicas
- 3) Análisis de esterasas de las células vegetativas por electroforésis en gel de almidón (7).

Dulmage, en 1970, recuperó el complejo espora cristal, de caldos producidos por 12 variedades de Bacillus thuringiensis, se encontró que es inadecuado predecir la actividad por: variedad, cantidad de crecimiento del organismo y medio de fermentación. La cantidad de δ -endotoxina y concentración depende de la variedad y los dos medios utilizados.

Para determinar la potencia de las formulaciones de δ -endotoxina, se requiere de un bioensayo; serotipo, medio de fermentación o cuenta de esporas.

Los primeros trabajos de Sternohous y Jerrel, en 1950, enfatizan que se considere lo siguiente:

- 1.- Especificar la variedad y aislado usado como las condiciones de producción de la δ -endotoxina.
- 2.- Medir la actividad por medio de un bioensayo, es inadecuada la cuenta de esporas, por lo tanto es inconveniente hacer estandarizados por cuenta de esporas.
- 3.- Estudiar la producción de la δ -endotoxina de Bacillus thuringiensis como un problema de fermentación (18).

Hall y col., en 1977, probaron 127 extractos de 16 variedades representativas, mas dos extractos sin identificar, todas fueron cultivadas en un medio estandarizado y probadas contra larvas de mosquito Aedes aegypti, A. triseriatus, Culex tarsalis, Culex pipiens y Culex quinquefasciatus. La mayoría de los extractos fueron moderadamente patogénicos a una concentración -- 1,100 µg/ml. Formulaciones de 26 extractos presentaron efecto con - - - - A. triseriatus, Culex tarsalis y A. aegypti con LC_{50} baja/1 µg/ml; las formulaciones mas patogénicas comparadas, HD-169/R-567B y HD-96/R547D, presentaron una LC_{50} de 0.04 y 0.06 µg/ml, respectivamente, contra A. triseriatus, Culex pipiens y Culex quinquefasciatus; 23 formulaciones causaron 50% de mortalidad a concentraciones entre 4 y 10 µg/ml (22).

Hornby y col., en 1981, estudiaron la persistencia y actividad larvicida de Bacillus sphaericus 1593, se comparó el hábitat natural del mosquito, en agua dulce y varias concentraciones de agua de drenaje; los niveles iniciales de Bacillus sphaericus fluctúan entre 4.0×10^4 a 7.1×10^5 esporas/ml en - - agua dulce, con 100% en el control de larvas de Culex quinquefasciatus Say; y Culex nigripalpus Theobald por 30-50 días en agua de drenaje, 100% de control por 80-90 días, a una concentración de esporas de Bacillus sphaericus de 7.5×10^4 esporas/ml. El estadio de pupa se presentó cuando la concentración de esporas, era de 100 esporas/ml o menor. Por medio de estos resultados concluyeron que la actividad larvicida de Bacillus sphaericus, depende de la concentración de esporas y su persistencia se relacionó con la calidad del agua -- (32).

Klowden y col., en 1983, estudiaron la toxicidad de Bacillus - - - thuringiensis var. israelensis, sobre mosquitos adultos Aedes aegypti; determinaron que la hembra adulta de mosquito Aedes aegypti, muere por los cristales paraesporales de Bacillus thuringiensis var. israelensis (O NR-60A), estos cristales se introducen por drenado intestinal, la dosis letal media - -- para cristales intactos fué de 0.021 µg/mg de mosquito (peso húmedo) y para cristales solubilizados 0.04 µg/mg., estos valores se compararon con larvas - de mosquito de alimentación libre, con dosis de 0.018 µg/ml y 1.28 µg/ml para cristales intactos y cristales solubilizados, respectivamente. Demostraron -- que las preparaciones probadas resultan infectivas para larvas y mosquitos -- adultos; estos investigadores recomiendan un bioensayo en mosquitos adultos, -

como medio directo para seleccionar la potencia que controle los mosquitos - -
(37).

Cheung y Bruce, en 1985, observaron que el cristal de la δ -endotoxina, -- producido por Bacillus thuringiensis var. israelensis, es mas tóxico sobre larvas de Anopheles freeborni, que en larvas de Aedes aegypti, cuando el cristal se solubilizó; las larvas de ambas especies mostraron sensibilidad similar, -- consideraron que este efecto, se debe a diferencias entre el comportamiento de alimentación de las larvas de los 2 mosquitos. La toxina fué emulsificada con un adyuvante completo de Freund, este solubilizó la toxina a bajo nivel, de nanogramos, posteriormente se fracciona la toxina con material lipolítico, alterando la fluctuación de la toxina, respecto a la sensibilidad de la larva de - los 2 mosquitos; esta diferencia en suspensión, fué determinada por una enzima inmunoabsorbente específica para péptidos tóxicos. Los resultados obtenidos indicaron que económicamente es factible desarrollar formulaciones de suspensiones de cristales de Bacillus thuringiensis var. israelensis (13).

Mulla y col., en 1985, experimentaron con larvas del 4º estadio de Aedes aegypti y Anopheles albimanus, y demostraron que Bacillus thuringiensis var. - israelensis, puede crecer vegetativamente, esporular y producir toxina; en - - Aedes aegypti la cuenta de esporas fué de 2×10^2 por cadáver, en 4 hr y en -- Anopheles albimanus de 2.2×10^3 por cadáver, en 4-24 hr, incrementándose a -- 3.2×10^5 por cadáver, en 72 hr post-tratamiento. Estos resultados demostraron que bajo condiciones apropiadas Bacillus thuringiensis var. israelensis, puede utilizar sustratos disponibles en cadáveres de larvas (44).

M E T O D O L O G I A

1.- AISLAMIENTO:

Se recuperaron 3 cepas nativas de Bacillus thuringiensis de muestras de suelo; las cuales se identificaron con las claves GM-7, GM-18 y GM-20; las dos primeras provienen de Guanajuato y la otra de Nuevo León; las 4 cepas restantes se aislaron de cadáveres de mosquito Aedes aegypti, las cuales se identificaron con las claves GM-47, GM-48 y GM-50 (características de las cepas. Tabla 2). Las cepas fueron serológica y bioquímicamente identificadas (Tabla 3) la identificación serológica se realizó mediante pruebas inmunológicas, utilizando antígeno flagelar H con sus respectivos antisueros (38). Las pruebas bioquímicas, Tabla 5, se llevaron a cabo por la metodología tradicional ampliamente conocida (5). Estas determinaciones se efectuaron en el Depto. de Microbiología e Inmunología, en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas,UANL.

2.- CONSERVACION DE LA CEPA:

Se cultivó en tubos inclinados de agar nutritivo, se incubó a 32-34°C, por 72 hr, fueron posteriormente almacenados a 4°C, se realizaron resiembras para su conservación.

3.- PREPARACION DEL INOCULO:

- a) De las cepas conservadas en agar inclinado a 4°C, se toma una asada que se transfiere a una caja petri, con agar nutritivo, se distribuye en 3 campos, se incuba a 30-32°C, por 24 hr; de una colonia aislada se realizó un frotis, posteriormente se utiliza la misma colonia para preparar el inóculo.

- b) En matraces Erlenmeyer de 250 ml se depositan 50 ml de caldo triptosa - fosfato (Difco), esterilizados a 121°C, por 15 min, se inocula con -- una asada de la colonia aislada, en agar nutritivo, se incuba a 30-32°C, por 6-8 hr, a 250 rpm.

4.- FERMENTACION:

En este trabajo se probaron 11 diferentes medios de cultivo, cuya composición en g/l se encuentran reportados en las Tablas 6 y 7. Las fermentaciones se realizaron a nivel de matraz Erlenmeyer de 500 ml; se colocaron 100 ml de medio de cultivo (I al XI), esterilizados a 121°C por 15 min., se adicionaron 0.5% del inóculo, previamente preparado en caldo triptosa fosfato (Difco) se incubaron a 30-32°C, por 40-72 hr, a 250 rpm, durante el período de fermentación, se tomaron muestras a diferentes períodos de tiempo 12, 24, 36, 40, 48 y 72 hr, para determinar la cinética de fermentación.

5.- PARAMETROS PARA DETERMINAR LA CINETICA DE FERMENTACION:

- a) Medición del pH
- b) Observación de cristales.- Para detectar la presencia de cristales durante el curso de la fermentación, se realizaron frotis, tomando una asada del cultivo cada 12 hr (posteriormente a las 24 hr)., para la observación se hizo una tinción al Gram.
- c) Consumo de azúcares.- De las muestras tomadas cada 12 hr (5 ml), se centrifuga a 3,000 rpm/15 min, en el sobrenadante se determinaron azúcares reductores por el método de 3, 5 DNS acid, se tomó la lectura a 540 nm (60).
- d) Cuenta de esporas viables.- De los extractos finales se tomaron 50 mg, los cuales se suspendieron en 50 ml de agua destilada estéril, se pasteurizó a 65°C, por 10 min; posteriormente se efectuaron diluciones de 1×10^{-1} a 1×10^{-7} , se tomaron 1 ml de cada dilución, se depositaron en una caja petri estéril, se adicionaron 15 ml aproximadamente de agar nutritivo (Merck), mezclar en forma de ocho, se solidifica e incuba a 37°C por 24 hr (20).

6.- EXTRACCION DEL COMPLEJO ESPORA CRISTAL:

Para obtener este complejo se utilizó el método de coprecipitación lactosa-acetona propuesto por Dulmage en 1970 (24). De los cultivos producidos en los diferentes medios de cultivo, se comprueba que el 80% de cristales son liberados (observación en fresco); se suspende la incubación, se mide el volumen final, se ajusta el pH a 7.0, se centrifuga a 5,000 rpm por 30 min a 4°C (Centrifuga refrigerada Beckman 52-21), el precipitado se resuspende en lactosa -

al 5%, utilizando un volúmen de 10:1, respecto al volúmen final de la fermentación, se agita por 30 min, se adiciona 5 vol. aproximadamente de acetona, respecto al volúmen de lactosa, se agita nuevamente por 30 min, se deja reposar por 15 min, se filtra con vacío sobre papel Wathman # 1, se deja reposar toda la noche, el residuo final se muele en mortero hasta obtener un polvo fino, se pesa y es utilizado para el bioensayo.

7.- BIOENSAYO:

Se realizó con larvas de mosquito del 4º estadio Aedes aegypti y Culex pipiens quinquefasciatus

- a) Los mosquitos se obtuvieron de la propagación de larvas, colectadas en la región de Nuevo León e identificadas de acuerdo al manual del Departamento de Educación y Salud de los Estados Unidos.
- b) Dieta para larvas.- Estas se colocan en un recipiente de 7.5 x 20" con una solución de agua destilada y agua de clorada (50%), se adicionó - 5,000 ppm de NaCl, las larvas se alimentaron con una mezcla de 50% de levadura en polvo y 50% de kroketas Apican, se coloca una larva por -- cm^2 de superficie del recipiente (34, 62).
- c) Infestación.- Las diluciones de los extractos y estándar IPS-82 son -- preparados con solución buffer (NaCl 0.85%, K_2HPO_4 0.6% KH_2PO_4 0.3%); para cada dilución se utilizan 25 larvas, en recipientes individuales se infestan con una larva de 4 días, de un peso 15-25 mg aproximadamente, si las muestras son difíciles de humectar, se agrega 25 ml de solución tween 80 al 1% para 10 ml de solución salina (24).
- d) Incubación.- Después de la infestación, los recipientes se incuban a - 30°C, con 50-60% de humedad relativa.
- e) Cuenta de mortalidad.- Se toman lecturas a 0.5, 1, 8, 12, 24, 48 y 72 hr, se observó durante 5 días, en caso dudoso de muerte de la larva, - se toca con la punta de una aguja, si hay respuesta, por débil que ésta sea se considera viva. Se calcula el porcentaje de mortalidad y la - potencia para cada extracto a prueba. (Resultados en Tablas 11-14). Esta determinación se llevó a cabo en el Departamento de Zoología de - Invertebrados. Laboratorio de Entomología. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

$$\text{Potencia de la Muestra (UI/mg)} = \frac{\text{LC}_{50} \text{ del std. } \times \text{Potencia del std. (UI / mg)}}{\text{LC}_{50} \text{ de la muestra}}$$

U.I = Unidades Internacionales

LC₅₀ = Dosis letal media

std. = Estándar

En la figura 1, se presenta un diagrama de flujo de los puntos 2-6 y en la figura 2 el punto 7.

Fig.1-FERMENTACION Y RECUPERACION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE Bacillus thuringiensis

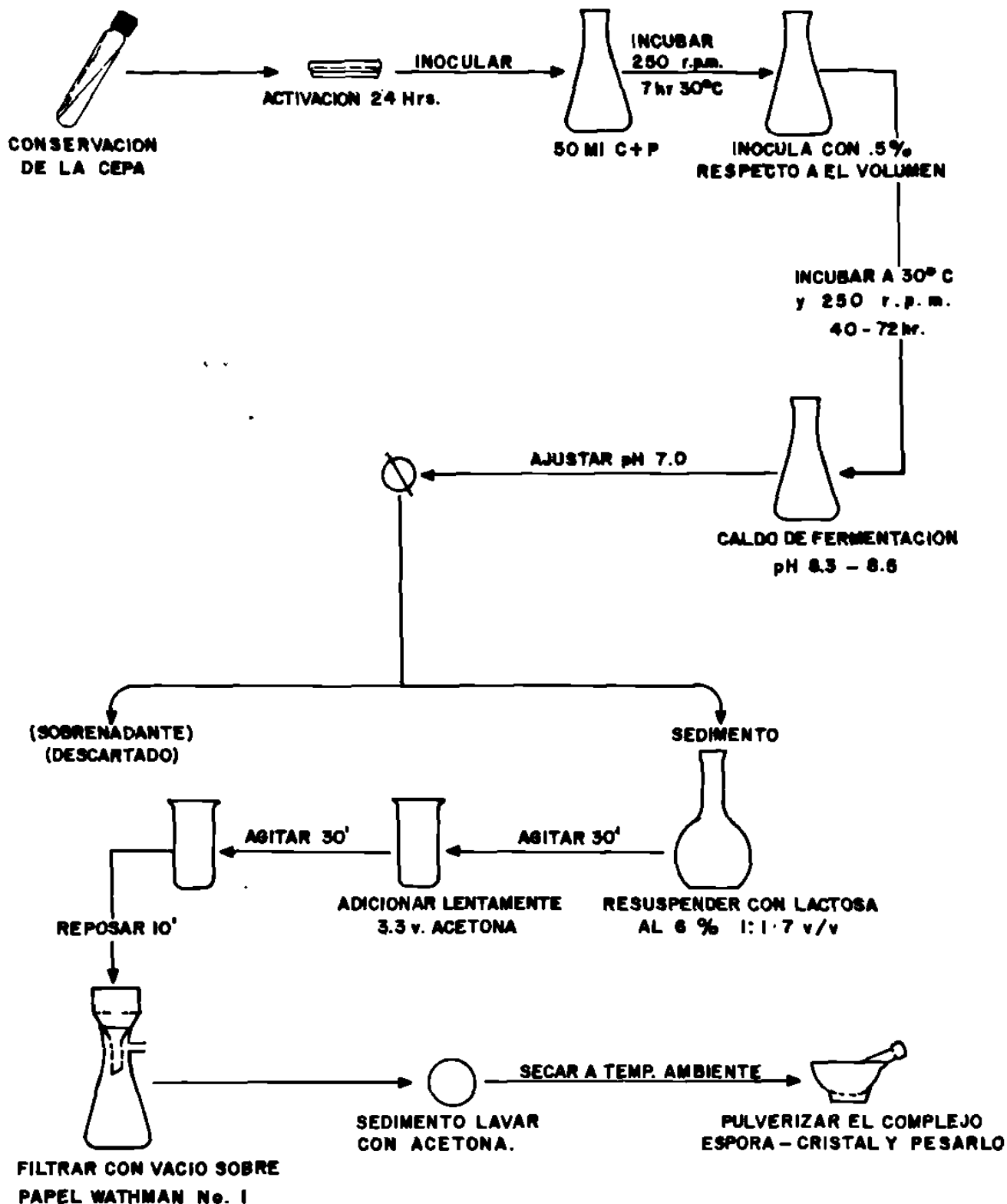
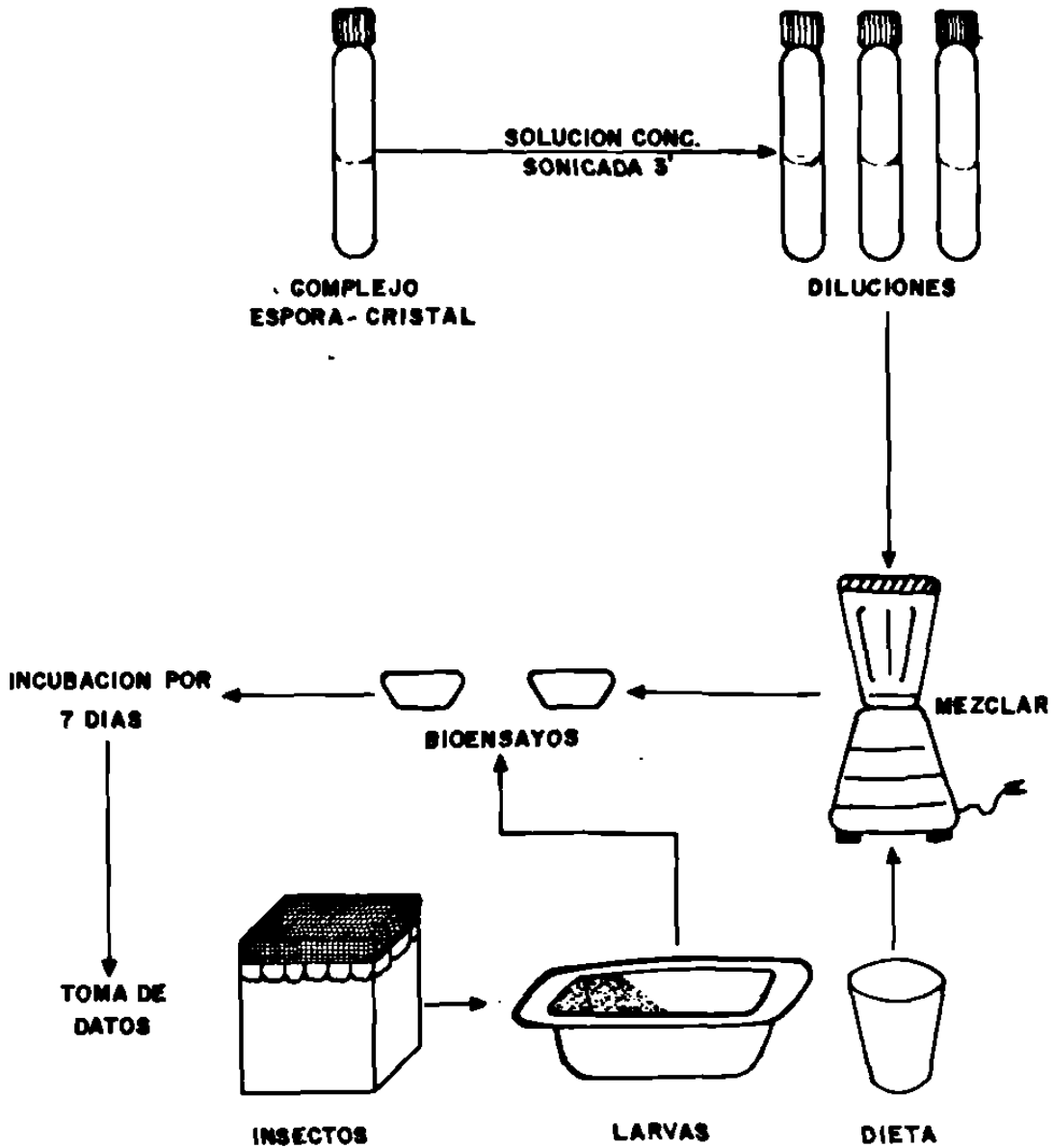


Fig 2.-BIOENSAYOS DE LOS EXTRACTOS DE Bacillus thuringiensis CON LARVAS DE MOSQUITOS.



R E S U L T A D O S

AISLAMIENTO:

Las cepas de Bacillus thuringiensis que se utilizaron tienen diferente -- procedencia; dos de las cuales provienen de Irapuato, Guanajuato, otra de Guadalupe Nuevo León y las tres restantes de Tapachula, Chiapas (Tabla 3). Estas cepas se aislaron de diferentes fuentes: GM-7, GM-18 y GM-20, a partir de muestras de suelo; GM-47, GM-48, GM-49 y GM-50 de larvas de mosquito muertas.

Las características generales de Bacillus thuringiensis, respecto a morfología, citología, colonia y metabolismo, son iguales para todas las cepas en estudio, excepto en tamaño, borde y suspensión de la colonia; el tamaño de la colonia para GM-7 y GM-18 es de 5-12 mm; para GM-20 es de 3-7 mm; para GM-47 y GM-50 es de 3-5 mm, y finalmente para GM-48 y GM-49 es de 2-3 mm; el borde de la colonia es crenado para todas las cepas a excepción de GM-20 que es ondulado; la suspensión de la colonia es difícil para todas las cepas además es granular para GM-20 (Tabla 2).

La clasificación serológica de las cepas en estudio se reporta en la Tabla 4; tres de ellas pertenecen a la variedad aizawai y serotipo 7.

Las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas, se muestran en la Tabla 5. Las cepas GM-7, GM-49 y GM-50 pertenecen a la misma variedad y serotipo; en ellas existe diferencia en sus pruebas bioquímicas: algunos azúcares son metabolizados solamente por alguna de las cepas, xilosa por GM-49; celobiosa por GM-50; sorbitol por GM-49; m-inusitol por GM-50; fructosa por GM-49 y en GM-7 no se determino; la caseína es desdoblada por todas las cepas, esta es mayor en GM-47 y GM-48; la arginina y salcina solo se determinó en GM-7, la cual es positiva; la esculina es desdoblada por todas las cepas, es mayor en GM-20, GM-7 y GM-50; la proteólisis se produce en todas las cepas, es mayor en GM-20, GM-47 y GM-48; treosa y maltosa son metabolizadas por todas las cepas, en GM-7 no se determinó; la amilasa es producida por todas las cepas, es mayor en GM-18, GM-20, GM-47 y GM-48, es media en GM-50 y menor en GM-7 y GM-49; la ornitina y quitina solo se determinó en GM-7, es positiva; la formación de película es positiva en todas las cepas excepto en GM-7; la lecitinasa es producida por todas las cepas excepto por GM-20; Voges Poskrawer es positiva para todas las cepas, excepto para GM-20. Las pruebas bioquímicas res

tantes son iguales en todas ellas.

CINETICA DE FERMENTACION:

En la producción de las cepas de Bacillus thuringiensis, se utilizaron once diferentes medios de cultivo, en los cuales se varió la fuente de carbono, nitrógeno y la adición de sales; para los medios I-VII se utilizó: melaza, harina de soya, líquido de remojo de maíz, agua de cocimiento de levadura y sales; para los medios VIII-XI se utilizó: glucosa, harina de soya, harina de maíz, extracto de levadura, agua de cocimiento de levadura y sales. La composición de estos medios se muestra en las Tablas 6 y 7.

De los 77 cultivos que se realizaron, se obtuvo el complejo espora-cristal de 29 de ellos, el resto se descartaron por no llegar a esta fase final. En la Tabla 8, muestra una relación de cepa, medio de cultivo y tiempo de fermentación de estos 29 cultivos; en 19 de ellos se utilizó melaza como fuente de carbono, el tiempo de fermentación es de 38-56 hr aproximadamente, excepto GM-50 requirió 72 hr en los medios I y XI.

El complejo espora-cristal se recuperó de todas las cepas de Bacillus thuringiensis, en alguno de los diferentes medios de fermentación a excepción de V y VIII.

MEDICION DE pH.

El pH de 7.0 permanece constante durante las primeras 12 hr, se incrementa ligeramente a 7.3-7.5 a las 24 hr, posteriormente sigue aumentando a 8.4 -- 8.5 a las 38-56 hr, dependiendo de la cepa y medio de cultivo; en este tiempo las cepas liberan un 80% aproximadamente de los cristales. El comportamiento en la variación de pH es muy similar para todos los medios. En la cepa GM-50 el tiempo de fermentación se prolongó a 72 hr en los medios I y XI. En la Tabla 9 y figuras 3 y 4 se presenta la variación de tiempo, pH y azúcares reductores, para las cepas GM-49 y GM-50 en los medios IV y II, respectivamente; estas cepas presentaron acción tóxica.

OBSERVACION DE CRISTALES:

De los cultivos se toman muestras a diferente tiempo, de las cuales se realizaron frotis, tiñéndolos al Gram; se observó: bacilos Gram (+), esporas

sin teñir, lo cual facilita la observación de los cristales, los primeros cristales se presentan a las 36 hr aproximadamente, para algunas cepas, continuando la fermentación hasta la liberación de 80% aproximadamente de los cristales a las 38-72 hr, dependiendo de la cepa y medio de cultivo.

CONSUMO DE AZUCARES:

La cuantificación de azúcares reductores se realizó en los medios IV y II, donde fueron producidas las cepas GM-49 y GM-50, respectivamente; en ellos se utilizó melaza como fuente de carbono; estas cepas fueron las que presentaron toxicidad. En la Tabla 9 se presenta la cuantificación de azúcares de estas cepas, y se esquematizan estos datos en las gráficas I y II. Para la cepa GM-49 el consumo de azúcares se incrementan respecto al tiempo, esto se observa de 0-24 hr, la concentración de azúcares, baja de 1.35 g/l a 1.05 g/l, después de este período el consumo es mínimo; en las 12 hr posteriores es de 0.02 g/l, -- después de este período los azúcares no son metabolizados, permanece constante la concentración hasta la fase final de la fermentación. En GM-50 el comportamiento es similar a esta cepa. (figura 3 y 4).

CUENTA DE ESPORAS VIABLES:

Esta se determinó en las cepas GM-49 y GM-50 en los medios IV y II, respectivamente; el número de esporas es de 2.5×10^6 para GM-49 y 2.8×10^6 para GM-50, que presenta mayor número.

BIOENSAYO:

Las larvas colectadas se propagan bajo las condiciones establecidas en la metodología, seleccionando larvas del 4º estadio de mosquitos Aedes aegypti -- y Culex pipiens quinquefasciatus para el bioensayo. El porcentaje de mortalidad en Aedes aegypti es de 60% y 90% con GM-49 y GM-50, en los medios IV y II respectivamente, a una concentración de 120 mg/l, a las 48 hr; para Culex pipiens quinquefasciatus es de 73% y 71% con GM-49 y GM-50 en los medios ya -- mencionados, a una concentración de 120 mg/l a las 48 hr (Tabla 12).

La concentración letal media (LC_{50}) de las cepas de Bacillus - - - - - thuringiensis para Aedes aegypti y Culex pipiens quinquefasciatus, se reportan en las tablas 13 y 14. La LC_{50} para Aedes aegypti es de 102.1 mg/l y 69.98 - - mg/l para GM-49 y GM-50 en los medios IV y II, respectivamente, a las 48 hr, y de 8.053×10^{-3} mg/l para el estándar IPS-82, a las 24 hr; para Culex pipiens

quinquefasciatus de 50.04 mg/l y 102.48 mg/l para GM-49 y GM-50, en los medios ya mencionados, a las 48 hr y de 1.508×10^{-2} mg/l para el estándar IPS-82, a las 24 hr.

DISCUSIONES:

Las cepas GM-7, GM-49 y GM-50 pertenecen a la misma variedad y serotipo, sin embargo hay variación en sus pruebas bioquímicas y toxicidad; la cepa GM-7 se aisló de suelo, no presenta toxicidad, las otras dos se aislaron de cadáveres de mosquito, y presentan toxicidad; la cepa GM-48 también fué aislada de cadáveres de mosquito; pertenece a otra variedad y serotipo, la cual no presenta toxicidad.

Las cepas en estudio presentan las características generales de Bacillus thuringiensis, con variación en las características de sus colonias; GM-20 presentó mas diferencias respecto a las demas cepas.

Las pruebas bioquímicas de las cepas de igual variedad y serotipo, difieren en el metabolismo de algunos carbohidratos, como: xilosa, celobiosa, sorbitol, m-inositol y fructosa; presentaron diferencia en las cantidades producidas por algunas enzimas para las diferentes cepas; todas las cepas presentaron película a excepción de GM-7

La producción del complejo espora-cristal característico de Bacillus thuringiensis, se logró en todos los cultivos, excepto en los medios V y VII, estos carecían de harina de soya y/o agua de cocimiento de levadura, en VIII además CaCO_3 ; a las 72 hr de fermentación, se obtuvo un bacilo delgado sin esporular, ni formación de cristal, descartando los cultivos de estos medios, por no lograr la producción del complejo espora-cristal.

La cepa GM-20 utilizó favorablemente 8 de los 11 medios de cultivo; con ciclos de 38 hr, las otras cepas requirieron de 40-72 hr; los medios I, V y VIII no se logró llegar a la fase final; en los medios I y III de igual composición, además CaCO_3 en el último; en el medio I no se completo el ciclo, a diferencia del medio III, si se concluye su ciclo. En el medio II carece de CaCO_3 , y se logró obtener el complejo espora cristal; este medio contiene agua de cocimiento de levadura, probablemente en su composición contenga presentes

estos iones, concluyendo su ciclo metabólico; en el medio V carece de harina de soya y agua de cocimiento de levadura (autolizada) y no se obtuvo el complejo espora-cristal (11). El medio VIII contiene harina de maíz, carece de harina de soya, agua de cocimiento de levadura y CaCO_3 , en este no concluyó su ciclo metabólico del bacilo (48)., la harina de maíz, no se puede considerar que satisfaga sus requerimientos nutricionales, porque este medio carece de CaCO_3 y se observó que en medios de igual composición con ausencia de CaCO_3 no hubo desarrollo y en el medio que lo contenía se desarrolló; en el medio X, contiene harina de maíz, harina de soya, extracto de levadura y CaCO_3 , se obtuvo el complejo espora-cristal, en este a diferencia del VIII se adicionó harina de soya, CaCO_3 y otras sales.

El medio XI carece de glucosa y/o melaza, pero contiene harina de soya, -- agua de cocimiento de levadura y CaCO_3 , recuperando el complejo espora-cristal, en ausencia de una fuente directa de carbono (48). En medios que se adicionaron otras sales, no se observó diferencia respecto a los que carecían de ellas, debido a que se utilizaron constituyentes complejos, como: harina de soya, melaza, agua de cocimiento de levadura y otros, las contienen como constituyentes; en los medios que contienen glucosa y melaza como fuentes de carbono, además de otros complementos nutricionales, estas cumplen con las necesidades nutricionales (2, 48), aunque desde el punto de vista económico, es más conveniente utilizar melaza por su menor costo. Los medios de cultivo que presentaron toxicidad son II y IV, cuya composición es: melaza, harina de soya, agua de cocimiento de levadura, además CaCO_3 en el IV, con GM-50 y GM-49, respectivamente. El medio de cultivo debe brindar los requerimientos nutricionales del bacilo, además es de vital importancia que presenten toxicidad los complejos recuperados de estos medios (62) .

La variación del pH es similar en todos los medios sin importar la fuente de carbono o nitrógeno que se disponga; en la fase final de la fermentación se tuvo precaución en el control de pH, si la fermentación se prolonga para lograr mayor liberación de cristales, y el pH se incrementa por arriba de 8.5, los cristales son solubilizados en este medio alcalino, descartando estos cultivos, pues la acción tóxica se basa precisamente en la presencia de estos cristales.

El consumo de azúcares se lleva a cabo las primeras 24 hr, donde toma la -

proporción necesaria para completar su ciclo metabólico; las cepas utilizan favorablemente la glucosa y melaza como fuente de carbono; las cepas que presentaron toxicidad fueron producidas en un medio con melaza.

La cuenta de esporas viables en GM-50-II es mayor 3×10^5 esporas/ml respecto a GM-49-IV; el extracto de GM-50-II de mayor cuenta viable, presenta mayor porcentaje de mortalidad con LC_{50} menor contra Aedes aegypti que GM-49-IV; este mismo extracto con Culex pipiens presenta menor porcentaje de mortalidad con LC_{50} mayores que GM-49-IV, con menor número de esporas.

El bioensayo es la culminación de este estudio, proporcionando el fallo o aceptación para que una cepa de Bacillus thuringiensis sea utilizada como agente entomopatógeno.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo se concluyó lo siguiente:

- 1.- La toxicidad de las cepas de Bacillus thuringiensis, no depende de la fuente donde es aislada, ni de la variedad, se requiere hacer una subclasificación más de acuerdo a su toxicidad.
- 2.- Los medios V y VIII (Tablas 6y7), no proporcionan los requerimientos nutricionales para el cultivo de Bacillus thuringiensis.
- 3.- Se requiere la presencia de carbonato de calcio para el desarrollo óptimo de Bacillus thuringiensis.
- 4.- Los medios que carecen de harina de soya y agua de cocimiento de levadura no satisfacen las necesidades nutricionales de Bacillus thuringiensis.
- 5.- La harina de maíz no satisface las necesidades nutricionales del cultivo de Bacillus thuringiensis, pero el medio carece de CaCO_3 y en otros medios con igual composición ausentes de este no hubo desarrollo.
- 6.- La harina de soya y, el agua de cocimiento de levadura proporcionan los requerimientos nutricionales de Bacillus thuringiensis.
- 7.- El medio II y IV proporcionan las necesidades nutricionales de Bacillus thuringiensis y provocan toxicidad.
- 8.- Extractos de Bacillus thuringiensis con una LC_{50} determinada sobre una especie, cambia la toxicidad al variar la especie.

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

- 1.- Se sugiere hacer una clasificación de Bacillus thuringiensis, respecto a su toxicidad.
- 2.- Continuar estos ensayos, donde se utilicen otros nutrientes, factor que contribuye a determinar la toxicidad de Bacillus thuringiensis.
- 3.- Aislar y probar otras cepas de Bacillus thuringiensis contra larvas de mosquitos culícidos, estos presentan un problema para los habitantes, - en donde tienen la capacidad de desarrollarse.
- 4.- Realizar pruebas de campo, para determinar la efectividad de los extractos de Bacillus thuringiensis, en el hábitat del mosquito.

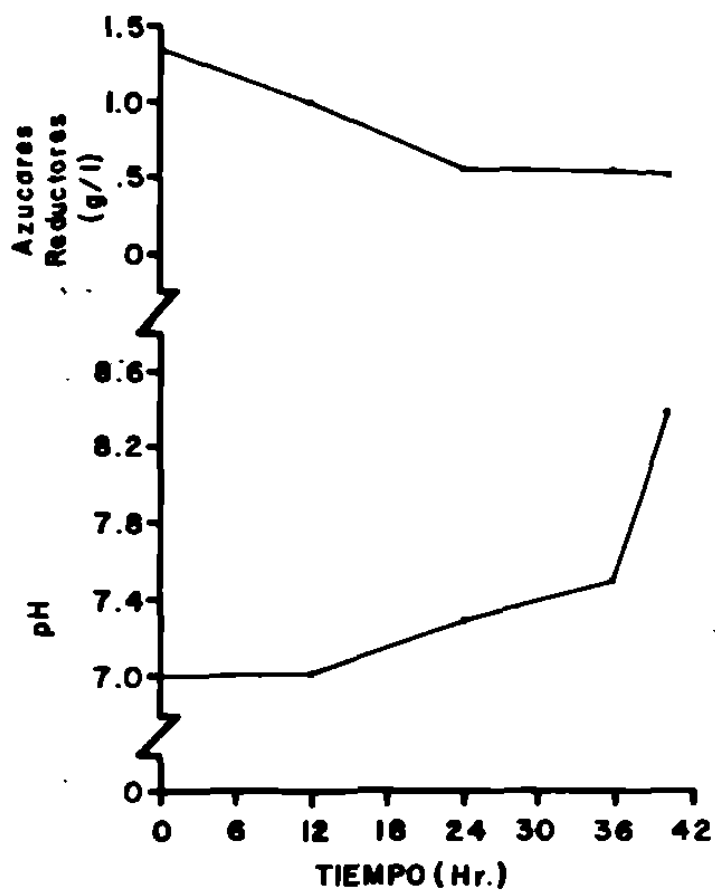


Fig. 3.- CINÉTICA DE FERMENTACION DE Bacillus thuringiensis
GM - 49 - IV.

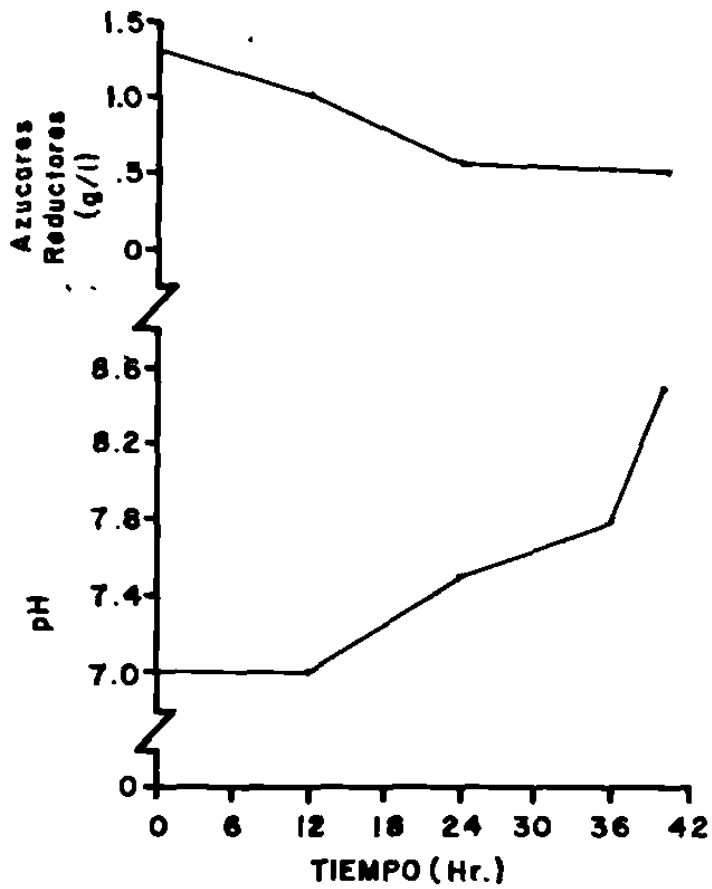


Fig. 4.- CINÉTICA DE FERMENTACION DE Bacillus thuringiensis
GM - 50 - II .

TABLA # 1

INGREDIENTES EN MEDIOS USADOS EN EL ESTUDIO
DE Bacillus thuringiensis var. israelensis, cantidades en g/l (60).

INGREDIENTES	M E D I O					
	1	2	3	4	5	6
Glucosa	10.0	10.0	10.0		15.0	10.0
Ac. casamino			10.0			
Harina de soya		18.0				5.0
Harina de maíz		5.0				
Caldo nutritivo			8.0			
Proflo					10.0	
Extracto de levadura	2.0				2.0	1.0
Bacto peptona					2.0	
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	2.0					
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.5			5.0		
$\text{K}_2 \text{HPO}_4$		0.7		5.0		2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.3		0.05	0.3	0.3
MnSO_4	0.05					
CaCl_2	0.08			0.05		
CaCO_3		0.5			1.0	0.3
FeSO_4		0.01		0.01		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$					0.02	
ZnSO_4		0.01				
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$					0.02	
Citrato de sodio				3.0		
Fosfato amino de sodio				1.5		
Hidroclorhidrotiamina				0.0002		

TABLA # 2

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CEPAS UTILIZADAS
DE Bacillus thuringiensis*

MORFOLOGIA	
Forma	Bacilo
Agrupamiento	Cadena
CITOLOGIA	
Tinción	Gram +
Movilidad	Positiva
Espora	Sub-terminal
Células	Unicelular
COLONIA	
Medio	Agar nutritivo
Temperatura	30°C
Tamaño	3-5 mm (7-12 mm)
Forma	Circular
Elevación	Aplanada
Borde	Crenado (ondulada)
Color	Crema
Pigmento	Sin pigmento
Capacidad	Opaca
Suspensión	Difficil (granular)
METABOLISMO	
Aereación	Aeróbico
Temp. crecimiento	27-37°C
Temp. óptima	30°C
Rango pH	6.5 - 8.0
pH óptimo	7.0

La variación del patrón general, se indica entre paréntesis.

TABLA # 3

PROCEDENCIA DE LAS CEPAS UTILIZADAS DE
Bacillus thuringiensis

CEPA	PROCEDENCIA
GM-7	Irapuato, Gto.
GM-18	Irapuato, Gto.
GM-20	Guadalupe, N.L.
GM-47	Tapachula, Chis.
GM-48	Reg. Soconusco
GM-49	Tapachula, Chis.
GM-50	Tapachula, Chis.

TABLA # 4

CLASIFICACION SEROLOGICA PARA LAS SIGUIENTES
CEPAS DE Bacillus thuringiensis.

CEPA	VARIEDAD	SEROTIPO
GM-7	<u>aizawai</u>	7
GM-18	<u>neoleonensis</u>	*
GM-20	<u>ostrinae</u>	8 A - 8 C
GM-47	<u>tolwoethi</u>	9
GM-48	<u>tohokuensis</u>	16
GM-49	<u>aizawai</u>	7
GM-50	<u>aizawai</u>	7

* Nueva variedad y serotipo

Reporte en trámite identificado en el Laboratorio de Inmunología, Depto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

TABLA # 5

PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS PARA LA IDENTIFICACION
DE LAS CEPAS DE Bacillus thuringiensis.

CEPAS	GM-7	GM-18	GM-20	GM-47
Glucosa		+	-	+
Manosa	-	-	+	-
Sacarosa	-	+	-	+
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	+
Galactosa		-	+	-
Lactosa		-	-	-
Rafinosa		-	-	-
Adonitol		-	-	-
Manitol	-	-	-	-
Dulcitol		-	-	-
Sorbitol		-	-	-
M-inucitol		-	-	-
Fructosa		+	-	-
Caseína		++	++	+++
Arginina	+	nd	nd	nd
Salicina	+	nd	nd	nd
Esculina	+	+	++	++
Proteolisis	+	+	++	++
7% NaCl		-	-	-
KCN Muller		nd	nd	nd
Ribosa		nd	nd	nd
Treosa		+	+	+
Maltosa		+	+	+
Almidón	+	+++	+++	+++
Catalasa	+	+	+	+
Indol		nd	nd	nd
Lisina		-	-	-
Ornitina	+	nd	nd	nd
Fenil alanina		-	-	-

CONTINUA TABLA # 5

CEPAS	GM-7	GM-18	GM-20	GM-47
Quitina	+	nd	nd	nd
Urea	+	-	-	-
Película	-	+	+	+
Lecitina	+	+	-	+
M.R.	+	+	+	+
V.P.	+	+	-	+

nd = no determinado

TABLA # 5

PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS PARA LA IDENTIFICACION
DE LAS CEPAS DE Bacillus thuringiensis.

CEPAS	GM-48	GM-49	GM-50
Glucosa	+	+	+
Manosa	-	-	-
Sacarosa	+	-	-
Arabinosa	-	-	-
Xilosa	-	+	-
Celobiosa	+	-	+
Galactosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Rafinosa	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Manitol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Sorbitol	-	+	-
M-inucitol	-	-	+
Fructosa	+	+	-
Caseina	+++	++	++
Arginina	nd	nd	nd
Salicina	nd	nd	nd
Esculina	+	++	++
Proteolisis	++	+	+
7% NaCl	-	-	-
KCN Muller	nd	nd	nd
Ribosa	nd	nd	nd
Treosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Almidón	+++	+	++
Catalasa	+	+	+
Indol	nd	nd	nd
Lisina	-	-	-
Ornitina	nd	nd	nd
Fenil alanina	-	-	-

CONTINUA TABLA # 5

CEPAS	GM-48	GM-49	GM-50
Quitina	nd	nd	nd
Urea	-	+	+
Película	+	+	+
Lecitina	+	+	+
M.R.	+	+	+
V.P.	+	+	+

nd = no determinado

TABLA # 6

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZANDO MELAZA COMO FUENTE DE
CARBONO PROBADAS CON LAS CEPAS DE Bacillus thuringiensis, cantidades en g/100 ml.

	M E D I O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Melaza	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
H. de soya	1.0	1.0	1.0	1.0			1.0
L.R.M.	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0
A.C.L.	-	3.0	-	3.0	-	3.0	-
CaCO ₃	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	0.2
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	-	0.05
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0.02
MnSO ₄	-	-	-	-	-	-	0.05
CaCl ₂	-	-	-	-	-	-	0.008
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	-	0.2
H ₂ O dest./100 ml.	-	-	-	-	-	-	-

L.R.M. = (líquido de remojo de maíz)

A.C.L. = (Agua de cocimiento de levadura)

TABLA # 7

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO PRBADOS CON LAS
CEPAS DE Bacillus thuringiensis, cantidades en g/100 ml.

	M VIII	E IX	D X	O XI
Glucosa	1.0	1.0	1.0	-
H. de soya	-	1.8	0.5	1.0
H. de maiz	0.2	-	0.1	-
E.L.	0.2	-	0.1	-
A.C.L.*	-	-	-	3.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	-	-
KH_2PO_4	0.05	-	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.03	0.03	0.02
MnSO_4	0.05	-	-	-
CaCl_2	0.008	-	-	-
K_2HPO_4	-	0.07	0.2	-
CaCO_3	-	0.05	0.03	0.1
FeSO_4	-	0.001	-	-
ZnSO_4	-	0.001	-	-
FeSO_4	0.02	-	-	-
H_2O dest./100 ml.	-	-	-	-

A.C.L.* Agua de cocimiento de levadura

E.L. Extracto de levadura

TABLA # 8

MEDIO DE CULTIVO Y TIEMPO DE FERMENTACION UTILIZADOS PARA LAS
CEPAS DE Bacillus thuringiensis.

CEPA	MEDIO	TIEMPO (hr)
GM-7	X, XI	48
GM-18	I, II, IV, IX, XI	56
GM-20	II, III, IV, VI, VII, IX, X, XI.	38
GM-47	I, III, VI	48
GM-48	II, IV, VIII, IX	42
GM-49	II, IV	40
GM-50	I, XI	72

TABLA # 9

CINETICA DE FERMENTACION DE Bacillus thuringiensis.

GM-49-IV

Tiempo	pH	Azúcares Reductores g/l
0	7.0	1.35
12	7.0	1.05
24	7.3	0.56
36	7.5	0.53
40	8.4	0.53

GM-50-II

Tiempo	pH	Azúcares Reductores g/l
0	7.0	1.34
12	7.0	1.01
24	7.5	0.55
36	7.8	0.53
40	8.5	0.53

II y IV medio de cultivo

TABLA # 10

RELACION DE CEPA, MEDIO DE CULTIVO, VOLUMEN FINAL, PESO EXTRACTO Y
CUENTA VIABLE DE FERMENTACIONES DE Bacillus thuringiensis

CEPA	MEDIO CULTIVO	VOLUMEN FINAL (ml)	PESO FINAL EXTRACTO (g)	CUENTA VIABLE ESPORAS/ml	
GM-7	X	87.70	0.40	—	
	XI	87.90	0.55	—	
GM-18	I	89.2	0.60	—	
	II	86.64	0.71	—	
	IX	88.04	0.92	—	
	XI	85.90	0.96	—	
GM-20	II	89.15	1.10	—	
	III	88.43	1.12	—	
	IV	87.25	1.09	—	
	VI	85.10	1.10	—	
	VII	87.20	0.95	—	
	IX	86.10	0.90	—	
	X	85.15	0.71	—	
	XI	84.10	0.73	—	
	GM-47	I	79.80	0.97	—
		III	81.12	0.95	—
		VI	82.00	0.82	—
GM-49	II	85.40	0.90	—	
	IV	84.90	0.95	2.5×10^6	
	VIII	86.90	0.80	—	
	IX	86.87	0.9	—	
GM-50	I	81.63	1.10	—	
	II	82.50	1.01	2.8×10^6	
	IV	81.70	0.90	—	
	XI	82.0	0.89	—	

TABLA # 11

PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN Aedes aegypti CON
Bacillus thuringiensis.

GM-49-IV

D O S I S mg/l.	M O R T A L I D A D	
	24 hr	48 hr
20	6	18
40	11	24
60	17	36
80	26	44
100	34	52
120	40	60

GM-50-II

D O S I S mg/l.	M O R T A L I D A D	
	24 hr	48 hr
20	18	39
40	32	58
60	41	70
80	48	81
100	62	85
120	74	90

II y IV medio de fermentación

TABLA # 12

PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN Culex pipiens quinquefasciatus
 CON Bacillus thuringiensis.

GM-49-IV

D O S I S mg/l	M O R T A L I D A D	
	24 hr	48 hr
20	18	31
40	23	41
60	28	47
80	36	52
100	46	64
120	52	73

GM-50-II

D O S I S mg/l	M O R T A L I D A D	
	24 hr	48 hr
20	8	16
40	15	20
60	23	22
80	28	39
100	37	53
120	43	71

II y IV Medio de fermentación

TABLA # 13

CONCENTRACION LETAL MEDIA (LC_{50}) DE Bacillus thuringiensis

PARA Aedes aegypti.

C E P A	LC_{50} en mg/l	
	24 hr	48 hr.
GM-49-IV	246.8	102.1
GM-50-II	88.46	69.98
IPS-82	8.059×10^{-3}	

TABLA # 14

CONCENTRACION LETAL MEDIA (LC_{50}) DE Bacillus thuringiensis

PARA Culex pipiens quinquefasciatus.

C E P A	LC_{50} en mg/l	
	24 hr	48 hr.
GM-49-IV	181.24	50.04
GM-50-II	225.43	102.48
IPS-82	1.5084×10^{-2}	

II y IV medio de fermentación

LITERATURA CITADA

- 1.- Angus, T.A. 1962. The biochemistry and mode of action of Bacillus thuringiensis. Berliner and its variants contribution No. 37 Departament of Forestry, Insect. Pathology Research Institute Ontario Canada. Coll - Int Pathol. Insects Paris 165-173.
- 2.- Arakawa, Hall, H.T. Dulmage & J.L. Correa, 1977. The pathogenicity of - - - strains of Bacillus thuringiensis to larval of Aedes and to Culex mosquitoes. Mosquito News 37 (2) 246-251.
- 3.- Beegle C.C., 1979. Use of entomogenous bacteria in agroecosystems. Development in industrial microbiology 20: 97-104.
- 4.- Bechtel D.B. & L.A. Jr. Bulla, 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis. Journal of Bacteriology 127 (3) 1472-1481.
- 5.- Bonnefi, A. & H. Barjac, 1963. Classification des souches du groupe - - - Bacillus thuringiensis par la détermination de L'antigène flagellaire.- Entomophaga 8 (33): 223-229.
- 6.- Burges H.D, 1969. Control of insects by Bacillus thuringiensis. Proc. 5th. By insectic fungic cont. 405-411.
- 7.- Burges P.D., 1964. Control of insect with bacteria. Repinted from worded - - crops, sept. 1964. Grampion Press led the to wer 229-243.
- 8.- Bernhard Hertlein, J. Hornby, R. Levy & W. Miller, 1980. Evolution of mosquito control. Proceedings of Florida Anti-mosquito. Association, 59-67.
- 9.- Clovard J.J., 1978. El comportamiento alimenticio de los mosquitos. Investigación y Ciencia (Prensa Científica, S.A., Barcelona, España.) 23: - - 86-93.
- 10- Cooksey, K.E., 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis -- Biochemistry and mode of action H.D. Burges and N.W. Hussey (eds). Microbial control of insects mites. Academic Press.
- 11- Couch T.L. & D.A. Ross, 1980. Production and utilization immunological homology between crystal and spore protein of Bacillus thuringiensis. Journal Bacteriology 96: (3) 713-720.
- 12- Couch T.L. & D.A. Ross, 1980. Production and utilization of Bacillus thuringiensis. Biotechnology and Bioengineering 22: 1297-1304.
- 13- Cheung P. & D.C. Hammack Bruce, 1985. Micro-lipid-droplet. encapsulation of Bacillus thuringiensis subsp israelensis δ -endotoxin for control of mosquito larvae. Applied and Environmental Microbiology oct. 1985. 984-988.

- 14- De Barjac H., & Bonnefoi, 1973. Mise au point sur la classification des - - Bacillus thuringiensis. Entomophaga 18: 15-17.
- 15- De Lucca Anthony, J. Simonson & A.D. Larson, 1981. Bacillus thuringiensis - distributions in soils of the United States. Canadian Journal Microbiology 27: 865-870.
- 16- Dubois N.R., 1968. Laboratory batch production of Bacillus thuringiensis -- spores and crystals. Applied Microbiology 16: (7) 1098-1099.
- 17- Dulmage H.T. & K. Aizawa, 1982. Distribution of Bacillus thuringiensis in - nature microbial and viral pesticides. Edvard Kurstak (ed) Marcel Dekker Inc. New York and Basel 209-236.
- 18- Dulmage H.T., 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of - - - Bacillus thuringiensis serotype 3 in 3 fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 18: 355-358.
- 19- Dulmage H.T., O. Boening, C. Rihnborg & G. Dansen, 1971. A proposed standardized bioassay for formulation of Bacillus thuringiensis based on the -- international unit. Journal of Invertebrate Pathology 18: 240-245.
- 20- Dulmage H.T., 1970. Production of the spore δ -endotoxin complex by variants of Bacillus thuringiensis in two fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 16: 385-389.
- 21-- Dulmage H.T., 1970. Insecticides activity of HD-1 a new isolate of - - - -- Bacillus thuringiensis var alesti. Journal of Invertebrate Pathology 15: 232-239.
- 22- Dulmage H.T., 1973. Assay standard report on the adoption of a primary U.S. reference standard for assay of formulation containing the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. Bulletin of the Entomology Society of America 19: (4) 200-202.
- 23- Dulmage H.T., C.C. Beegle; H. de Barjac; D. Reich; G. Donaldson & J. Krywinczy, 1982. Bacillus thuringiensis culture available from the U.S. -- Department of Agriculture U.S. Agricultural Reviews and Manuals. ISSN - 1-42.
- 24- Dulmage H.T., J.A. Correa; A.J. Martínez, 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of Bacillus - - -- thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology 15: 15-20.
- 25- Dulmage H.T., O.P. Boening; C.S. Rehnberg & G.D. Hunsen, 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of Bacillus thuringiensis based on the international unit. Journal Invertebrate Pathology 18: 240-245.
- 26- Faust, R.M. & L.A. Bulla, 1982. Bacteria and their toxins as insecticides.- Microbial and Viral Pesticides. Edvard Kurstak (ed) Marcel Dekker, Inc. New York Basel. 3: 75-206.

- 27- Goldberg I., B. Sneh; E. Battat & D. Klein, 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 Bois. Biotechnology Letters 2 (10) 419-426.
- 28- Hannay C.L. & J.P. Fitz, 1955. The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner. Canadian Journal of Microbiology 1: 694-710.
- 29- Hannay C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature 127-1004.
- 30- Hannay C.L., 1956. Inclusions in bacteria. Symposium Society General of Microbiology. Science Service Laboratory Department. of Agriculture, Ontario Canada. 6: 318-340.
- 31- Heimpel A.M. & T.A. Angus, 1963. Diseases caused by certain spore-forming bacteria in Steinhaus, E.A. (ed) Insect Pathology an Advanced Treatise, New, York. 2: 21-73.
- 32- Hornby J, C. Hertlein, R. Levy & W. Miller, 1981. Persistent. Activity of mosquito larvicidal Bacillus sphaericus 1593. In fresh water and sewage wared health, Organization, Mundiale de la Sante.
- 33- Hunter III G.W., 1973. Manual de Medicina Tropical 3a. ed. Prensa Médica - Mexicana 857-865.
- 34- Harvey W. & M.G. Wolfersherger, 1979. Mechanism of inhibition of active potassium transport in isolated midgut of Manduca sexta by Bacillus thuringiensis endotoxin. f. exp. biol. 83: 293-304.
- 35- Ignoffo C.M., T.L. Couch, C. García, M.J. Kroha, 1981. Relative activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis against larvae of Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus, Trichopthesis sp, Heliothis zea and Heliothis virescens J. Econ. Entomol. 74: 218-222.
- 36- James M.T. & R.F. Hardwood, 1969. Herms's medical Entomology 6th ed. - - - MacMillan Publishing Co. 167-222.
- 37- Klawden Marc J. G. Held & L. Bulla, 1983. Toxicity of Bacillus thuringiensis subsp israelensis T. to adult Aedes aegypti mosquitoes. - Applied and Environmental Microbiology Aug. 1983 46: (2) 312-315.
- 38- Krieg A., 1980. The Prokaryotes Springer Verlag 2: 1743-1755.
- 39- Krieg A., 1965. Bioassay and Standarization of Bacillus thuringiensis - - - preparations spore endotoxin-complex Entomophaga 10 (2): 49-54.
- 40- Luthy P., 1980. insecticides toxins of Bacillus thuringiensis. Federation of European Microbiological Societies (FEEMS) Microbiology Letters 8: 1-7.

- 41- Luthy P.E., H.R. Bersold, 1981. The entomocidal toxin of Bacillus thuringiensis pharmac. Ther Pergamon Press Great Britain 13: 257-283.
- 42- Maldonado, M.G., 1981. Producción de Bioinsecticidas de Bacillus thuringiensis GM-1 utilizando tres diferentes medios de cultivo. F.C.B UA.N.L. Monterrey, N.L.
- 43- Mikkola A.R., G.A. Carlberg, T. Vaara & H.G. Gyllen Berg, 1982. Comparison of inclusion in different Bacillus thuringiensis strains. An electron microscope study (FFMS). Microbiology Letters 13: 401-408.
- 44- Mulla A, & A. Brion, 1985. Sporulation and toxin production by Bacillus thuringiensis var. israelensis in cadavers of mosquito larvae (Diptera Culicidae). Journal of Invertebrate Pathology 46: 251-258.
- 45- Nickerson N.W., 1980. Structure and function of the Bacillus thuringiensis protein crystal. Biotechnology and Bioengineering 22: 1303-1333.
- 46- Norris J.R., 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis -- Biosynthesis and physical structure. In microbial control of insects and mites H.D. Burgess y N.W. Hussey, ed. Academic Press New York. 229-246.
- 47- Norris J.R., 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis -- Biosynthesis and physical structure in micro control of insects and mites H.D. Burgess and N.W. Hussey (eds). A.P. London 229-246.
- 48- Ohba M., K. Aizawa & T. Furuzawa, 1979. Distribution of Bacillus thuringiensis serotypes in Ehime prefecture. Japan Applied Entomology zool 14: (3) 340-345.
- 49- Ohba M. Onok, K. Aizawa & S. Iwanami, 1981. Two New Subspecies of Bacillus thuringiensis subsp. tochigiensis (serotype 9). Journal of Invertebrate Pathology 39: 184-190.
- 50- Ohba M., & K. Aizawa, 1978. Serological identification of Bacillus thuringiensis and related bacteria isolated in Japan. Journal of Invertebrate Pathology 32: 303-309.
- 51- Pendleton I.R., 1969. Insecticides of crystal forming bacteria process -- Biochemistry 29-32.
- 52- Pendleton I.R., & R.B. Morrison, 1966. Separation of spores and crystals of Bacillus thuringiensis. Nature 212: 728-729.
- 53- Prasad. SSSV & Y. J. Shethna, 1976. Biochemistry and Biological activities of the protein acidus crystal of Bacillus thuringiensis J. Scient. Ind. Res. 35: 626-632.
- 54- Roa C.D. & Y.J. Shethna, 1980. A simple technique for purification of the parasporal crystal (δ -endotoxin) of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. J. Indian Inst. Sci. 62: 1-II.

- 55- Salama H.S., M.S. Foda, H.T. DuImage & A. el Sharaby, 1981. Novel fermentation media for production of δ -endotoxins from Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology in Print 1-26.
- 56- Salen S.M., R.F. Harris & O.N. Allen, 1969. Method for determining Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. Berliner in soil Canadian Journal of Microbiology 15: 1101-1104.
- 57- Samples & Buettner, 1983. Reported stain of Bacillus thuringiensis isolated from a corneal ulcer of patient at the Mayo clinic A.T. C.C. New letter 4: (1). Publishing in (J. Infect dis. 148: 614, 1983).
- 58- Sharpe, E.S., K.W. Nickerson, L.A. Bulla & J.N. Aronson, 1975. Separation of spores and parasporal crystal of Bacillus thuringiensis in gradient of certain x Ray contrasting agents Applied Microbiology 30: (6) - 1052-1053.
- 59- Scherrer P, P. Luthy & B. Trumpf, 1973. Production of δ -endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose Applied Microbiology - apr. 1973, 644-646.
- 60- Summer J.B., 1924. Method 3,5 DNS acid Journal of Biology Chemistry 62: - 287.
- 61- Smirnoff W.A. MacLeod, 1961. Study of the survival of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. Berliner in the digestive tracts and in feces of a small mammal and birds Journal of Insect Pathology 3: -- 266-270.
- 62- Smith R, 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by Bacillus thuringiensis var. israelensis Can. J. Microbiol 28: 1089-1092.
- 63- Steinhaus E.A., 1976. Bacillus thuringiensis. Berliner insect Microbiology, New, York 91-93.
- 64- Tyrell D.J., L.J. Davison, L.A. Bulla & W.A. Ramoska, 1979. Toxicity of parasporal crystal of Bacillus thuringiensis subs. israelensis to mosquitoes Appl. Environ. Microbiol. 38: (4) 656-658.
- 65- WHO, 1980. Mosquito control activities of other organization Calif. Agricul 34: (3) 41-42.
- 66- Wakisaka Y., E. Masaki, K. Koizumi, Y. Nishimota, Y. Endo, M.S. Nishimura & J. Uwo Nishutsutsuji, 1982. Asporogenous Bacillus thuringiensis mutants producing high yields of δ -endotoxin. Applied and Environmental Microbiology. 43: (6) 1498-1500.

