

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

División de Estudios Superiores



*Evaluación de la Persistencia de la Toxicidad de
Extractos de Fermentación de
Bacillus thuringiensis Almacenados por Largos
Períodos Contra Trichoplusia ni*

TESIS

*Presentada como Requisito Parcial para
obtener el grado de:*

MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad en:

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Por:

ING. HELIODORO O. DE LA GARZA TOLEDO

Monterrey, N. L.

Enero de 1992

TM

SB975

G3

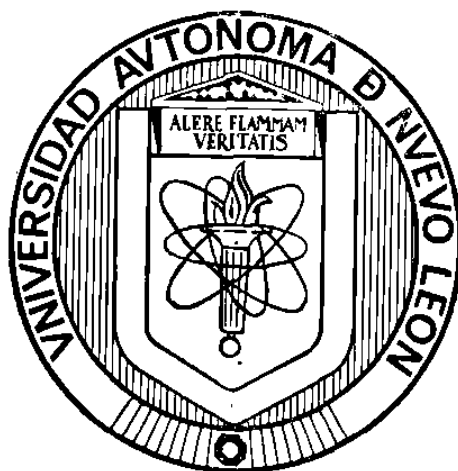
c.1



1080074977

**BIBLIOTECA, DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
División de Estudios Superiores



*Evaluación de la Persistencia de la Toxicidad de
Extractos de Fermentación de
Bacillus thuringiensis Almacenados por Largos
Períodos Contra Trichoplusia ni*

TESIS

*Presentada como Requisito Parcial para
obtener el grado de:*

MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad en:

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Por:

ING. HELIODORO O. DE LA GARZA TOLEDO

Monterrey, N. L.

Enero de 1992

TM
SB 995
T 3



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

DR. ERARDO ELIZONDO VILLARREAL
COORDINADOR DE LA ESCUELA
DE GRADUADOS EN CIENCIAS
P R E S E N T E .

Mediante este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis elaborada por el Sr. HELIODORO O. DE LA GARZA TOLEDO, titulada:

EVALUACION DE PERSISTENCIA DE LA TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE FERMENTACION DE Bacillus thuringiensis ALMACENADOS POR LARGOS PERIODOS CONTRA Trichoplusia ni.

ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS, ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

en virtud de haber cumplido íntegramente con el reglamento de tesis vigente.

A t e n t a m e n t e ,

El Comité Dictaminador:



MC. LUIS J. GALAN WONG
ASESOR



MC. SERGIO S. FERNANDEZ D.
SINODAL

Vo.Bo.



MC. BLANCA RODRIGUEZ U.
SINODAL



QFB. MARTHA SUAREZ H.
COORD. DE LA MAESTRIA

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

A mi asesor el M.C. Luis J. Galán W., por su apoyo y entusiasmo, que fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Al Ing. Víctor H. Castro Tavares y sus asistentes, por su ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

A la QFB. Sachiko Leo Wong, por su valiosa participación en los bioensayos.

A todas aquellas personas que desinteresadamente contribuyeron en esta tesis.

D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES:

HELIODORO DE LA GARZA CEPEDA

JULIETA TOLEDO ROJAS

A MI ESPOSA:

CAROLINA CAMPOS MENDEZ

A MIS HIJOS:

CARLOS ALBERTO

LUIS ARTURO

OBJETIVO GENERAL:

EVALUACION DE PERSISTENCIA DE LA TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE FERMENTACION DE Bacillus thuringiensis ALMACENADOS POR LARGOS PERIODOS CONTRA Trichoplusia ni.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1º DETERMINAR LA TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE FERMENTACION DE CEPAS DE Bacillus thuringiensis ALMACENADOS POR MAS DE 10 AÑOS.
- 2º SELECCIONAR CEPAS DE Bacillus thuringiensis EN BASE AL CRITERIO DE LA PERMANENCIA DE SU TOXICIDAD CONTRA Thrichoplusia ni EN LA FORMA DE EXTRACTOS DE FERMENTACION RECUPERADOS Y ALMACENADOS POR LARGO TIEMPO.

HIPOTESIS:

SUPONEMOS QUE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE FERMENTACION DE LOS Bacillus thuringiensis PERMANECEN AUN DESPUES DE LARGOS PERIODOS DE ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE.

RELACION DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.

UANL = Universidad Autónoma de Nuevo León

FCB = Facultad de Ciencias Biológicas

T. ni = Trichoplusia ni

Var. = Variedad

B.t. = Bacillus thuringiensis

I.C. of I.P. and M.C.= Coloquio Internacional de
Patología de Invertebrados y
Control Biológico.

Ext.= Extracto.

Conc.= Concentración.

HD = Clave inicial para definir formulaciones de
extractos de fermentación. Ejem. HD-73

ug = Microgramos.

KDa = Kilodalton.

ml = Mililitro.

DL₅₀ = Dosis letal media.

Vs. = Contra.

U.I. = Unidades Internacionales.

mg. = Miligramos.

S.C. = Suma de cuadrados.

G.L. = Grados de libertad.

C.M. = Cuadrado medio.

F = Factor de tabla.

F.C. = Factor calculado.

NS. = No significativo.

* = Significativo.

F.V. = Fuente de variación.

E.E. = Error experimental.

INDICE

	página.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
1.1.- Antecedentes	3
1.2.- Historia del B.t.	5
1.3.- Clasificación de los B.t.	7
1.4.- Los cristales de B.t.	10
1.5.- Mecanismos de acción de - la s-endotoxina.	12
1.6.- Medios de fermentación.	14
1.7.- Los extractos de fermen-- tación.	15
1.8.- Estandarización de bioin-- secticidas.	17
1.9.- El T.ni.	18
MATERIALES Y METODOS	20
2.1.- Selección de los ext.	20
2.2.- Bioensayos.	22
2.3.- Cuantificación de esporas viables.	23
2.4.- Observación de los cris-- tales al microscopio.	24
2.5.- Evaluación de los resul-- tados.	24
2.5.1.- Determinación del por-- ciento de mortalidad.	24
2.5.2.- Diseño estadístico.	24
2.5.3.- Determinación de la DL ₅₀ y potencia.	26
RESULTADOS	28
CONCLUSION Y DISCUSION	57
LITERATURA CONSULTADA	61
APENDICE	66

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA No. 1.- Clasificación de Serovariedades de B.t.	9
TABLA No. 2.- Relación de extractos de fermentación de B.t. analizados y años de producción.	21
TABLA No. 3.- Análisis de varianza de la relación extractos-concentraciones.	34
TABLA No. 4.- Análisis de Varianza para un Diseño de Bloques al Azar.	34
TABLA No. 5.- Prueba de Duncan para análisis de extractos del diseño de Bloques - al Azar.	35
TABLA No. 6.- Prueba de Duncan para análisis de concentraciones del diseño de Bloques al Azar.	36
TABLA No. 7.- Análisis de Varianza del Diseño - de Bloques al Azar, de extractos-Vs. concentraciones seleccionados.	36
TABLA No. 8.- Conclusiones de la Prueba de Duncan para extractos.	37
TABLA No. 9.- Conclusiones de la Prueba de Duncan para concentraciones.	37
TABLA No.10.- Conclusión final del análisis estadístico de mortalidad de Ext-Conc	37
TABLA No.11.- Porciento de mortalidad promedio de los Ext. más potentes.	38
TABLA No.12.- Porciento de mortalidad de tres Ext. en bioensayos de 25 repeticiones.	38
TABLA No.13.- Porcentaje de mortalidad promedio de los extractos de fermentación de B.t.	39
TABLA No.14.- Concentración de datos estadísticos para calcular la DL ₅₀	40

TABLA No.15.- Comparación de valores de DL ₅₀ de diferentes extractos.	41
TABLA No.16.- Comparación de las Dosis Letal Media de los extractos más activos.	42
TABLA No.17.- Valores de la Potencia de los Ext.	43
TABLA No.18.- Potencia de extractos superiores a 1,000 UI/mg.	44
TABLA No.19.- Potencia de extractos superiores a 10,000 UI/mg.	44
TABLA No.20.- Relación de Potencias y valores de Dosis Letal Media.	45
TABLA No.21.- Potencias de extractos en diferentes años de Producción.	46
TABLAS No.22-39.- Valores promedios de porcentos de mortalidad de los Ext.	68-76
TABLA No.40.- Concentración de datos de la interacción Ext-Conc.	77
TABLA No.41,41a,41b.- Cálculos para Prueba de Duncan para Ext.	78-82
TABLA No.42,42a,42b.- Cálculos para Prueba de Duncan de Conc.	83-84
TABLA No.43.- Cuadro de concentración de datos de Ext-Conc. seleccionados.	84
TABLA No.44,44a,44b.- Cálculos de la Prueba de Duncan para Ext. seleccionados.. . . .	85-86
TABLA No.45,45a,45b.- Cálculos de la Prueba de Duncan para Conc.	86-87
TABLA No.46.- Porciento de mortalidad de los estándares.	87
TABLA No.47.- Ejemplo de cálculo de valores de DL ₅₀	88

INDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS

	página
FORMULA 1.- Preparación de Dieta para las Larvas de T. ni.	66
GRAFICA 1.- Potencias de Ext. de fermentación.	51
GRAFICA 2.- Potencias de extractos de B.t. con - valores superiores a las 1,000 UI/mg	52
GRAFICA 3.- Potencias de extractos de B.t. con - valores superiores a las 10,000 UI/mg.	53
GRAFICA 4.- Valores promedios de DL ₅₀ (ppm) de - los extractos de B.t. var. kurstaki contra T.ni.	54
GRAFICA 5.- Valores promedios de DL ₅₀ de los - extractos más activos contra T.ni.	55
GRAFICA 6, 6a.- Efecto de la concentración (ppm) de los extractos seleccionados - contra T.ni.	56-57

RESUMEN

El contar en la FCB de la UANL, con una colección de extractos de fermentación de cepas de B.t almacenados por largos periodos, nos permitió conocer y determinar la toxicidad de los mismos, contra larvas neonatas de T.ni. En base a la importancia que tiene el B.t. var. kurstaki serotipo 3a 3b por su potencial bioinsecticida, se le seleccionó para determinar la toxicidad de las cepas de B.t. en forma de extractos fermentados y secados que fueron almacenados durante años a temperatura ambiente, por medios de bioensayos contra el gusano falso medidor (T. ni.) usando como referencia el estandar internacional B.t. s-endotoxina HD-1980. Por un muestreo al azar se escogieron 16 extractos de la var. kurstaki, correspondientes a diferentes años de fermentación; así como otros dos de la var. gallieriae (para que sirviera de modelo de comparación). Se realizaron un total de 18 bioensayos para probar la toxicidad de los extractos usando 7 diferentes concentraciones de cada uno de los mismos (1,10,25,50,100,250 y 500 ug./ml. de dieta) contra las larvas neonatas de T.ni. En cada uno de los bioensayos se utilizaron 7 concentraciones diferentes del extracto de referencia (1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ug./ml. de dieta) y un testigo que contenía solamente el alimento. Cada bioensayo se repitió 3 veces usando 10 larvas para cada concentración. Para cada uno de los casos se determinó el porcentaje de mortalidad promedio y posteriormente por un

análisis Probit, la Dosis Letal Media (ug. de extractos/ ml. de dieta) y la potencia tóxica (U.I./mg.). Los resultados obtenidos mostraron que la actividad insecticida de los extractos de B.t. varió ampliamente de una cepa a otra aunque pertenecieran a la misma variedad, así mismo cepas iguales fermentadas en diferentes medios durante distintos años presentaron toxicidades significativamente diferentes. Sin embargo 5 extractos pertenecientes a las cepas HD-1, HD-183, HD-187 y HD-203 de la var. kurstaki y un extracto de la cepa HD-184 de la var. gallieriae presentaron altos grados de mortalidad semejante unos a otros a concentraciones de 250 y 500 ppm. La persistencia de la toxicidad de estos extractos nos permitirá en un futuro seleccionar y recuperar cepas de B.t. altamente potentes en base a que mantienen su toxicidad al ser almacenados en forma natural como un criterio adicional para la elección de una cepa que pueda ser usada en un proceso de producción de bioinsecticidas.

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

I.-INTRODUCCION

I.1- Antecedentes.

El hombre a luchado contra las plagas desde los inicios de la civilización. Al empezar a cultivar la tierra, sus cosechas fueron constantemente mermadas por la presencia de innumerables plagas que consumían, destruían o competían en los cultivos con pérdidas en los productos agrícolas.

De todas las plagas cabe destacar a los insectos, debido a su agresividad, su inmensa variedad de especies, su facilidad para crear resistencia a los compuestos químicos aplicados en su contra (1), a la gran cantidad de cosechas que afectan y las enormes pérdidas económicas que ocasionan.

Por lo tanto es de esperarse que la mayor cantidad y variedad de plaguicidas que se han usado sea precisamente en contra de los insectos.(1)

Las primeras referencias del empleo de insecticidas son de hace cerca de 3,000 años cuando los griegos, chinos y romanos empezaron a usar compuestos inorgánicos tales como el Arsénico para tratar de combatir algunas plagas de insectos (1), sin embargo el desarrollo de los insecticidas fue lento debido principalmente a la falta de conocimientos, métodos de investigación sistemáticos, equipos y técnicas adecuadas, aunado a la prevalecencia de sociedades determinadas en gran medida por la superstición y la magia. Sin embargo fue hasta el siglo XIX cuando se inició formalmente el empleo de las sustancias químicas en el control de los insectos.

Durante la primera parte del siglo XX se incrementó el uso de los insecticidas, incorporándose nuevos compuestos como el Flúor y productos botánicos, desde 1920 surgió la preocupación sobre los residuos ocasionados por el empleo cada vez mayor de los plaguicidas.

En 1939 se dió a conocer un descubrimiento que revolucionó el desarrollo de los insecticidas, en ese año se descubrió el valor insecticida del DDT y su aplicación durante la Segunda Guerra Mundial demostró el potencial que tenían los compuestos orgánicos como armas para el control de plagas.(2)

Desde entonces y para el mismo fin se han producido miles de sustancias químicas orgánicas principalmente de las familias de los organoclorados, los organofosforados, los carbámicos, los nitrofenoles y últimamente los piretroides (2).

Sin embargo con el paso del tiempo se acumularon pruebas de los daños que se ocasionan por el uso masivo e irracional de estos plaguicidas, hoy en la actualidad se consideran como sus principales defectos los siguientes:

- Su alta residualidad en el medio ambiente.
- Su potencial mutagénico capaz de crear resistencia en las especies atacadas.
- Su alta toxicidad a humanos y mamíferos en general.
- Su amplio rango de acción que ocasiona la destrucción de plagas y de especies no dañinas y necesarias para mantener el equilibrio ecológico.

La constante investigación del ser humano ha conducido a la obtención de nuevos productos que han disminuido estos efectos; tal como los piretroides o bien el de buscar otras opciones que sean más compatibles con la naturaleza como es el Control Biológico. Dentro de esta nueva rama de la Ciencia que implica el uso de seres vivos o sus productos en el control de plagas, se incluye el uso de compuestos producidos por microorganismos que sean capaces de dañar a los insectos (1).

Actualmente se concen cerca de 2,000 especies y variedades de bacterias, virus, hongos, protozoarios y nemátodos que presentan patogenicidad contra insectos (3).

De todos ellos, el desarrollo más significativo ha ocurrido con la bacteria Bacillus thuringiensis principalmente por su acción reconocida contra Lepidópteros, Dípteros y recientemente contra Coleòpteros (3).

1.2- Historia del Bacillus thuringiensis.

Bacillus thuringiensis se ha estudiado intensamente en las últimas tres décadas debido a sus características para el control de insectos.

El estudio de este microorganismo se inició con el aislamiento de una bacteria en larvas enfermas del gusano de seda (Bombix mori) efectuado por el japonés Ishiwata en 1905; al cual denominó Bacillus sotto, sin embargo la

identificación no fue completa; y fue en 1911 en Alemania donde Berliner aisló esta bacteria de la palomilla del Mediterráneo (Angasta kuehniella), propone posteriormente el nombre de Bacillus thuringiensis con el que hasta hoy se le conoce. Berliner y Mattes en estudios y épocas separadas observaron que las células de estas bacterias contenían además de la espora oval, un segundo cuerpo que Berliner llamó "Restekörper" o cuerpo de desecho, muchos años después (1953) el canadiense Hannay utilizando un microscopio electrónico confirmó las observaciones anteriores y encontró unos cuerpos paraesporales en forma de diamantes que llamó cristales.

Este mismo investigador propuso que los cristales, al encontrarse en el intestino de las larvas de Lepidópteros, estaban relacionados con la formación de una sustancia tóxica que inducía la aparición de septicemia en estas larvas. (4)

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se caracteriza por su habilidad natural para producir cuerpos paraesporales en forma de cristales y de poder matar insectos especialmente durante su vida larvaria (5).

La tendencia más moderna para la aplicación de esta bacteria es la de utilizar la Ingeniería Genética por medio de la cual se pueden introducir genes bacterianos en otros microorganismos y en las plantas, donde se expresan produciendo las proteínas tóxicas de los B.t. (6,7). A pesar de que el B.t. ha sido utilizada desde hace más de 20 años en la lucha biológica, se desconoce la aparición de

resistencia por parte de los insectos perjudicados, salvo en el caso de una utilización intensiva, como en los silos. (8)

A pesar de que desde 1960 se ha impulsado lo que Rachel Carson tituló "La otra vía" en su libro La Primavera Silenciosa, que consiste en aplicar un enfoque biológico básicamente no químico para controlar los insectos perjudiciales (7), no es posible que los plaguicidas biológicos puedan reemplazar de manera significativa a los plaguicidas químicos en los próximos 10 años. Sin embargo a mediano plazo, la importancia de los bioplaguicidas será cada vez más importante. (8)

1.3- Clasificación de los Bacillus thuringiensis.

Los bacilos esporulados se dividen en dos grupos según su relación con el oxígeno atmosférico: El género Bacillus que incluye las formas aerobias y el género Clostridium que agrupa a las anaerobias.

Según la nueva clasificación en el manual de Bergey para determinar bacterias existen 22 especies de Bacillus perfectamente bien definidas.

La mayor parte de las especies de Bacillus son formas saprófitas del suelo y algunas de ellas suelen ser patógenas para los insectos por lo que se ha desarrollado un creciente interés para usarlos en el control de plagas. (9).

De los Bacillus que presentan mayor actividad

insecticida contra Lepidópteros se encuentra el Bacillus thuringiensis la cual presenta propiedades adecuadas para utilizarse como un producto comercial, motivo por el cual es el que más se ha estudiado y el que más se ha aplicado sobre los cultivos en los últimos 20 años.

Las diferencias mostradas por los B.t. en cuanto a la capacidad para destruir sólo ciertas larvas de insectos implicó la necesidad de crear un método de clasificación capaz de agrupar a todas las variedades de esta bacteria.

Para lograr esta clasificación se han utilizado diversos métodos basados en sus propiedades morfológicas, bioquímicas y filogenéticas, sin embargo actualmente la manera más sencilla y específica de clasificar a estas bacterias es la serotipificación, la cual se basa en la especificidad y estabilidad del antígeno H y se complementa en función de su patogenicidad ante un tipo de insecto determinado y en pruebas bioquímicas y genéticas (10).

En la tabla No. 1 se muestran las 27 variedades y sus subgrupos aceptadas hasta 1990 de B.t. así como su serotipo correspondiente.

Sin embargo se siguen descubriendo nuevas cepas de B.t. tal como la NRD-12 que presenta más toxicidad que la cepa HD-1 (11).

Tabla No. 1.- Clasificación de Serovariedades de B. thuringiensis

Antígeno H	Serovariedad
1	thuringiensis
2	finitimus
3a	alesti
3a 3b	kurstaki
4a 4b	sotto
4a 4c	kenyae
5a 5b	galleriae
5a 5c	canadensis
6	entomocidus
7	aizawai
8a 8b	morrisoni
8a 8c	ostrinae
8a 8d	nigeriensis
9	tolworthi
10	darmstadiensis
11a 11b	toumanoffi
11a 11c	kyushuensis
12	thompsoni
13	pakistani
14	israelensis
15	dakota
16	indiana
17	tohokuensis
18	kumamotoensis
19	tochigiensis
20a 20b	yunnanensis
20a 20c	pondicheriensis
21	colmeri
22	shandogiensis
23	japonesis
24	neoleonensis
25	coreanensis
26	siloensis
27	mexicanensis

ref: De Barjac H and E. Frachon. 1990 (10).

1.4.- Los Cristales de Bacillus thuringiensis.

Durante la esporulación de algunas de estas bacterias se produce una inclusión en forma de cristal compuesta de proteínas tóxicas llamadas s-endotoxina, la cual actúa en el intestino de las larvas que la han ingerido (12).

Los genes de B.t. para formar las principales proteínas con propiedades insecticidas se han clonado y secuenciado conociéndose la relación de nucleótidos de muchos de ellos. Hofte y Whiteley (1989) identificaron 14 distintas clases de genes que codifican para la s-endotoxina; 13 de estos genes fueron llamados "Cry" (codificantes de proteínas de 65 a 130 KDa), la secuencia de aminoácidos en éstos mostraron un considerable grado de homogeneidad a pesar de que sus proteínas presentan diferente grado de toxicidad contra diferentes órdenes de insectos. El catorceavo tipo de gene es diferente a los genes "Cry" y tiene un rango de toxicidad más amplio contra insectos y se le ha llamado "Cyt" (Cristal Proteico Citolítico) de 27 KDa. Sin embargo, ambos tipos de toxinas presentan características en común: las dos son tóxicas solamente a un pequeño rango de larvas de insectos vivos. Requieren de pH alto para su solubilidad y de proteólisis para su activación y actúan por un mecanismo citolítico de lisis de las membranas celulares. (13,18)

Los genes "Cry" son los más comunes que presentan las diferentes variedades de B.t. pero cada tipo de gene participa en la especificidad de la protoxina del cristal

para actuar contra ciertos tipos de insectos; por ejemplo: las protoxinas "Cry" II A, son activas sobre algunos Lepidópteros y Dípteros, mientras que la protoxina "Cry" III A, es activa solamente sobre algunos Coleópteros y la protoxina IV es activa contra otros tipos de Dípteros (16).

Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que existan otras formas proteicas tóxicas para otros insectos, tal como informa Visser (1990) del descubrimiento de una nueva protoxina llamada "Cry" IE (15,16).

De las variedades de B.t. que más se han estudiado destaca la kurstaki, dentro de estas las cepas HD-1 y HD-73 son particularmente activas contra larvas de Lepidópteros. En los cristales producidos por esta variedad, han sido identificados tres genes llamados "Cry" IA (a), "Cry" IA (b) y "Cry" IA (c) que codifican para la producción de las proteínas tóxicas (17).

Los cristales presentan algunas características semejantes entre las que destacan:

- Ser considerablemente hidrofóbicos y altamente insolubles a pH neutro.
- Ser relativamente resistentes a la proteólisis de la mayoría de las proteasas.
- Tener una relación alta de Arginina/Lisina.
- No presentar Cistina a pesar de que su contenido de Cisteína es relativamente alto.

Además de la estructura primaria del cristal (la proteína de 130 KDa), se conocen algunas estructuras secundarias, tal como reporta Choma (1990), quien en base a

análisis por espectroscopía de Raman, Infrarroja y de Dicroismo Circular, encontró la presencia de cadenas tipo α -helicoidal (33-40%) y formas planas tipo β (32-40%) y que ambas se encuentran fuertemente plegadas al formar la proteína del cristal. (19,27).

Hoy en día es bien conocido que el cristal llamado también s-Endotoxina es el responsable de la actividad tóxica de los B.t., aunque existen otros tipos de toxinas como las α y β exotoxinas, que actúan sobre diferentes variedades de insectos. (20)

Las s-endotoxinas presentan algunas características comunes tales como:

- Ser un veneno estomacal (tiene que ser ingerido para matar).
- Ser muy específicos actuando principalmente contra Lepidópteros, aunque en algunos casos han mostrado actividad tóxica contra Dípteros y en otros casos contra Larvas de Coleópteros.

1.5.- Mecanismo de Acción Tóxica de la s-Endotoxina.

La acción tóxica de los cristales es compleja y presenta cuando menos dos etapas diferentes: primero actúan como una neurotoxina, ya que al estar los cristales en el intestino del insecto se produce una parálisis, posteriormente actúan como protoxinas al convertirse por

medio de enzimas intestinales del tipo de la tripsina en pequeños polipéptidos tóxicos de un peso molecular promedio de 60 KDa, los cuales originan cambios patológicos en el insecto, apareciendo también una toxemia general (21, 22, 24). Aparentemente, un fragmento de la molécula pasa a través de la pared del intestino a la linfa y origina una serie de acciones secundarias.

Estudios más recientes han mostrado que la toxina tiene que unirse a un receptor de la superficie de las células (puede ser una glucoproteína para las toxinas "Cry" o un fosfolípido insaturado en el caso de las toxinas "CyT"), posteriormente las moléculas de la toxina se insertan dentro de la membrana y forman un poro permeable a los iones y a moléculas pequeñas. Esto conduce a un incremento en el intercambio osmótico y a una subsiguiente Lisis. (23)

Para poder manifestarse el efecto tóxico, la protoxina debe hidrolizarse para formar fracciones de polipéptidos, los cuales son resistentes a posteriores ataques de la tripsina y de otras enzimas proteolíticas. (25)

Hoy se conoce que el modo de acción de las s-endotoxinas es citolítico, la membrana celular es el sitio de la interacción con la toxina responsable de la actividad larvicida, principalmente en los bordes de unas vesículas del intestino medio de la larva (26).

Por otra parte la especificidad de la toxina con respecto a un determinado tipo de insecto depende de la forma del cristal producido, del peso molecular (KDa) de las proteínas que lo forman (27) y también del tamaño de los

polipéptidos que se producen durante la hidrólisis parcial de las proteínas (28). Hofte (1989) señala que la protoxina puede ser activada produciéndose una sustancia tóxica contra Dípteros o Lepidópteros, lo anterior depende del tipo y origen de la enzima proteolítica y por lo tanto, de la fracción polipéptida que se forme. (18)

1.6.- Medios de Fermentación

En base a los estudios del metabolismo de los B.t. se han propuesto diferentes medios de cultivo que permitieran no solamente un crecimiento adecuado del microorganismo sino también una buena producción del complejo espóra-s-endo-toxina.

Dulmage (1970) encontró que la actividad tóxica de esta bacteria no estaba determinada por la capacidad de crecimiento del microorganismo así como tampoco por su formación de esporas sino que dependía principalmente de la cepa o variedad utilizada así como también del medio de cultivo en el que se desarrollara. Por ejemplo: propuso el siguiente medio de cultivo para el B.t. HD-1 Var. kurstaki, con el objeto de producir altos niveles de cristales es decir la s-endotoxina:

	(g/l)
sacarosa -----	5.0
extracto de lev.-----	2.0
K ₂ HPO ₄ -----	1.0

Golderg y Col (1980) optimizaron un medio para la producción del complejo espora-toxina a escala piloto utilizando:

	(g/)
glucosa -----	30.0
peptona de soya -----	20.0
extracto de lev. -----	4.5
liq. remojo de maíz -----	5.0
sales minerales -----	11.5

Con una aereación de 0.3 VVM, una agitación de 120 a 160 RPM Y UN PH de 6.2 a 7.4 (4).

Castro (1982) demostró que se podía incrementar la producción del complejo cuando se agregaba CaCO_3 al medio de cultivo como amortiguador de PH y fuente de calcio (4).

1.7.- Los Extractos de Fermentación.

Uno de los pasos más importantes en la producción de bioinsecticidas es la recuperación del complejo espora-cristal.

El primer método utilizado fue la liofilización, pero los resultados no fueron satisfactorios y era demasiado caro (4); después se utilizaron métodos químicos que precipitaran las proteínas, usando acetona, pero se obtenían productos apelmazados y de baja solubilidad, posteriormente se introdujo el uso de la lactosa con lo que se mejoraron

las características de los extractos (4).

Este método consiste en concentrar el medio ya fermentado, suspenderlo en soluciones de lactosa y precipitar con acetona la mezcla de lactosa-complejo proteínico y finalmente someterlo a un proceso de secado (4).

En la actualidad el método más común es el de una concentración mecánica, (centrifugación) seguida de un secado por aspersion, obteniéndose un producto de buena calidad, más soluble y de baja cantidad de humedad. Este polvo seco contiene células muertas, esporas y cristales y se le conoce como extracto de fermentación el cual ha demostrado ser el medio más eficaz para utilizarse en la elaboración de insecticidas derivados de B.t.

La capacidad tóxica de estos bioinsecticidas se expresa como porcentaje de mortalidad o bien cuando se utiliza un estandar en los bioensayos se representa como potencia en U.I./mg.(4) Durante años se han obtenido extractos de diferentes cepas de B.t. fermentadas en diversas condiciones pero no se había evaluado la persistencia de su toxicidad después de varios años de almacenamiento.

El poder contar con la colección de extractos de fermentación de B.t. de la F.C.B. nos permitirá evaluar su toxicidad después de haber estado almacenados por más de 10 años y seleccionar los que presenten mejores características.

La última etapa del proceso es la formulación del producto, la cual se ha diversificado en la actualidad gracias al uso de aditivos químicos que dan nuevas

propiedades a los productos terminados, tales como dispersantes, surfactantes, humectantes, etc., con el objetivo final de optimizar las propiedades físicas y lograr una mejor estabilidad, o en algunos casos aumentar la potencia contra determinada plaga. (30)

En un futuro cercano aparecerán en el mercado nuevas formulaciones de mezclas de diferentes cultivos. También se prevee un gran impulso al tener disponible nuevas variedades de esta bacteria apoyados en una buena manipulación genética, lo cual finalmente permitirá producir generaciones nuevas de bioplagicidas (11).

1.8.- Estandarización de Bioinsecticidas.

Debido a que las preparaciones comerciales presentaban variaciones en su actividad insecticida se tuvieron que establecer estándares primarios a partir de fermentaciones de cepas de B.t. de reconocida capacidad insecticida. Así en 1972 se aceptó la primera referencia primaria llamada HD-1 -1971, la cual estaba formada por un extracto de fermentación de la cepa B.t. HD-1 Var. kurstaki y a la que se le asignó una potencia de 18,000 UI/mg (21).

También se propuso que para medir la capacidad insecticida de los extractos de fermentación se debería hacer por medio de bioensayos, en los que pudieran aplicarse concentraciones diferentes del extracto contra larvas de

algún insecto de prueba, (T. ni, Heliottis virescens) y relacionar los resultados contra un estandar primario (32).

1.9.- El Trichoplusia ni

Este insecto pertenece a la familia de los Lepidópteros phalaenidae y al igual que muchas otras especies que la forman son de gran importancia agrícola ya que atacan una amplia variedad de cereales y cultivos hortícolas cuyas larvas son por lo general comedoras de hojas o taladradores de raíces (33).

T. ni es también llamado geómetra de la col o falso medidor y se alimenta principalmente de crucíferas (col, nabo, lechuga, etc.) (34). Y es ampliamente utilizada en los estudios de B.t. por la susceptibilidad de algunas larvas a los cristales proteicos producidos por el bacilo, los cuales están asociados al pH del intestino medio de la larva. Un pH alcalino de 9 a 10.5 es el que facilita más la acción de la s-endotoxina.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

MATERIALES Y METODOS

2.1- Selección de Extractos de Fermentación de Bacillus thuringiensis.

De la colección de extractos de fermentación del Departamento de Microbiología Industrial y de Suelos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, se seleccionaron al azar, 16 muestras de extractos correspondientes a las cepas:

HD - 1

HD - 73

HD - 183

HD - 187

HD - 203

Catorce pertenecientes a la variedad *kurstaki* y dos muestras de extractos a la variedad *galleriae* cepa HD-184.

Las cepas seleccionadas habían sido previamente fermentadas en diferentes años y en diferentes condiciones a nivel de fermentadores de 14 litros de capacidad. Los extractos seleccionados y agrupados por cepas están señalados en la tabla No. 2.

Tabla No. 2._ Relación de Los Extractos de Fermentación
 Seleccionados de Bacillus thuringiensis
 y Años de Producción.

Clave Interna	Extracto	año de producción	Variedad	Serotipo
1036	HD-1	1968	Kurstaki	3a 3b
508	HD-1	1972	Kurstaki	3a 3b
837	HD-1	1976	Kurstaki	3a 3b
183	HD-73	1971	Kurstaki	3a 3b
471	HD-73	1972	Kurstaki	3a 3b
658	HD-73	1973	Kurstaki	3a 3b
928	HD-73	1975	Kurtaki	3a 3b
12	HD-183	1971	Kurstaki	3a 3b
705	HD-183	1972	Kurstaki	3a 3b
906	HD-183	1975	Kurstaki	3a 3b
540	HD-187	1972	Kurstaki	3a 3b
1033	HD-187	1972	Kurstaki	3a 3b
661	HD-187	1973	Kurstaki	3a 3b
63	HD-203	1970	Kurstaki	3a 3b
310	HD-203	1974	Kurstaki	3a 3b
820	HD-203	1976	Kurstaki	3a 3b
13	HD-184	1971	Galleriae	5a 5b
819	HD-184	1976	Galleriae	5a 5b

2.2.- Bioensayos.

Se diseñó un bioensayo para medir la toxicidad de los extractos de fermentación de B.t. (32,33,34,35) contra larvas de T.ni. el cual consistió en lo siguiente:

Del insectario del Laboratorio de Microbiología Industrial y de Suelos de la FCB de la UNAL se obtuvieron larvas de T.ni. de un día de nacidas que habían sido reproducidas en condiciones controladas de especie, humedad, temperatura, alimentación etc. Las larvas neonatas se colocaron en copas de plástico que contenían una mezcla sólida del alimento especial para larvas de Lepidópteros y diferentes concentraciones de los extractos de fermentación. Fórmula No. 1 del apéndice.

Cada extracto de fermentación se suspendió en agua destilada y de él se prepararon 7 diluciones que mezcladas con la dieta originó otras diferentes concentraciones que fueron las de: 1,10,25,100,250 y 500 ug/ ml de dieta respectivamente para cada dilución.

Las diferentes concentraciones de las mezclas de extractos con el alimento fueron puestas en copas (10 copas por concentración utilizada) las cuales una vez solidificadas recibieron larvas de T. ni. (una en cada copa). Las copas se taparon con tapas de cartón y se almacenaron por 7 días; al término de los cuales se contaron (para todas las concentraciones) el número de larvas que

murieron y se expresaron como porciento de mortalidad.

Todos los bioensayos fueron hechos por triplicado en diferentes días, por lo que al final se usó una población de un total de 30 larvas para cada concentración.

Para los extractos que mostraron mayor porciento de mortalidad se volvió a efectuar otros bioensayos utilizando 25 larvas para cada concentración probada. Los testigos fueron 4 copas con larvas y alimento pero sin la toxina

Los estándares fueron de 7 copas con larvas, el alimento y diferentes concentraciones de un extracto estandarizado de B. t. llamado s-endotoxina HD-1-1980, el cual contenía la toxina que servía de base para comparar el grado de mortalidad producido para los extractos estudiados. Las concentraciones de estándar usadas fueron de 1, 5, 10, 20, 30, 40, y 50 ug / ml de alimento.

2.3.- Cuantificación de Esporas Viables.

Para determinar el número de esporas viables que contenían cada extracto por mg; se sembraron (a partir de la suspensión madre de extractos) en medios sólidos con agar nutritivo diferentes diluciones, mismas que posteriormente se inocularon en cajas Petri con agar nutritivo las que resultaron positivas se resembraron en tubos de agar inclinado.

2.4.- Observaciones de Cristales al Microscopio.

De cada una de las suspensiones de extracto se prepararon frotis que fueron teñidas con azul de Coomasie (36) se observaron en un microscopio de alta resolución Microscopio Zeiss tipo 3, adaptado con un lente objetivo de contraste de fases PH-3.

2.5.- Evaluación de los Resultados.

2.5.1.- Determinación del Porciento de Mortalidad.

Con los datos obtenidos del número de larvas muertas para cada concentración y por bioensayo, se calculó el porcentaje de mortalidad para cada tratamiento y con esto el porciento de mortalidad promedio para cada concentración. (35)

2.5.2.- Diseño Experimental Estadístico.

Para medir la variable de respuesta (porciento de mortalidad), se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (18 x 7), con 3 repeticiones; donde 18 es el número de niveles del factor Extractos de Fermentación para cada uno de los mismos, con lo cual obtenemos un total de 126 tratamientos, que resultan de la combinación de los 18 extractos analizados con sus 7 concentraciones. (38).

Se efectuaron 3 repeticiones para cada tratamiento o combinación de los diferentes niveles de los factores.

Modelo Estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha, \beta)_{ij} + E_{ijk}$$

i = son los niveles del factor 1 (Extracto).
 j = son los niveles del factor 2 (Concentración)
 k = es el número de repeticiones.

$$i = 1, 2, \dots, 18; \quad j = 1, 2, \dots, 7; \quad k = 1, 2, 3$$

E_{ijk} = Los errores se distribuyen normalmente independientes con media cero y varianza σ^2

Y_{ijk} = Variable de respuesta. Es el parámetro a medir (porcentaje de mortalidad).

μ = Media del parámetro a medir que posee el experimento por sí solo.

α_i = Es el efecto debido al factor extracto.

β_j = Es el efecto debido a la concentración de cada extracto.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Es el efecto debido a la interacción extracto-concentración.

E_{ijk} = Error experimental.

H_0 = Hipótesis Inicial o Nula.

H_1 = Hipótesis Alternante.

Prueba de Hipótesis.

(a).- H_0 : No existe diferencia entre el porcentaje de mortalidad debido a los diferentes extractos.

H_1 : Existe diferencia en el porcentaje de mortalidad. (son diferentes).

(b).- H_0 : No existe diferencia entre el porcentaje de mortalidad debido a las diferentes concentraciones de cada extracto (son iguales).

H1 : Existe diferencia entre el porcentaje de mortalidad debido a las diferentes concentraciones. (Son diferentes).

(c).- Ho : No existe diferencia entre el porcentaje de mortalidad debido a la interacción Extracto-Concentración. (Son iguales).

Hi : Existe diferencia entre el porcentaje de mortalidad de la interacción Extracto-Concentración. (Son diferentes).

2.5.3.- Determinación de Valores de Dosis Letal Media. (DL₅₀) y de Potencia

Los valores de porcentaje de Mortalidad se transformaron a unidades Probit por medio de tablas (39,40) y se graficaron contra las concentraciones de extractos utilizadas, se ajustó cada recta por medio de una regresión lineal y se calculó para cada extracto el valor de Dosis Letal Media (DL₅₀) así mismo se calcularon los valores de DL₉₀ y los coeficientes de correlación para cada curva. (41, 42, 43, 44)

Se obtuvieron también los valores de DL₅₀, DL₉₀ y coeficiente de correlación de cada uno de los estándares y se relacionaron con los valores de DL₅₀ de las muestras por medio de la siguiente ecuación para expresarlos como potencia tóxica de los extractos.

$$\text{Potencia} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ estandar}}{\text{DL}_{50} \text{ muestra}} \times 16,000$$

expresado en Unidades Internacionales (U I / mg). (32)

Donde: UI = Capacidad de producir la muerte de las larvas por mg. de extracto.

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

Después de 7 días de permanecer las larvas en una cámara bioclimática, donde permanecieron alimentándose en las copas sólo de la dieta balanceada en el caso de los controles; de la dieta y las diluciones del extracto de referencia para los estándares y de la dieta con las diluciones de los extractos de fermentación analizados; se contabilizó el número de los tratamientos. (Cuando el número de larvas perdidas fue mayor del 20% en más de tres concentraciones, se repitió el bioensayo). Para corregir los datos de mortalidad natural se propuso aplicar la ecuación de Abbots (46) tomando los valores de los testigos, pero como en los bioensayos el porcentaje de mortalidad de los mismos fue menor al 5% ya no se hicieron las correcciones por medio de esta ecuación.

Como los bioensayos se repitieron 3 veces, se obtuvieron los valores promedio de mortalidad para cada concentración, los cuales se muestran en la tabla No.13. (Aunque en el análisis estadístico se tomaron 19 extractos, para determinar promedios de mortalidad y potencias se eliminó el extracto HD-24 por pertenecer a otra variedad).

Los valores de mortalidad para cada tratamiento y el porcentaje de mortalidad promedio de cada extracto, se presentan en las tablas del apéndice, del No. 22 al No. 39. Y los porcentajes de mortalidad de los estándares de cada bioensayo en función de la concentración en la tabla No. 46 del apéndice.

Para determinar si hubo diferencia entre la mortalidad, ya sea debido a los tipos de extracto o a las diferentes concentraciones de ellos; a los resultados obtenidos se les practicó un análisis estadístico de varianza, en el cual de acuerdo a las características del experimento, se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con un Arreglo Factorial (45), dicho análisis arrojó los siguientes resultados:

Dado que la F.C. del factor extractos fué mayor que la F de tabla, se rechaza la hipótesis inicial de homogeneidad de varianzas y se acepta la hipótesis alternante de heterogeneidad. Lo cual quiere decir que los diferentes extractos produjeron diferente grado de mortalidad.

Analizando el factor concentración observamos que se sigue la misma tendencia; es decir, que dentro de un extracto las diferentes concentraciones producen diferente índice de mortalidad.

La interacción de extractos-concentración también fue significativa, lo cual quiere decir que el porcentaje de mortalidad depende de la concentración determinada que tenga un extracto. Los valores de análisis de varianza se muestran en la tabla No. 3, los cuales fueron obtenidos de los valores de mortalidad de cada uno de los extractos cuyos datos se encuentran concentrados en el apéndice en las tablas de la 22 a la 39.

Como la interacción (ext-conc) fue significativa se aplicó una segunda prueba estadística para que nos indicara que extractos con que concentraciones produjeron mayor porcentaje de mortalidad.

De acuerdo a las características del problema el diseño que se aplicó fue un Diseño de Bloques al Azar (47). El cuadro de concentración de datos aparece en la tabla No. 40 del apéndice.

Los resultados encontrados en el análisis de varianza se muestran en la tabla No. 4

De acuerdo al análisis de varianza. Extracto es significativo, lo cual confirma el análisis anterior de arreglo factorial. Por lo que para determinar cuales extractos fueron los que produjeron mayor porcentaje de mortalidad, se aplicaron unas pruebas estadísticas de comparación llamadas Pruebas de Rango Múltiple, de entre las cuales se eligió la más utilizada en investigación; la Prueba de Duncan.

Los datos numéricos de esta prueba se reportan en el apéndice en las tablas No. 41, 41a y 41b y cuyos resultados se presentaron en la tabla No. 5

En base al Análisis de Varianza del Diseño de Bloques al Azar (Tabla No. 4). Las concentraciones también fueron significativas y para determinar cuales de ellas produjeron diferencias de porcentaje de mortalidad, se les aplicó la misma Prueba de Duncan. Los datos se reportan en el apéndice en las tablas 42, 42a y 42b. Los resultados del Análisis de Varianza se señalan en la tabla No. 6.

Tomando como base los resultados encontrados en el análisis de extractos y concentraciones; para poder identificar los mejores extractos con las concentraciones

óptimas, se les aplicó un nuevo análisis de varianza con un Diseño de Bloques al Azar a los mejores extractos contra las mejores concentraciones. Los datos resultantes están en la tabla No. 43 del apéndice. El análisis de varianza de Bloques al Azar de extractos Vs. concentraciones se señala en la tabla No. 7.

Para lograr una mayor exactitud de los resultados, aunque no sean significativos se les aplicarán las Pruebas de Duncan tanto a extractos como a concentraciones.

Las tablas de cálculos están en el apéndice; las 44, 44a y 44b corresponden a los extractos y las 45, 45a y 45b a las concentraciones.

Los resultados de la Prueba de Duncan para el análisis de extractos se señalan en la tabla No. 8 y los del análisis de las concentraciones en la tabla No. 9.

La conclusión final aparece en la tabla No. 10, donde se muestra que los extractos:

(1033) HD-187

(12) HD-183

(310) HD-203

(63) HD-203

(13) HD-184

(837) HD-1

Presentaron las mejores toxicidades y que éstas eran iguales a las concentraciones de 250 y 500 ppm.

De los extractos que se estudiaron 6 de ellos resultaron como buenas posibilidades por el alto grado de

mortalidad que produjeron, principalmente a concentraciones de 250 y 500 ppm. En la tabla No. 11 aparecen los extractos de fermentación más potentes encontrados.

En forma complementaria 3 de estos extractos se corrieron de nuevo en bioensayos de 25 repeticiones, los resultados se muestran en la tabla No. 12.

Para evaluar la capacidad tóxica de los extractos desde otro punto de vista se calculó para cada uno de ellos los valores de Dosis Letal Media y posteriormente los de Potencia (UI/mg.), para lo cual fue necesario utilizar el sistema Probit para convertir los porcentos de mortalidad promedio en unidades Probit y encontrar así las concentraciones correspondientes en logaritmos de la concentración. Con estos nuevos valores se trazaron inicialmente en papel logaritmo Vs. Probit de mortalidad, pero posteriormente se prefirió utilizar un modelo de cálculo estadístico usando una calculadora ya que ofreció mejores ventajas para poder hacer un ajuste de la recta por Mínimos Cuadrados, para encontrar en forma directa los valores de la pendiente, la intercepción, el coeficiente de correlación y finalmente por regresión lineal los de DL_{50} y DL_{90} . El mismo tratamiento se realizó para los estándares utilizados.

En la tabla No. 47 del apéndice se presenta un ejemplo de la forma en que se calcularon los valores de DL_{50} .

En la tabla No.15 aparecen los datos de DL_{50} de cada uno de los extractos y en la tabla No. 16 las Dosis Letales

Media de los extractos más activos.

Con los valores de la Dosis Letal Media de los extractos y de los estándares de los bioensayos se calculó la potencia respectiva expresándola en UI/mg. de extracto.

En la tabla No. 17 se muestran los valores de potencia de los diferentes extractos de B.t. así como sus años de producción.

En las tablas No. 18 y No. 19 se señalan los extractos seleccionados con potencias superiores a las 1,000 UI/mg. y a 10,000 UI/mg.

En la tabla No. 20 se concentran los datos de potencia y DL_{50} de cada uno de los extractos incluyendo el año en que se fermentaron.

En la gráfica No. 1 se ilustran las variaciones de las potencias de los extractos utilizados.

En las graficas No. 2 y No. 3 se representan las potencias de los extractos que presentaron mejores resultados.

En la grafica No. 4 se representan los valores de DL_{50} de los extractos de B.t. var. kurstaki.

En la grafica No. 5 se presentan los valores de DL_{50} de los extractos más activos.

La representación gráfica del comportamiento de los porcentos de mortalidad promedio de los extractos más potentes están señalados en las gráficas No. 2 y 2a donde puede observarse un comportamiento exponencial en la relación concentración Vs. porcentaje de mortalidad para todos ellos.

TABLA No. 3.- Análisis de Varianza (Extracto Vs. Concentración) de un Diseño Completamente al Azar con Arreglo Factorial.

F.V.	G.L	S.C.	C.M.	F.C.	F TABLA	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	132	4999.364	37.8740	15.5151 (**)	1.27	1.41
EXTRACTO	18	2256.221	125.3456	51.3480 (**)	1.64	2.00
CONC.	6	1644.311	274.0519	112.2657 (**)	2.13	2.87
EXT-CONC	108	1098.832	10.1744	4.1679 (**)	1.29	1.44
EE	266	649.333	2.4411			
TOTAL	398	5648.697				

TABLA No. 4.- Análisis de Varianza para un Diseño de Bloques al Azar.

F.V.	G.L	S.C.	C.M.	F.C.	F TABLA	
					0.05	0.01
EXTRACTO	18	6768.700	376.0000	12.3000 (**)	1.64	2.00
CONC.	6	4932.900	822.2000	26.9000 (**)	2.13	2.87
EE	108	3296.500	30.5000			
TOTAL	132	14998.100				

TABLA No. 5.- Prueba de Duncan para análisis de Extractos del Diseño de Bloques al Azar con Alfa=0.05

/) . =	5	8	5	4	6	8	6	9	9	1	3	1	1	7	3	1	6	1	8	
	4	1	0	7	5	2	6	0	2	8	8	0	0	0	1	3	3	2	3	
	0	9	8	1	8	0	1	6	8	3	9	3	3	5	0	-	-	-	7	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	-	-	-	-	-	-	
837 HD-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
12 HD-183	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS		
63 HD-203	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS			
13 HD-184	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS				
310 HD-203	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS					
705 HD-183	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS						
1033 HD-187	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS							
1036 HD-1	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS								
389 HD-24	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS									
183 HD-73	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS										
928 HD-73	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS											
906 HD-183	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS												
661 HD-187	*	*	*	NS	NS	NS	NS													
820 HD-203	*	*	NS	NS	NS	NS														
658 HD-73	*	NS	NS	NS	NS															
471 HD-73	NS	NS	NS	NS																
508 HD-1	NS	NS	NS																	
819 HD-184	NS	NS																		
540 HD-187	NS																			

/) .- Corresponden a Los No. encerrados en () de La columna vertical

Alfa [=] Significancia o Error
 * [=] Son Diferentes
 NS [=] Son Iguales

TABLA No. 6.- Prueba de Duncan para Análisis de Concentraciones del Diseño de Bloques al Azar

		CONC. (ppm. de Extractos de Dieta)					
CONC.	1	10	25	50	100	250	500
500	*	*	*	*	*	*	NS
250	*	*	*	*	*	NS	
100	*	*	*	*	NS		
50	*	*	NS	NS			
25	*	NS	NS				
10	*	NS					
1	NS						

TABLA No. 7.- Análisis de Varianza del Diseño de Bloques al Azar de Extractos Vs. Concentraciones.

F.V.	G.L	S.C.	C.M.	F.C.	F TABLA	
					0.05	0.01
EXTRACTO	6	26.2852	4.3809	1.4153 (NS)	3.00	4.82
CONC.	2	23.5234	11.7617	3.7998 (NS)	3.88	6.93
EE	12	37.1445	3.0954			
TOTAL	20	86.9531				

TABLA No. 8.- Conclusiones de la Prueba de Duncan para Extractos.

EXTRACTOS	EXTRACTOS						
	(705)	(1033)	(13)	(310)	(12)	(837)	(63)
(63) HD-203	DIF.	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL
(837) HD-1	DIF.	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL	
(12) HD-183	DIF.	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL		
(310) HD-203	IGUAL	IGUAL	IGUAL	IGUAL			
(13) HD-184	IGUAL	IGUAL	IGUAL				
(1033) HD-187	IGUAL	IGUAL					
(705) HD-183	IGUAL						

TABLA No. 9.- Conclusiones de la Prueba de Duncan para Concentraciones.

CONC.	CONC. (ppm. de Extractos en Dieta)		
	100	250	500
500	DIF.	IGUAL	IGUAL
250	IGUAL	IGUAL	
100	IGUAL		

TABLA No. 10.- Conclusión final del Análisis Estadístico de Mortalidad de Extractos Vs. Concentraciones. (ppm. de Extractos de Dieta).

EXTRACTO \ CONCENTRACION	250	500
(1033) HD-187	29.0	30.0
(12) HD-183	30.0	30.0
(310) HD-203	30.0	30.0
(63) HD-203	29.0	30.0
(13) HD-184	30.0	30.0
(837) HD-1	30.0	30.0

TABLA No. 11.- Porcentaje de Mortalidad Promedio de los Extractos de Fermentación de B.t. más Potentes contra T. ni. a diferentes Concentraciones.

E X T R A C T O	CONC. (ppm. de Extractos en Dieta)				
	25	50	100	250	500
(837) HD-1	43.0	70.0	93.0	85.0	90.0
(12) HD-183	47.0	73.0	70.0	80.0	97.0
(13) HD-184	50.0	67.0	70.0	87.0	97.0
(1033) HD-187	13.0	67.0	70.0	87.0	97.0
(63) HD-203	50.0	77.0	83.0	83.0	100.0
(310) HD-203	10.0	73.0	77.0	87.0	100.0

TABLA No. 12.- Porcentaje de Mortalidad de 3 Extractos de Fermentación de Cepas de B.t. en Bioensayos de 25 Repeticiones Vs.T. ni.

EXTRACTO DE FERMENTACION	CONC. (ppm. de Extractos en Dieta)			
	20	30	40	50
(837) HD-1	32.0	56.0	60.0	68.0
(12) HD-1	44.0	68.0	80.0	100.0
(13) HD-184	72.0	92.0	100.0	100.0

TABLA No.13.- Relación de % de Mortalidad de Extractos de Fermentación de Cepas de B.t. contra T.ni. (Valores Promedio de cada Concentración).

EXTRACTO DE FERMENTACION	Valores promedio de mortalidad para cada concentración (ppm de extracto/ml. dieta)						
	C O N C E N T R A C I O N E S						
	1	10	25	50	100	250	500
	% DE MORTALIDAD						
(1036) HD-1	0.0	6.7	10.0	23.3	46.7	43.3	93.3
(508) HD-1	0.0	3.3	13.3	6.7	6.7	16.7	23.3
(837) HD-1	23.3	40.0	43.3	70.0	93.3	85.0	90.0
(183) HD-73	0.0	6.7	10.0	16.7	20.0	40.0	73.3
(471) HD-73	3.3	3.3	10.0	6.7	13.3	13.3	16.7
(658) HD-73	13.3	13.3	3.3	3.3	10.0	20.0	16.7
(928) HD-73	36.7	13.3	3.3	13.3	3.3	13.3	----
(12) HD-183	0.0	43.0	77.0	90.1	90.0	90.0	97.0
(705) HD-183	6.7	13.3	16.7	20.0	63.3	46.7	57.0
(906) HD-183	3.3	6.7	20.0	6.7	6.7	33.3	40.0
(540) HD-187	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	6.7
(1033) HD-187	6.7	23.3	36.7	----	60.0	93.3	86.7
(661) HD-187	3.3	3.3	0.0	13.3	10.0	30.0	60.0
(63) HD-203	3.3	40.0	50.0	76.7	83.3	83.3	100.0
(310) HD-203	7.0	17.0	10.0	73.3	76.7	86.7	100.0
(820) HD-203	3.3	3.3	6.7	6.7	13.3	20.0	60.0
(13) HD-184	0.0	6.7	10.0	16.7	20.0	40.0	73.3
(819) HD-184	0.0	----	0.0	10.0	3.3	3.3	16.7

TABLA No. 14.- Concentración de Datos Estadísticos para el Cálculo del DL₅₀ y DL₉₀.

EXTRACTO	INTERCEP.	PEND.	COEF. DE CORREL.	DL ₅₀ EXTRACTO	DL ₉₀ EXTRACTO	DL ₅₀ ESTANDAR
1036 HD-1	-0.6373	0.5414	0.9276	117.0	580.0	29.0
837 HD-1	-1.9602	0.6959	0.9285	33.0	258.0	23.0
508 HD-1	-2.7787	1.2468	0.8060	2,855.0	113,096	15.0
183 HD-73	-1.4680	0.7761	0.9509	260.0	2,554.0	15.0
471 HD-73	-4.9387	1.8422	0.8952	16,881.0	4.0E+6	14.0
658 HD-73	-1.8591	0.9616	0.4481	888.0	15,170.0	19.0
928 HD-73	-3.7510	1.3122	0.9150	646.0	31,046.0	8.0
12 HD-183	-3.1749	0.8344	0.9103	10.0	117.0	20.0
705 HD-183	-3.5020	1.2046	0.9829	332.0	11,596.0	15.0
906 HD-183	-2.3428	1.0518	0.9247	825.0	18,387.0	16.0
540 HD-187	-----	-----	-----	infinito	-----	----
1033 HD-187	-1.8458	0.6991	0.9445	31.0	351.0	20.0
661 HD-187	-1.2000	0.7704	0.9334	448.0	4,355.0	9.0
63 HD-203	-2.7092	0.80151	0.9566	20.0	212.0	26.0
310 HD-203	-1.5568	0.6189	0.9628	34.0	214.0	14.0
820 HD-203	-1.1863	0.7805	0.9190	521.0	5,210.0	31.0
13 HD-184	-1.0410	0.5363	0.9620	44.0	213.0	22.0
819 HD-184	-----	-----	-----	infinito	-----	----

Los números antes de HD son la clave interna del extracto.

TABLA No. 15.- Comparación de Valores de DL₅₀ (ppm) de diferentes Extractos de B.t. Var. kurstaki (Valores Promedio) Vs. T. ni.

EXTRACTO	DL ₅₀ (ppm. DE EXTRACTO)
(1036) HD-1	117.0
(837) HD-1	33.0
(508) HD-1	2,855.0
(183) HD-73	260.0
(471) HD-73	16,881.0
(658) HD-73	888.0
(928) HD-73	646.0
(12) HD-183	10.0
(705) HD-183	332.0
(906) HD-183	825.0
(540) HD-187	infinito
(1033) HD-187	31.0
(661) HD-187	448.0
(63) HD-203	20.0
(310) HD-203	34.0
(820) HD-203	521.0
(13) HD-184	44.0
(819) HD-184	infinito

TABLA No. 16.- Comparación de Dosis Letal Media de los Extractos más Activos de B.t. Vs. T. ni.

EXTRACTO	DL ₅₀ (ppm. DE EXTRACTO)
(12) HD-183	10.0
(63) HD-203	20.0
(1033) HD-187	31.0
(837) HD-1	33.0
(310) HD-203	34.0
(13) HD-184	44.0

TABLA No. 17.- Comparación de Valores de Potencia de diferentes Extractos de Fermentación de B.t. (Valores Promedio) Vs. T. ní.

EXTRACTO	POTENCIA UI/mg. DE EXTRACTO
(1036) HD-1	3,966.0
(837) HD-1	11,152.0
(508) HD-1	INACTIVA
(183) HD-73	924.0
(471) HD-73	INACTIVA
(658) HD-73	343.0
(928) HD-73	198.0
(12) HD-183	32,000.0
(705) HD-183	723.0
(906) HD-183	310.0
(540) HD-187	INACTIVA
(1033) HD-187	10,322.0
(661) HD-187	321.0
(63) HD-203	20,800.0
(310) HD-203	6,588.0
(820) HD-203	952.0
(13) HD-184 *	8,000.0
(819) HD-184 *	INACTIVA

- Los extractos marcados con (*) son de la variedad *galleriae*, el resto son de la variedad *kurstaki*.
- La potencia está calculada en comparación con el estándar B.t. δ -Endotoxina, HD-1-1980 contra Lepidópteros.

TABLA No. 18.- Potencias de Extractos de B.t. con Valores superiores a las 1,000 UI/mg.

EXTRACTO	POTENCIA
(12) HD-183	32,000.0
(63) HD-203	20,800.0
(837) HD-1	11,152.0
(1033) HD-187	10,322.0
(13) HD-184	8,000.0
(1036) HD-1	3,966.0
(310) HD-203	6,588.0

TABLA No. 19.- Potencias de Extractos de B. t. con Valores superiores a las 10,000 UI/mg.

EXTRACTO	POTENCIA
(12) HD-183	32,000.0
(63) HD-203	20,800.0
(837) HD-1	11,152.0
(1033) HD-187	10,322.0

TABLA No. 20.- Relación de Valores de DL₅₀ y Potencias de Extractos de B.t. Var. kurstaki y galleriae Vs. T. ni. en sus diferentes Años de Producción.

CEPA	AÑO DEL EXTRACTO	LD ₅₀ (ppm.)	POTENCIA (UI/mg.)	VARIEDAD	SEROTIPO
(1036) HD-1	1968	117.0	3,966.0	KURSTAKI	3a3b
(508) HD-1	1972	2,855.0	85.0	KURSTAKI	3a3b
(837) HD-1	1976	33.0	11,152.0	KURSTAKI	3a3b
(183) HD-73	1971	260.0	924.0	KURSTAKI	3a3b
(658) HD-73	1973	888.0	343.0	KURSTAKI	3a3b
(471) HD-73	1972	16,881.0	14.0	KURSTAKI	3a3b
(928) HD-73	1975	646.0	198.0	KURSTAKI	3a3b
(12) HD-183	1971	10.0	32,000.0	KURSTAKI	3a3b
(705) HD-183	1972	332.0	723.0	KURSTAKI	3a3b
(906) HD-183	1975	825.0	310.0	KURSTAKI	3a3b
(540) HD-187	1972	infinito	0.0	KURSTAKI	3a3b
(1033) HD-187	1972	31.0	10,322.0	KURSTAKI	3a3b
(661) HD-187	1973	448.0	321.0	KURSTAKI	3a3b
(63) HD-203	1970	20.0	20,800.0	KURSTAKI	3a3b
(310) HD-203	1974	34.0	6,588.0	KURSTAKI	3a3b
(820) HD-203	1976	521.0	952.0	KURSTAKI	3a3b
(13) HD-184	1971	44.0	8,000.0	GALLERIAE	5a5b
(819) HD-184	1976	infinito	0.0	GALLERIAE	5a5b

TABLA No. 21.- Variaciones de la Potencia de Extractos de Fermentación de B.t. de diferentes Años de Producción Vs. T.ní.

AÑO	EXTRACTO	POTENCIA UI/mg.
1968	(1036) HD-1	3,966.0
1970	(63) HD-203	20,800.0
1971	(183) HD-73 (12) HD-183 (13) HD-184	924.0 32,000.0 8,000.0
1972	(508) HD-1 (471) HD-73 (705) HD-183 (540) HD-187 (1033) HD-187	INACTIVA INACTIVA 723.0 INACTIVA 10,322.0
1973	(658) HD-73 (661) HD-187	343.0 321.0
1974	(310) HD-203	6,588.0
1975	(928) HD-73 (906) HD-183	198.0 310.0
1976	(837) HD-1 (820) HD-203 (819) HD-184	11,152.0 952.0 INACTIVA

**NUMERO DE ESPORAS
VIABLES POR mg. DE EXTRACTO.**

Todos los extractos, a partir de las soluciones madres que fueron sembradas en los medios de cultivo presentaron crecimiento masivo; el número promedio total de esporas para los extractos seleccionados, son los siguientes:

(1033) HD-187 = 167×10^7 esporas/mg.

(12) HD-183 = 82×10^7 esporas/mg.

(310) HD-203 = 75×10^7 esporas/mg.

(63) HD-203 = 95×10^7 esporas/mg.

(13) HD-184 = 102×10^7 esporas/mg.

(837) HD-1 = 125×10^7 esporas/mg.

Demostrándose que poseen una fuerte habilidad natural para volver a iniciar un crecimiento del microorganismo. Estos extractos pueden utilizarse para desarrollar fermentaciones con el objeto de producir formulaciones bioinsecticidas.

OBSERVACIONES DE CRISTALES AL MICROSCOPIO

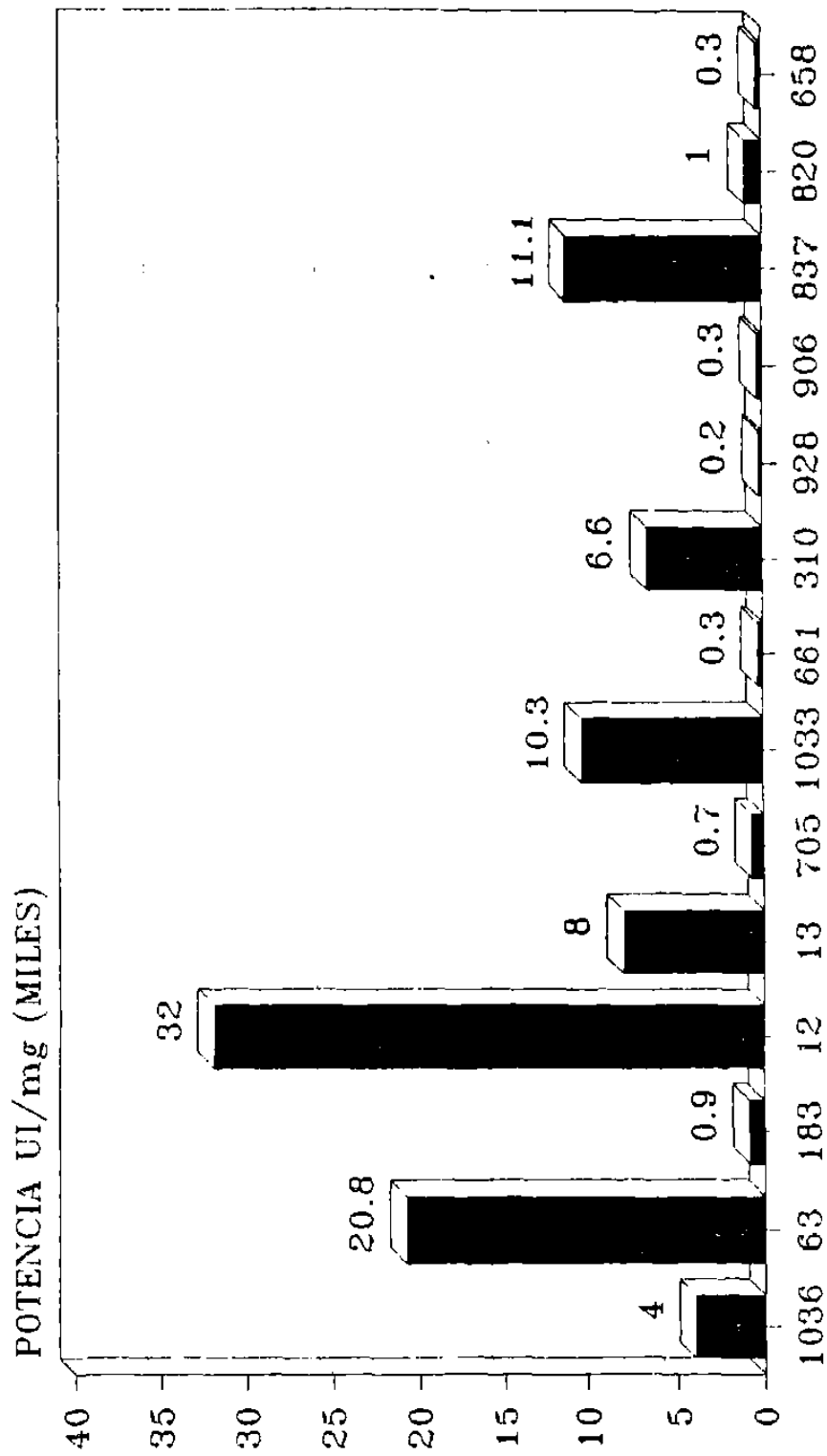
Con un microscopio de alta resolución adaptado con una cámara fotográfica se lograron tomar fotografías de las preparaciones obtenidas a partir de las soluciones madre de los extractos y utilizando un colorante especial (azul de coomasie) capaz de teñir los cuerpos paraesporales.

Todos los cristales observados presentaban la forma bipiramidal clásica, aunque en los extractos (183) HD-73, (540) HD-187 Y (820) HD-203 los cristales estaban deformes,

en algunas preparaciones se encontraron cristales libres y en otras se presentaban aún dentro de las células.

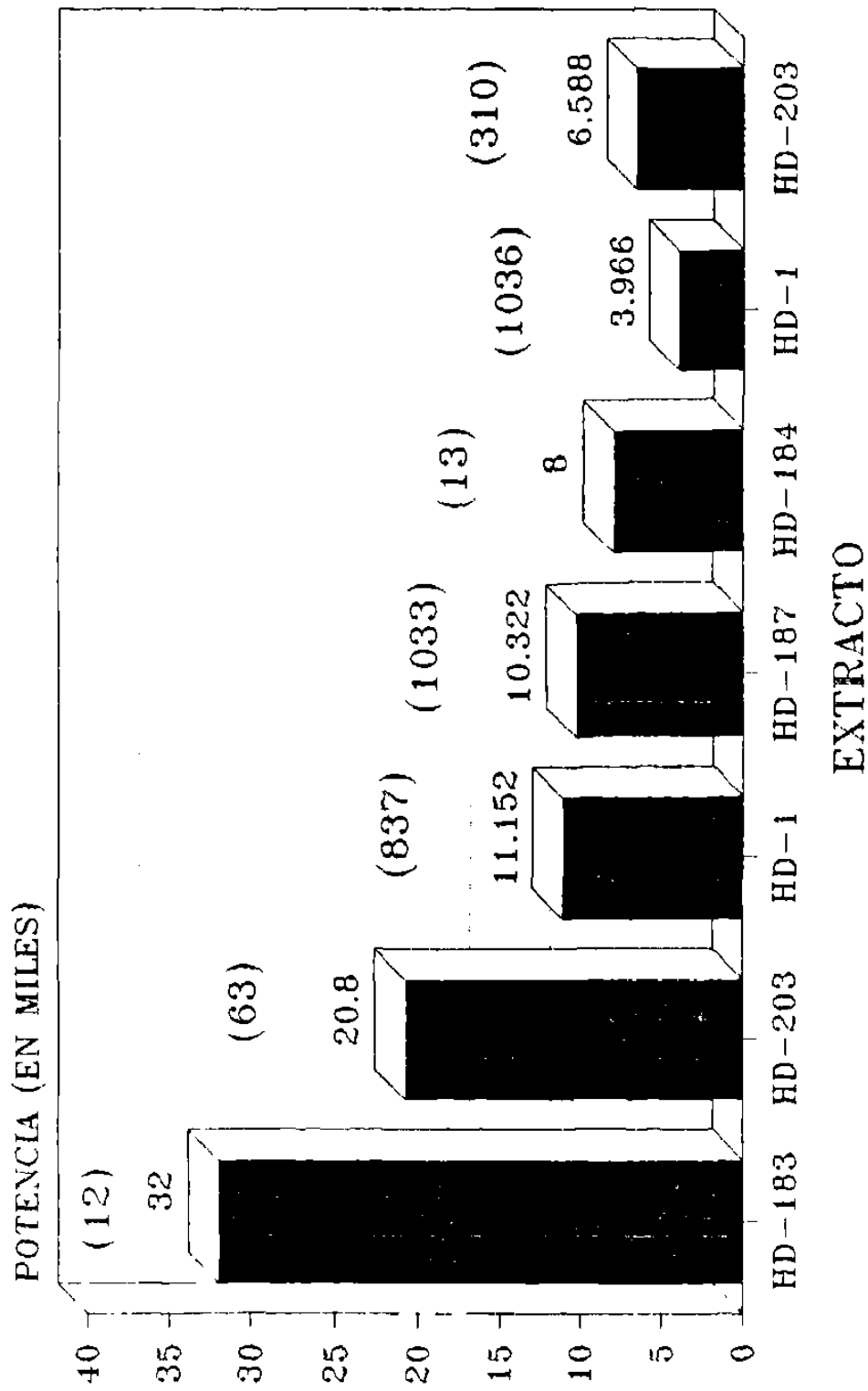
En las fotografías del apéndice se muestran ejemplos de los cristales observados, en donde se muestra su forma y la presencia íntegra del cristal de la bacteria.

GRAFICA No. 1 POTENCIAS DE EXTRACTOS
 DE FERMENTACION DE B.t. DE DIFERENTES
 AÑOS DE PRODUCCION Vs. T.ni.



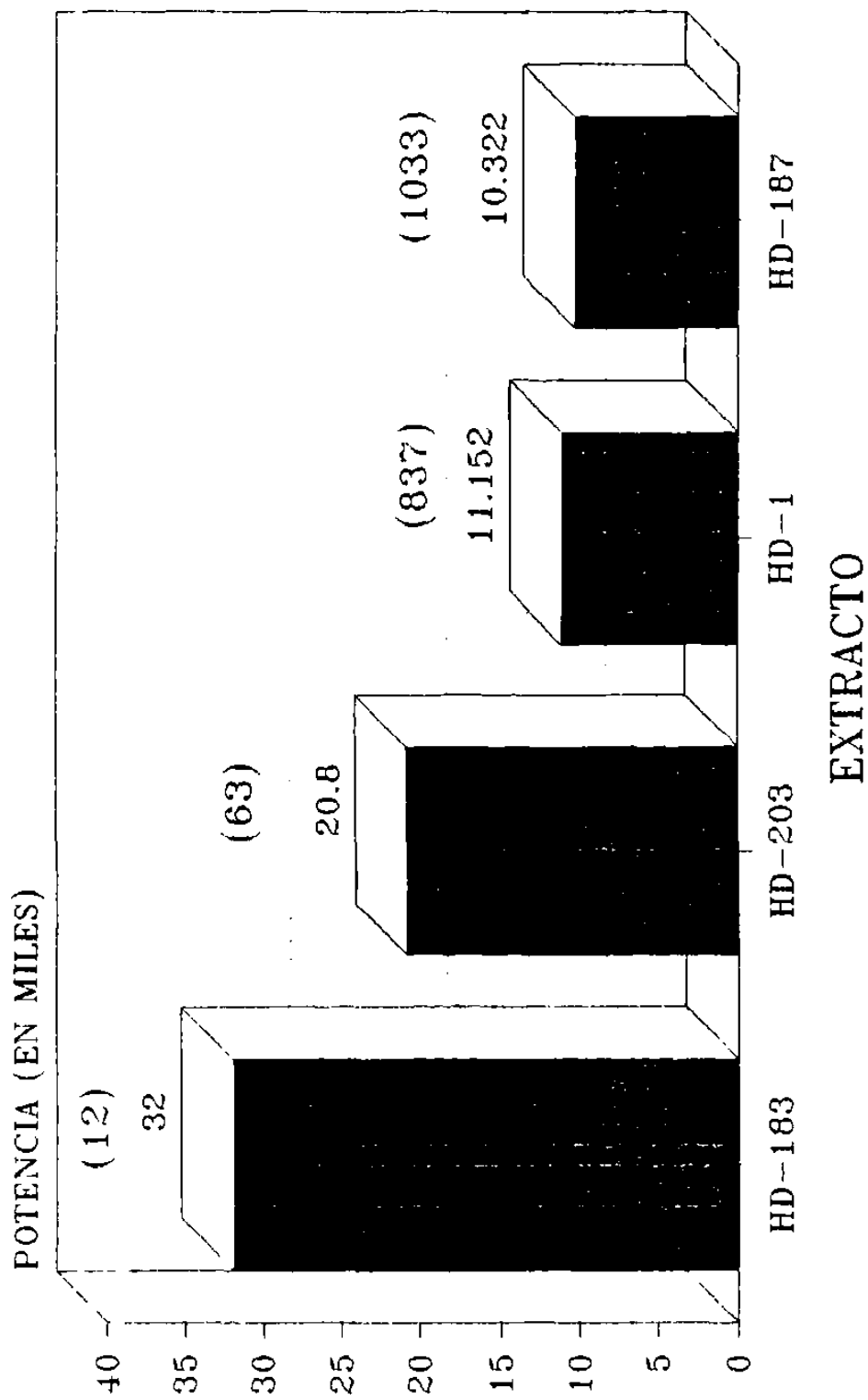
EXTRACTOS DE FERMENTACION

GRAFICA No. 2 POTENCIAS DE EXTRACTOS
 DE B.t. CON VALORES SUPERIORES A LAS
 1,000 UI/mg



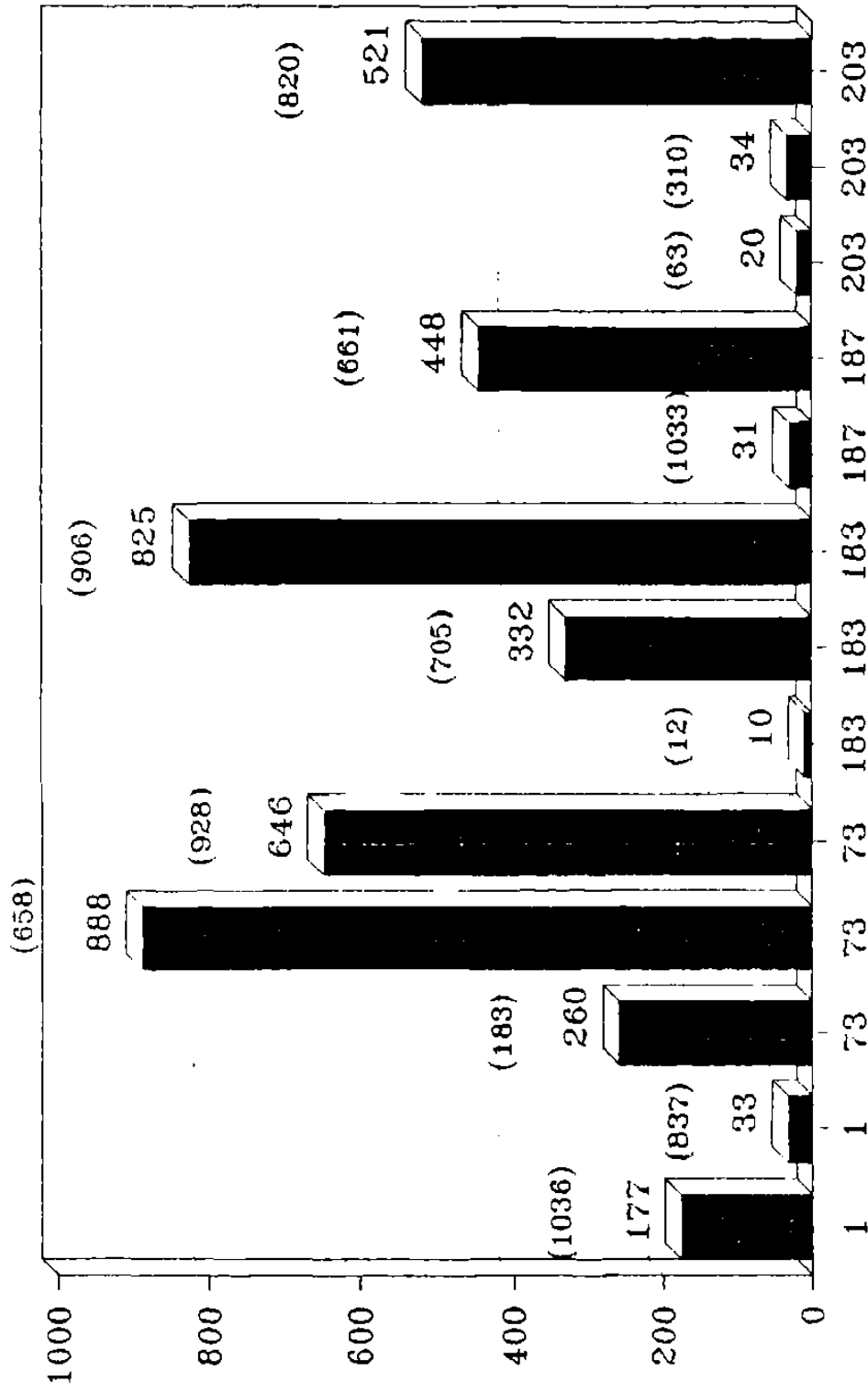
() = Clave del extracto de la Cepa HD utilizada.

GRAFICA No. 3 POTENCIAS DE EXTRACTOS
 DE B.T. CON VALORES SUPERIORES A LAS
 10,000 UI/mg



() = Clave del extracto de la Cepa HD utilizada.

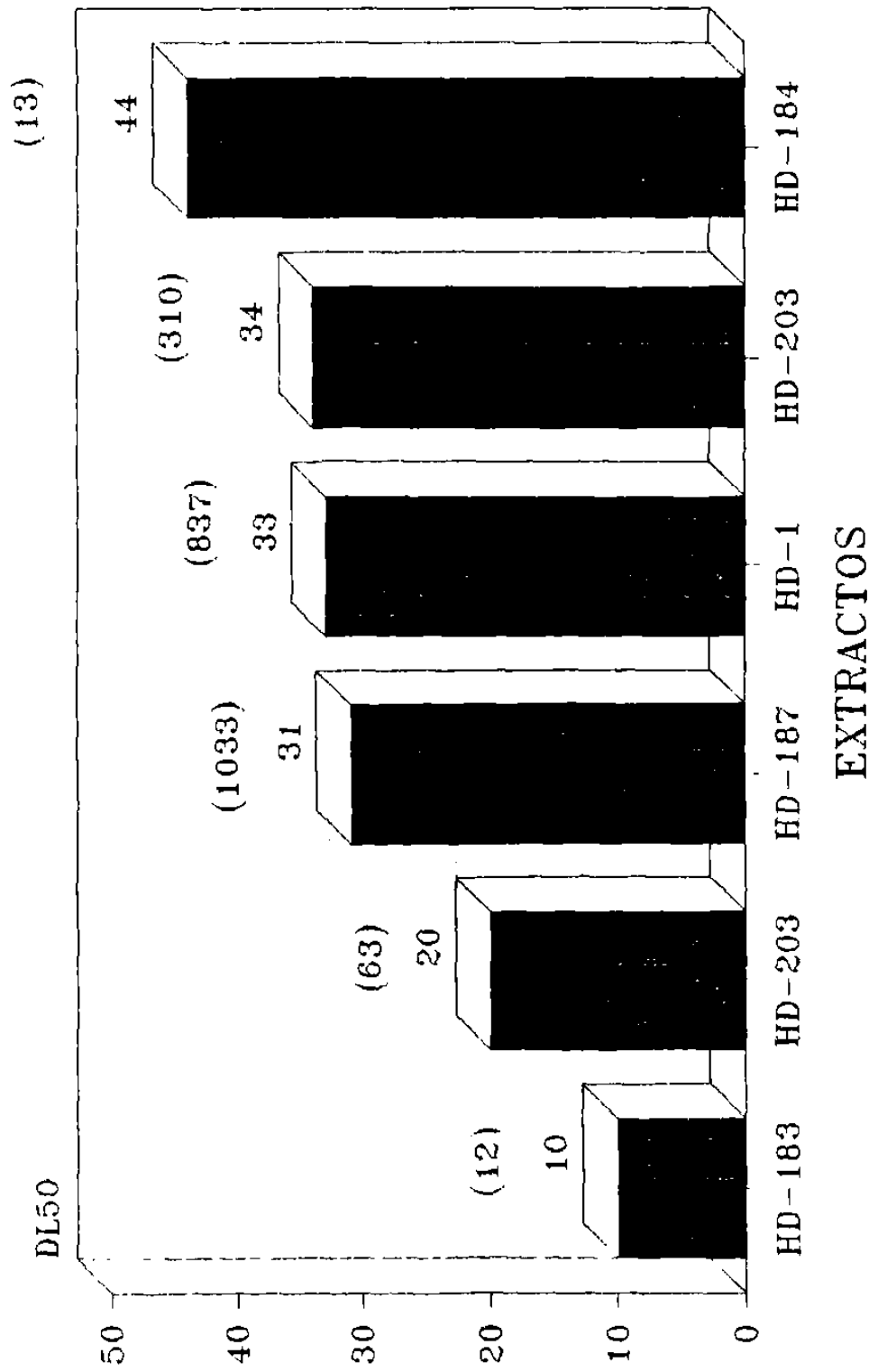
GRAFICA No. 4 VALORES PROMEDIO DE DL50
 (ppm) DE EXTRACTOS DE B.t. var.
 kurstaki CONTRA T.ni.



EXTRACTOS

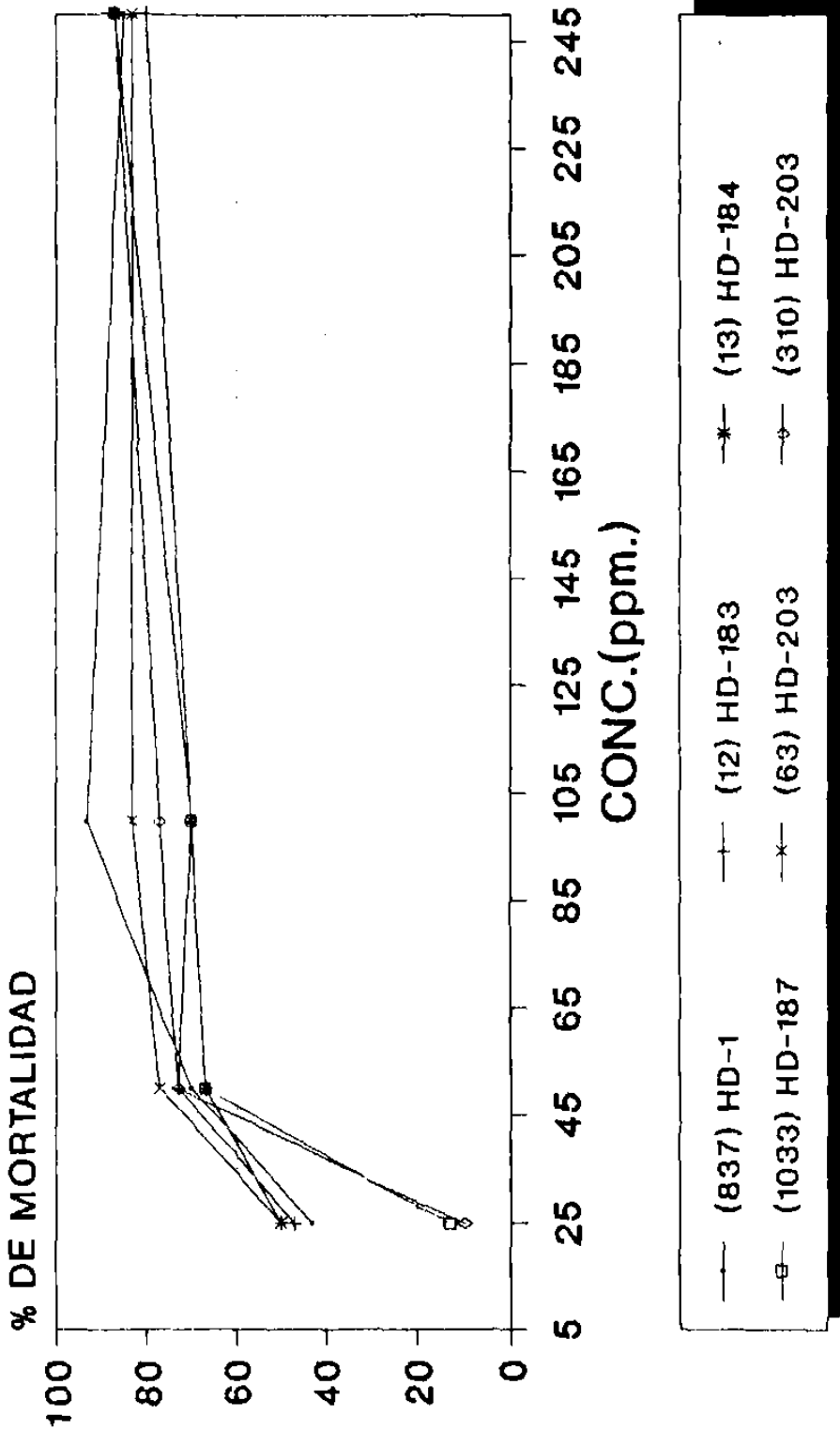
LOS NUMEROS DE X CORRESPONDEN A HD-
 () = Clave del extracto de la Cepa HD utilizada.

GRAFICA No. 5 VALORES PROMEDIO DE DL50
 (ppm) DE LOS EXTRACTOS MAS ACTIVOS DE
 B.t. CONTRA T.ni.



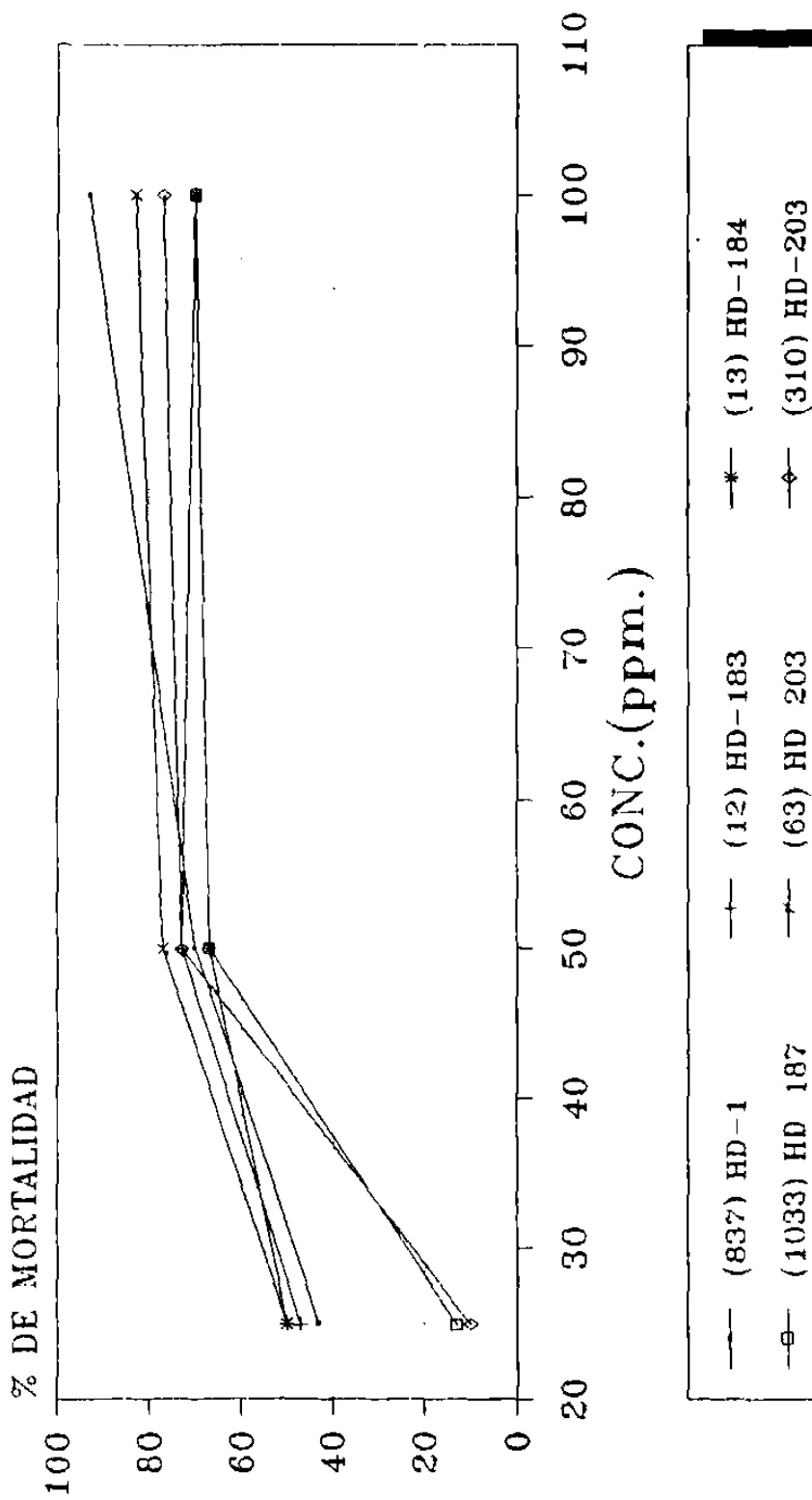
() = Clave del extracto de la Cepa HD utilizada.

GRAFICA No. 6 EFECTO DE LA CONC. (ppm)
DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS CONTRA
T.ni.



GRAFICA No. 6A EFECTO DE LA CONC. (ppm)
DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS CONTRA

T.ni.



C O N C L U S I O N Y D I S C U S I O N

CONCLUSION Y DISCUCION

Los resultados de la determinación del porcentaje de mortalidad y potencia insecticida de los extractos de fermentación de *B.t. var. kurstaki* contra *T.ni.*, mostraron que algunos extractos presentaron bajos niveles de actividad insecticida pero otros si mostraron valores de toxicidad (expresados en porcentaje de mortalidad) superiores al 60 %. Los resultados del análisis estadístico de varianza de la relación entre los diferentes extractos y las distintas concentraciones demostraron que hubo diferencia en el porcentaje de mortalidad dependiendo del extracto analizado y también de la concentración utilizada. La heterogeneidad de los resultados permitió aplicar nuevos análisis estadísticos con los cuales pudimos seleccionar 6 extractos con buenas propiedades bioinsecticidas. Las concentraciones que produjeron mayor mortalidad fueron las de 250 y 500 ppm, pero la diferencia entre estos dos no fue significativa. Es recomendable utilizar la concentración de 250 ppm en futuras aplicaciones.

La capacidad tóxica de los extractos se reportó también como valores de Potencia (U.I./mg.). Del análisis de estos datos encontramos que los extractos con más Potencia fueron: De la var. *kurstaki*, el (877) HD-1, el (12) HD- 183, el (1033) HD-187, el (63) HD-203, y el (310) HD-203 y de la var. *galleriae* el (13) HD-184, que son los mismos que presentaron mayores porcentajes de mortalidad. Estos extractos poseen una toxina que puede conservar su actividad después de varios años de almacenamiento.

El análisis de la toxicidad de los extractos en función del año en que se obtuvieron mostró que no existía una relación cronológica de la Potencia (el extracto más nuevo debió tener más Potencia), por lo que consideramos que la edad del extracto no es determinante en su toxicidad. Lo importante es el tipo de cepa usada y las condiciones en que se efectuó la fermentación. Esto plantea también el problema de la reproducibilidad y homogeneidad de los resultados de las fermentaciones para producir bioinsecticidas. Los extractos seleccionados fueron capaces de mantener su toxicidad después de más de 10 años de estar conservados a temperatura ambiente. Estos datos pueden servir para conocer más de la estabilidad y permanencia de estos insecticidas. también serán útiles para hacer estudios sobre la posible creación de resistencia por parte de los insectos.

Todas las muestras de extractos fueron capaces de producir un nuevo crecimiento vegetativo a partir de las esporas que estaban presentes en los mismos.

Este hecho resulta interesante ya que es posible que los extractos seleccionados sean fermentados nuevamente para obtener concentrados con posibles aplicaciones comerciales.

Estas colecciones de cepas son una buena fuente de análisis del comportamiento de las mismas con respecto a su actividad biológica y pueden ser una nueva forma de selección de cepas de B.t. altamente potentes que resulten eficaces y eficientes en su actividad plaguicida.

Al mismo tiempo al presentar las muestras actividad

después de muchos años se plantea la necesidad de hacer estudios sobre la aparición de resistencia por parte de los insectos. Considero que estas colecciones de cepas son una buena fuente de análisis del comportamiento de las mismas con respecto a su actividad biológica y su forma de selección. Es conveniente que los extractos que presentaron una mayor abundancia de células con cristales continúen siendo estudiados para detectar la presencia de posibles mutaciones o bien la conservación de sus propiedades patógenas contra larvas de Lepidópteros. Los datos de mortalidad encontrados en las muestras de fermentación seleccionadas demuestran que el procedimiento de extracción con lactosa-acetona es adecuado para la conservación de las células y la actividad tóxica de los extractos, sin embargo es necesario hacer más estudios con tratamientos de recuperación por "spray-drier" para ver si hay cambios en su toxicidad.

Las cepas seleccionadas por haber presentado los niveles mas altos de mortalidad son: HD-1, HD-183, HD-187, HD-203 y HD-184.

Finalmente se recomienda que en los futuros bioensayos que se realizen se utilicen 25 repeticiones para cada concentración estudiada con objeto de disminuir la influencia de los errores experimentales.

L I T E R A T U R A C O N S U L T A D A

LITERATURA CONSULTADA

- 1.- Cremlyn R., 1986. Plaguicidas Modernos y su acción Bioquímica. Limusa. Mex. 112-126
- 2.- Consejo De Agricultura. 1988. Manejo y Control de Plagas de Insectos. 2a. Ed. Limusa. Méx. 158-165.
- 3.- Frederici B., 1990. Bright Horizons for Invertebrate Pathology. Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control Adelaide. Australia. V-IX.
- 4.- Galan W., 1990. Notas para el tema Control Biológico para el curso de Biotecnología de Plantas. Depto. de Microbiología e Inmunología. FCB. - UANL. 1-23. (inédito).
- 5.- Pelczar M and Roger R. 1982. Microbiology. 4th. Mc Graw Hill. 623-624.
- 6.- Scell J. 1989. A. Revolution in Biotechnology. Cambridge, University Press.
- 7.- Marco G.J. 1987. Silent Spring Revisited. ACS. Washington: 150-157.
- 8.- Bouguerra M.L. 1991. Los Bioplaguicidas en ayuda de los cultivos. Mundo Científico. España. 10, (108): 1252-1253.
- 9.- Burrous. S.1986. Microbiología. 22 ed. Interamericana. España, 641-647.
- 10.- De Barjac H. and Frachon. E. 1990. Classification of B.t. Strains. Entomophaga.35. (2): 233-240
- 11.- Jamieson K. 1990 Thirty years of B.t. Research Forest Pest Management Institute Newsletter. Canadá. 2. (1): 1-10
- 12.- Honee G. and Vieseer B. 1990. Studies on Domain Function Relations on Insecticidal Crystal Proteins of B.t. kurstaki genes. V th. International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control Australia, 253.
- 13.- Choma Ch. and Kaplan H. 1990. Folding and Unfolding of the Protoxin from B.t. Biochemistry. 29: 10971-10977.

- 14.- Wu D. and Aronson A. 1990. Use of Mutagenic Oligonucleotides for Defining Regions of B.t. Delta-Endotoxin Involved in Toxicity. Vth. I.C. of I.P. and M.C. Australia, 273-277.
- 15.- Visser B. Mynsterman E, Stoker A and Dirkse W. 1990. A novel B.t. Gene Encoding a Spodoptera exigua Specific Crystal Protein. Journal of Bacteriology. 172 (12): 6783 - 6788.
- 16.- Gawron C, Burke C, Chambers J, Jelen A, Donovan W, Ropor M, and Jany C. 1990. Molecular Biology and Genetics of B.t. Vth. I. C. of P. and M.C. Australia: 456-459.
- 17.- Galizzi A, Albertini A, Caramori T, Degrassi G and Persic L . 1990 Novel Insecticidal Activities of Recombinant Proteins from B.t. kurstaki genes. Vth. I.C. of I. P. and M.C. Australia, 273-277.
18. Hofte H. and Whiteley R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of B.t. Microbiological Reviews. 53 (2): 242-255.
- 19.- Choma Ch, Surewicz W, Carey P, Pozsgay M and Kaplan H. 1990. Secondary Structure of the Entomocidal Toxin from B.t. Subsp. kurstaki HD-73. Journal of Protein Chemistry. 9. (1): 87-94.
- 20.- Klier A. and Reapoport G. 1987. Bacillus Larval Toxin Crystal Protein. Microbiological Sciences. 4 (9): 274-276.
- 21.- Dulmage, H., 1974. B.t. - Delta-Endotoxina. Su pasado, presente y futuro. IX Congreso Nacional de Entomología. Méx.
- 22.- Stainer, R., 1986. Microbiología. Ed. Repla. Méx. 623, 624 y 817.
- 23.- Knowels B, Nicholl S, Armstrong G, Tester M and Ellar D. 1990. Broad Spectrum Cytolytic Toxins made by B.t. Vth. I.C. of I.P. and M.C. Australia, 283-287.
- 24.- Khawaled K, Ben-Guiron University and Beer-Sheva. 1990. Tracing the Delta-Endotoxin Polipeptides of B.t. Vth. I.C. of I.P. and M.C. Australia, 295.
- 25.- Choma Ch, Surewic Z, Carey P, Pozsgay M, Raynor T and Kaplan H. 1990. Unusual Proteolysis of the Protoxin and Toxin from B.t. J. Biochem: 789, 525-527.

- 26.- Wolfersberger M. 1990. Specificity and Mode of Action of B.t. Insecticidal Crystal Proteins Toxic to Lepidopteran Larvae. Vth. I.C. of I.P. and M.C. Australia: 278-282.
- 27.- Lereclus D, Bourgouin C, Lecadet M, Klier A and Rapoport G. 1989. Role, Structure and Molecular Organization of the Genes Coding for the Paraesporal Delta-Endotoxins of B.t. Regulation of Prokaryotic Development. Ed. Issar Smith. American Society for Microbiology Washington: 255-276.
- 28.- Rongsen L. and Zhumeis. Sh. 1990 Host Specificity of B.t. Delta-Endotoxin Proteolysed by proteinases of Larvae Gut juice. Vth. I.C. of I.P. and M.C. Australia: 296.
- 29.- Dulmage H. 1989. Production and use of B.t. Perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 84. (3): 113-122.
- 30.- Daust, R., 1990. Commercialization of Bacterial Insecticides. V th. I.C. of I.P. and M.C. Australia, 7-11.
- 31.- Bhumiratana A. Local Production of B.t. for Controlling Insect Pests and Vectors. International Symposium on Insecticide of B. t. Hubei Academy of Agricultural Science. Wuhan. People's China. Republic of China: 1-17.
- 32.- Dulmage, H.T., et. al. 1971. E y a Proposed Standardized bioassay for formulation B. t. based by International Unit. Journal Invertebrate Pathology. 18: 240-245.
- 33.- Forb P. 1983. Control Biológico de Plagas de Insectos y Malas Hierbas. CECSA Mex. 663.
- 34.- Ross H. 1982 Introducción a la Entomología General y Aplicada. 5a. ed. Omega. Barcelona: 384-385.
- 35.- Bauer, L.S. 1990. Response of the Cotton Wood Leaf Beetle B.t. San Diego. Environ. Entomol. 19(2): 428-431.
- 36.- Shaobin L, Janping Y, Shungying D, Erying L and Yongmei Z, Standarization and Bioassay of B. t. preparations potency. Hubei Academy of Agricultural Science Wuhan. People's China: 20-24.
- 37.- Anónimo. 1975. Dipel. A Biological Insecticide Tech. Manual. Abbots Laboratories. North Chicago.

- 38.- Sharif. F., and Gurdal N. 1988. A Rapid and Simple Method for Staining of the Crystal Protein of B.t. *Journal of Industrial Microbiology.* 3, 227-229.
- 39.- Hernández, L. 1988. Evaluación de la Toxicidad de B.t. sur Spodoptera frugiperda. *Entomophaga.* 33(2), 163-171.
- 40.- Downie, N. and Heat, R. 1986. Métodos Estadísticos Aplicados. 5a. ed. Harla. Méx. 201-2013.
- 41.- Finney, P.J. 1961. Probit Analysis. 2a. ed. Cambridge, University Press. London: 333.
- 42.- Finney, P.J. 1971. Transformation of Percentages to Probits. 3a. ed. Cambridge University Press. London: 283-287.
- 43.- Cisneros. 1980. Evaluación de un Insecticida Biológico (a base de B.t.) en Maíz Dulce para Control del Gusano elotero (Heliothis sea). Tesis.I.T.M. (inédito).
- 44.- Vázquez, R.M., 1981. Determinación de la Concentración de B. t. y un Virus de la Polihedrosis Nuclear de Heliothis spp sobre larvas de Heliothis virescens. Tesis ITESM. (inédito).
- 45.- Draper, N.R. 1967. Applied Regression Analysis. Ed. Wiley: 127-134.
- 46.- Said, I.G. y A. Calderón. 1980. Manual de Análisis Probit C.P. Chapingo. Méx: 15-24.
- 47.- Rodríguez, J.M. 1991. Métodos de Investigación Pecuaria. Ed. Trillas. Méx: 55-100.

A P E N D I C E

FORMULA 1.

Preparación de dieta utilizada para las larvas de T. ni.
(cantidades necesarias para preparar un litro de medio).

	gramos
Nutrisoy (harina de soya)	71.1
gérmen de trigo.	31.7
sal Wesson.	10.6
ácido sórbico.	1.0
metil parabenzoico.	1.6
agar.	15.7

Cuando la mezcla con estos componentes está hirviendo se agrega:

ác. ascórbico.	4.3
----------------	-----

La mezcla de ingredientes se agrega a la licuadora y se le añade la solución vitamínica, la cual se prepara en el momento de licuar, añadiendo entonces el agar líquido en caliente y se licua a alta velocidad. Las vitaminas se adicionan junto con la siguiente mezcla:

	ml.
ác. acético (25%)	12.0
formalina (10%)	4.4
cloruro de colina (15%)	7.3
sol. de vitaminas	3.5
aureomicina (14%)	1.2

Preparación de soluciones:

A.- cloruro de colina al 15%.

Disolver 150 gr. de colina en agua desionizada y aforar a 1 litro.

B.- Solución de ác. acético al 25%.

Agregar 250 ml. de ác. acético glacial a 750 ml. de agua desionizada y agitar.

C.- Solución de formalina al 10%.

Partiendo de una formalina al 37% se adicionan 270 ml. de ésta, a 730 ml. de agua desionizada y se agita.

D.- Solución de vitaminas.

	gr./lt.
pantotenato de calcio	12.0
niacinamida	6.0
ác. fólico	3.0
rivoflavina	3.0
hidrocloruro de tiamina	1.5
hidrocloruro de piridoxina	1.5
biotina	0.12
* B-12	25.0

Aforar a 1,000 ml. con agua desionizada.

*) Pesar 25 mg. y adicionar a 100 ml. de agua desionizada, tomar 25 ml. de esta solución y aforar a un litro.

TABLA No.22 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (1036) HD-1.

CLAVE DE EXTRACTO : (1036) HD-1 AÑO 1968				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	0	6	1	6.7
25	0	2	0	10.0
50	1	2	0	23.3
100	2	9	3	46.7
250	2	7	4	43.3
500	10	9	9	93.3

TABLA No.23 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (508) HD-1.

CLAVE DE EXTRACTO : (508) HD-1 AÑO 1972				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	0	0	1	3.3
25	0	2	2	13.3
50	0	1	1	6.7
100	1	0	1	6.7
250	2	2	1	16.7
500	1	2	4	23.3

TABLA No.24 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (837) HD-1.

CLAVE DE EXTRACTO : (837) HD-1 AÑO 1976				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. μ g/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	1	1	6	23.3
10	2	6	5	40.0
25	5	6	5	43.3
50	--	4	10	70.0
100	6	9	9	93.3
250	6	8	9	85.0
500	7	10	8	90.0

TABLA No.25 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (183) HD-73.

CLAVE DE EXTRACTO : (183) HD- 73 AÑO 1971				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. μ g/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	0	0	2	6.7
25	1	1	1	10.0
50	4	0	1	16.7
100	2	1	3	20.0
250	6	0	6	40.0
500	7	7	8	73.3

TABLA No.26 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (471) HD-73.

CLAVE DE EXTRACTO : (471) HD-73 AÑO 1972				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. µg/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	1	0	3.3
10	1	0	0	3.3
25	1	2	0	10.0
50	2	0	0	6.7
100	1	3	0	13.3
250	1	2	0	13.3
500	3	2	0	16.7

TABLA No.27 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (12) HD-183.

CLAVE DE EXTRACTO : (12) HD-183 AÑO 1971				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. µg/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	3	4	6	43.0
25	6	7	10	77.7
50	9	9	9	90.0
100	7	10	10	90.0
250	9	8	10	90.0
500	10	10	9	97.0

TABLA No.28 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (658) HD-73.

CLAVE DE EXTRACTO: (658) HD-73 AÑO 1973				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	1	1	2	13.3
10	1	0	3	13.3
25	0	0	1	3.3
50	0	0	1	3.3
100	1	0	2	10.0
250	0	1	5	20.0
500	1	0	4	16.7

TABLA No.29 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (928) HD-73

CLAVE DE EXTRACTO: (928) HD-73 AÑO 1975				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	1	9	1	36.7
10	0	2	2	13.3
25	0	0	1	3.3
50	0	1	3	13.3
100	0	0	1	3.3
250	1	0	3	13.3
500	---	4	10	----

TABLA No.30 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (705) HD-183.

CLAVE DE EXTRACTO : (705) HD-183 AÑO 1972				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	1	1	0	6.7
10	2	0	2	13.3
25	0	3	2	16.7
50	1	3	2	20.0
100	5	9	5	63.3
250	10	10	---	46.7
500	5	9	---	57.0

TABLA No.31 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (906) HD-183.

CLAVE DE EXTRACTO : (906) HD-183 AÑO 1975				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	1	0	3.3
10	0	1	1	6.7
25	0	0	6	20.0
50	0	0	2	6.7
100	0	2	0	6.7
250	4	4	2	33.3
500	0	6	6	40.0

TABLA No.32 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (540) HD-187.

CLAVE DE EXTRACTO : (540) HD-187 AÑO 1972				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	1	0	0	0.0
25	0	0	0	0.0
50	0	0	0	0.0
100	0	0	0	0.0
250	0	1	1	6.7
500	0	0	2	6.7

TABLA No.33 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (1033) HD-187.

CLAVE DE EXTRACTO : (1033) HD-187 AÑO 1972				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. $\mu\text{g/ml}$ dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	1	0	1	6.7
10	0	1	6	23.3
25	0	4	7	36.7
50	0	0	4	----
100	4	4	10	60.0
250	10	8	10	93.3
500	9	7	10	86.7

TABLA No.34 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (661) HD-187.

CLAVE DE EXTRACTO : (661) HD-187 AÑO 1973				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. μ g/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	1	3.3
10	1	0	0	3.3
25	0	0	0	0.0
50	1	1	2	13.3
100	1	1	2	10.0
250	4	3	2	30.0
500	3	5	8	60.0

TABLA No.35 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (63) HD-203.

CLAVE DE EXTRACTO : (63) HD-203 AÑO 1970				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. μ g/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	1	3.3
10	2	4	6	40.0
25	2	6	7	50.0
50	10	8	5	76.6
100	7	8	10	83.3
250	6	9	10	83.3
500	10	10	10	100.0

TABLA No.36 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento
 y % de Mortalidad Promedio del Extracto
 (310) HD-203.

CLAVE DE EXTRACTO : (310) HD-203				AÑO 1974		% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3			
CONC. µg/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS		MUERTOS		
1	0	2		0	7.0	
10	0	0		5	17.0	
25	0	1		2	10.0	
50	7	6		9	73.3	
100	6	8		9	76.7	
250	10	6		10	86.7	
500	10	10		10	100.0	

TABLA No.37 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento
 y % de Mortalidad Promedio del Extracto
 (820) HD-203.

CLAVE DE EXTRACTO : (820) HD-203				AÑO 1976		% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3			
CONC. µg/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS			
1	0	1	0		3.3	
10	0	0	1		3.3	
25	0	2	0		6.7	
50	0	0	2		6.7	
100	1	1	2		13.3	
250	0	2	4		20.0	
500	5	4	9		60.0	

TABLA No.38 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (13) HD-184.

CLAVE DE EXTRACTO : (13) HD-184 AÑO 1971				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. µg/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	1	0	1	6.7
25	9	0	6	50.0
50	7	4	9	66.7
100	8	5	8	70.0
250	9	9	8	86.7
500	10	9	10	96.7

TABLA No.39 .- Valores de Mortalidad para cada Tratamiento y % de Mortalidad Promedio del Extracto (819) HD-184.

CLAVE DE EXTRACTO : (819) HD-184 AÑO 1976				% DE MORT. PROM.
REPETICION :	1	2	3	
CONC. µg/ml dieta	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	
1	0	0	0	0.0
10	0	1	0	---
25	0	0	0	0.0
50	1	0	2	10.0
100	1	0	0	3.3
250	1	0	1	3.3
500	3	2	0	16.7

TABLA No. 40.- Cuadro de Concentración de Datos del Diseño de Bloques al Azar de la Interacción de Extractos Vs. Concentraciones.

EXTRACTOS DE FERMENTACION	CONCENTRACIONES (ppm de extracto)							
	1	10	25	50	100	250	500	Y(I*)
(1036) HD-1	0	8	3	4	15	16	29	75
(508) HD-1	0	1	4	4	2	5	7	23
(837) HD-1	8	16	25	27	30	30	30	166
(183) HD-73	0	4	3	2	9	15	28	61
(471) HD-73	1	2	5	2	6	4	10	30
(658) HD-73	9	6	1	1	3	10	9	39
(928) HD-73	12	4	2	7	5	10	21	61
(12) HD-183	0	17	28	29	30	30	30	164
(705) HD-183	3	4	8	10	27	29	30	111
(906) HD-183	1	3	7	5	4	14	17	51
(540) HD-187	0	2	0	0	0	2	2	6
(1033) HD-187	2	7	15	9	21	29	30	113
(661) HD-187	1	1	0	5	4	14	21	46
(63) HD-203	1	13	19	25	30	30	30	148
(310) HD-203	2	8	9	21	28	30	30	128
(820) HD-203	1	1	2	3	8	10	20	45
(13) HD-184	0	4	18	23	27	29	30	131
(819) HD-184	0	2	0	3	2	3	5	15
TOTAL.	43	112	155	183	253	324	404	1,474

TABLA No.41.- Cuadro de Medias de Extractos para Prueba de Duncan.

TRATAMIENTOS	SUM-TRAT.	# OBS.	MEDIA
(1033) HD-187	113	7	16.1429
(12) HD-183	164	7	23.4286
(310) HD-203	128	7	18.2857
(63) HD-203	148	7	21.1429
(13) HD-184	131	7	18.7143
(661) HD-187	46	7	6.5714
(658) HD-73	39	7	5.5714
(705) HD-183	111	7	15.8571
(471) HD-73	30	7	4.2857
(928) HD-73	61	7	8.7143
(820) HD-203	45	7	6.4286
(819) HD-184	15	7	2.1429
(906) HD-183	51	7	7.2857
(1036) HD-1	75	7	10.7143
(389) HD-24	61	7	8.7143
(183) HD-73	61	7	8.7143
(508) HD-1	23	7	3.2857
(540) HD-187	6	7	0.8571
(837) HD-1	148	7	21.1429

TABLA No.41a.- Prueba de Duncan para todos Los Extractos en un Diseño de Bloques al Azar.

	0	2	3	4	5	6	6	7	8	8	8	1	1	1	1	1	2	2	2	
	9	1	3	3	6	4	6	3	7	7	7	0	5	6	8	8	1	3	3	
	
	9	1	3	3	6	4	6	3	7	7	7	7	9	1	3	7	1	4	7	
23.7	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	7	5	5	2	0	0
	2	1	0	9	8	7	7	6	5	5	5	3	7	7	5	5	2	0	0	0

	9	6	4	4	1	1	3	4	0	0	0	0	9	6	0	0	6	3	0	0
23.4	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	7	5	4	2	0	
	2	1	0	9	7	7	6	6	4	4	4	2	7	7	5	4	2	0		

	6	3	1	1	9	0	9	1	7	7	7	7	6	3	0	7	3	0		
21.1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	2	2	0			
	0	9	7	6	5	4	4	3	2	2	2	0	5	5	2	2	0			

	3	0	9	9	6	7	6	9	4	4	4	4	3	0	0	4	0			
18.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	2	2	0	0			
	7	6	5	4	3	2	2	1	0	0	0	8	2	2	0	0				

	9	6	4	4	1	3	1	4	0	0	0	0	9	6	0	0				
18.3	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	7	2	2	0					
	7	6	5	4	2	1	1	1	9	9	9	7	2	2	0					

	4	1	0	0	7	9	7	0	6	6	6	6	4	1	0					
16.1	1	1	1	1	1															
	5	4	2	1	0	9	9	8	7	7	7	5	0	0						

	3	0	9	9	6	7	6	9	4	4	4	4	3	0						
15.9	1	1	1	1	1															
	5	3	2	1	0	9	9	8	7	7	7	5	0							

	0	7	6	6	3	4	3	6	1	1	1	1	0							
10.7	9	8	7	6	5	4	4	3	2	2	2	0								
	9	6	4	4	1	3	1	4	0	0	0	0								

	9	6	4	4	1	3	1	4	0	0	0	0								
8.7	7	6	5	4	3	2	2	1	1	0	0									
	9	6	4	4	1	3	1	4	4	0	0									

	9	6	4	4	1	3	1	4	4	0	0									

8.7	7 · 9	6 · 6	5 · 4	4 · 4	3 · 1	2 · 3	2 · 1	1 · 4	1 · 4	0 · 0									
8.7	7 · 9	6 · 6	5 · 4	4 · 4	3 · 1	2 · 3	2 · 1	1 · 4	0 · 0										
7.3	6 · 4	5 · 1	4 · 0	3 · 0	1 · 7	0 · 9	0 · 7	0 · 0											
6.6	5 · 7	4 · 4	3 · 3	2 · 3	1 · 0	0 · 1	0 · 0												
6.4	5 · 6	4 · 3	3 · 1	2 · 1	0 · 9	0 · 0													
5.6	4 · 7	3 · 4	2 · 3	1 · 3	0 · 0														
4.3	3 · 4	2 · 1	1 · 0	0 · 0															
3.3	2 · 4	1 · 1	0 · 0																
2.1	1 · 3	0 · 0																	
0.9	0 · 0																		

TABLA No.41b.- Comparadores de Extractos para Prueba de Duncan.

	0	2	3	4	5	6	6	7	8	8	8	1	1	1	1	1	2	2	2
	0	2	3	4	5	6	6	7	8	8	8	1	1	1	1	1	2	2	2
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	9	1	3	3	6	4	6	3	7	7	7	7	9	1	3	7	1	4	7
23.7	5	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	8	2	4	5	6	7	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	0
23.4	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	2	4	5	6	7	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	0
21.1	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	4	5	6	7	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	0
18.7	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	5	6	7	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0
18.3	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	6	7	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0
16.1	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	7	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
15.9	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	8	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
10.7	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	9	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
8.7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	9	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0

8.7	7 · 0	7 · 0	7 · 1	7 · 1	7 · 1	7 · 2	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0								
8.7	7 · 0	7 · 1	7 · 1	7 · 1	7 · 2	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0									
7.3	7 · 1	7 · 1	7 · 1	7 · 2	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0										
6.6	7 · 1	7 · 1	7 · 2	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0											
6.4	7 · 1	7 · 2	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0												
5.6	7 · 2	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0													
4.3	7 · 2	7 · 2	7 · 2	0 · 0														
3.3	7 · 2	7 · 2	0 · 0															
2.1	7 · 2	0 · 0																
0.9	0 · 0																	

TABLA No.42.- Cuadro de Medias de Concentraciones para La Prueba de Duncan.

TRATAMIENTOS	SUM-TRAT.	# OBS.	MEDIA
1	43	19	2.2632
10	112	19	5.8947
25	155	19	8.1579
50	183	19	9.6316
100	253	19	13.3158
250	324	19	17.0523
500	404	19	21.2632

TABLA No.42a.- Diferencias entre Medias de Concentraciones para La Prueba de Duncan.

	1	10	25	50	100	250	500
500	19.00	15.37	13.11	11.63	7.95	4.21	0.0
250	14.79	11.16	8.89	7.42	3.74	0.0	
100	11.05	7.42	5.16	3.68	0.0		
50	7.37	3.74	1.47	0.0			
25	5.89	2.26	0.0				
10	3.63	0.0					
1	0.0						

TABLA 42b.- Comparadores de Concentraciones para La Prueba de Duncan.

	1	10	25	50	100	250	500
500	5.85	6.16	6.37	6.52	6.64	6.72	0.0
250	6.16	6.37	6.52	6.64	6.72	0.0	
100	6.37	6.52	6.64	6.72	0.0		
50	6.52	6.64	6.72	0.0			
25	6.64	6.72	0.0				
10	6.72	0.0					
1	0.0						

TABLA No.43.- Cuadro de Concentración de Datos de Extractos Vs. Concentraciones Seleccionados.

EXTRACTOS DE FERMENTACION	CONCENTRACIONES (ppm de extracto)			
	100	250	500	Y(I*)
(705) HD-183	21	29	30	80
(310) HD-203	28	30	30	88
(12) HD-183	30	30	30	90
(1033) HD-187	27	29	30	86
(13) HD-184	27	29	30	86
(837) HD-1	30	30	30	90
(63) HD-203	30	30	30	90
Y(*J)	193	207	210	610

TABLA No.44.- Cuadro de Medias de Extractos para La Prueba de Duncan.

TRATAMIENTOS	SUM-TRAT.	# OBS.	MEDIA
(705) HD-183	80	3	26.6667
(310) HD-203	88	3	29.3333
(12) HD-183	90	3	30.0000
(1033) HD-187	86	3	28.6667
(13) HD-184	86	3	28.6667
(837) HD-1	90	3	30.0000
(63) HD-203	90	3	30.0000

TABLA No.44a.- Diferencia entre Medias de Extractos para La Prueba de Duncan.

	(705)	(310)	(12)	(1033)	(13)	(837)	(63)
(63) HD-203	3.33	1.33	1.33	0.67	0.0	0.0	0.0
(837) HD-1	3.33	1.33	1.33	0.67	0.0	0.0	
(13) HD-183	3.33	1.33	1.33	0.67	0.0		
(1033) HD-203	2.67	0.67	0.67	0.0			
(12) HD-184	2.00	0.0	0.0				
(310) HD-187	2.00	0.0					
(705) HD-183	0.0						

TABLA No.44b.- Comparadores de Extractos para La Prueba de Duncan.

	(705)	(310)	(12)	(1033)	(13)	(837)	(63)
(63) HD-203	3.13	3.28	3.05	3.52	3.41	3.45	0.0
(837) HD-1	3.28	3.05	3.52	3.41	3.45	0.0	
(13) HD-183	3.05	3.52	3.41	3.45	0.0		
(1033) HD-203	3.52	3.41	3.45	0.0			
(12) HD-184	3.41	3.45	0.0				
(310) HD-187	3.45	0.0					
(705) HD-183	0.0						

TABLA No.45.- Cuadro de Medias de Concentraciones para La Prueba de Duncan.

CONCENTRACIONES	SUM-CONC.	# OBS.	MEDIA
100	193	7	27.5714
250	207	7	29.5714
500	210	7	30.0000

TABLA No.45a.- Diferencia entre Medias de Concentraciones para La Prueba de Duncan.

	27.57	29.57	30.00
30.00	2.43	0.43	0.0
29.57	2.00	0.0	
27.57	0.0		

TABLA No.45b.- Comparadores de Concentraciones para la Prueba de Duncan.

	27.57	29.57	30.00
30.00	2.05	2.15	0.0
29.57	2.15	0.0	
27.57	0.0		

TABLA No.46.- % de Mortalidad de los Extractos para cada uno de los Bioensayos en Función de la Concentración (ppm. de estándar)

ESTANDAR	Valores promedio de mortalidad para cada concentración (ppm. de estándar)						
	1	5	10	20	30	40	50
1	40	20	40	30	50	100	80
2	70	80	40	60	100	80	80
3	40	40	50	50	50	80	80
4	60	20	60	60	10	60	60
5	10	20	10	40	40	30	60
6	0	0	40	60	70	80	50
7	30	40	50	70	80	60	80
8	10	10	20	60	60	40	60
9	20	50	50	50	80	70	80
10	10	30	40	40	50	70	70
11	10	30	40	90	90	90	100
12	10	30	20	50	60	70	70

TABLA No.47.- Cálculo del Valor de DL₅₀ por Regresión Lineal para el Extracto (13) HD-184 en Función de la Concentración y el Probit de La Mortalidad.

CONC.	Log CONC.	% MORT.	PROBIT
10	1.0000	7	3.5242
25	1.3979	50	5.0000
50	1.6889	67	5.4399
100	2.0000	70	6.5244
250	2.3979	87	6.1264
500	2.6983	97	6.8808

Intercepción = 2.2000

Pendiente = 1.7250

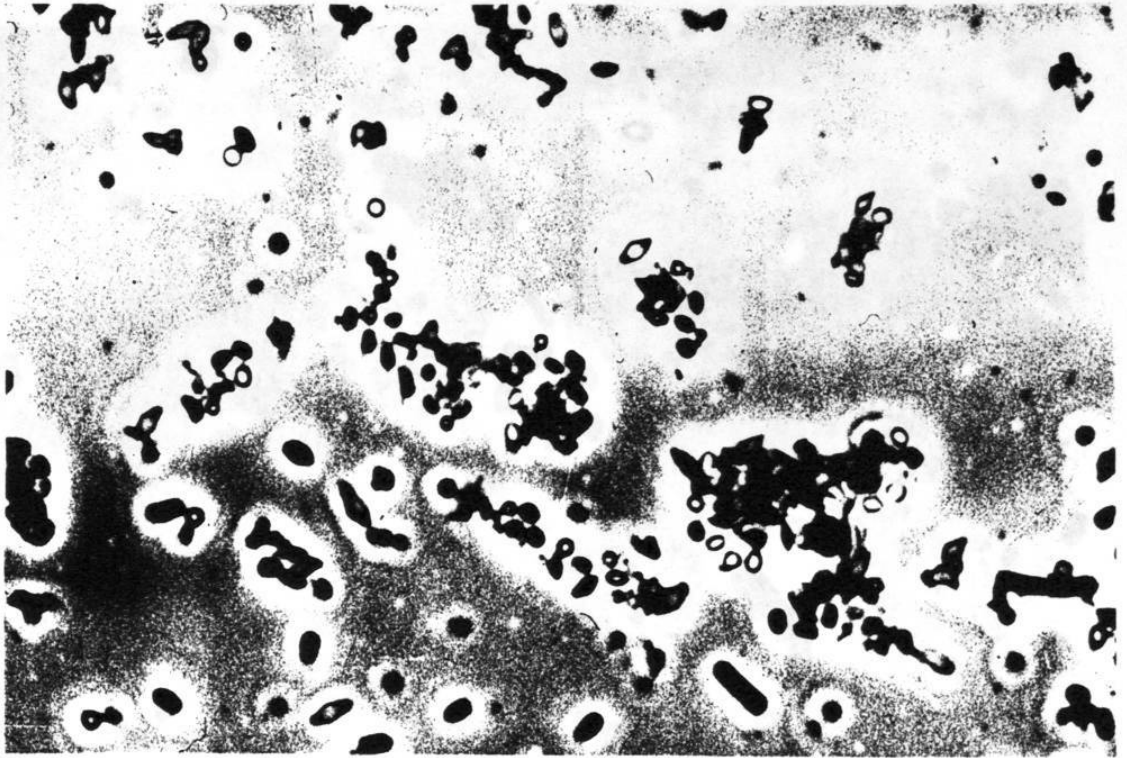
Coef. de Corr.= 0.9619

DL₅₀ del Ext. = 42 ppm.

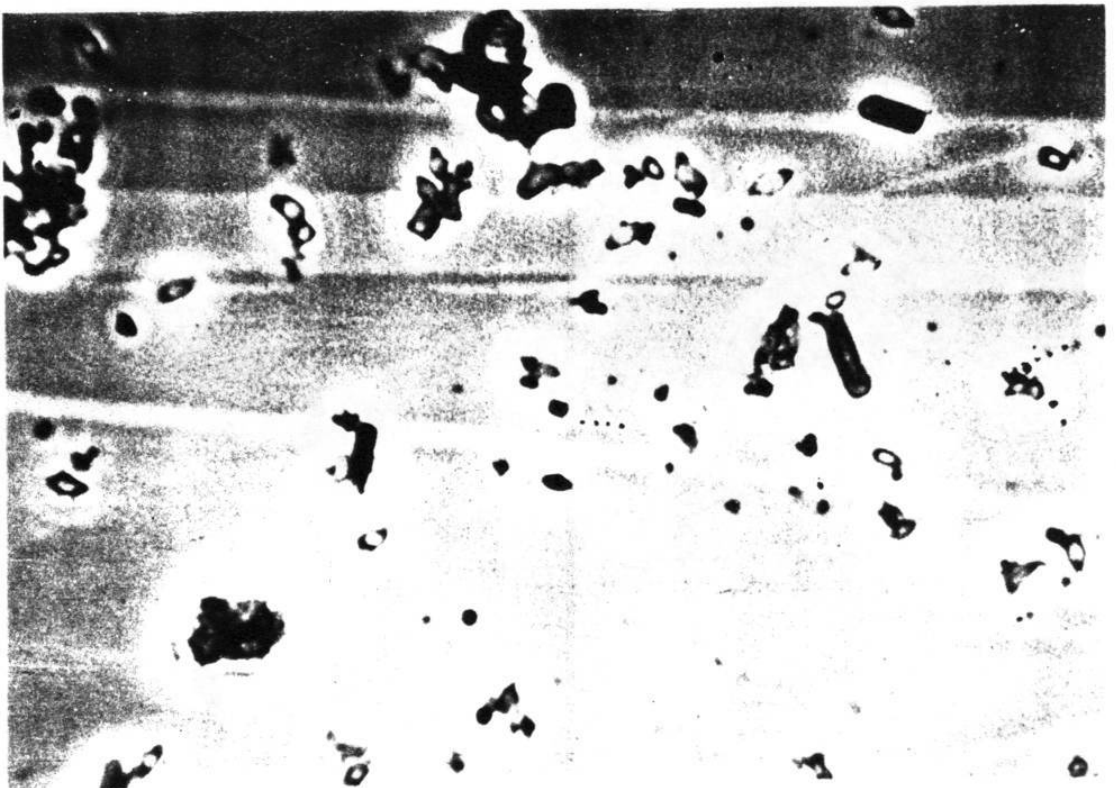
DL₉₀ del Ext. = 232 ppm.

DL₅₀ del Ext. = 21.7 ppm.

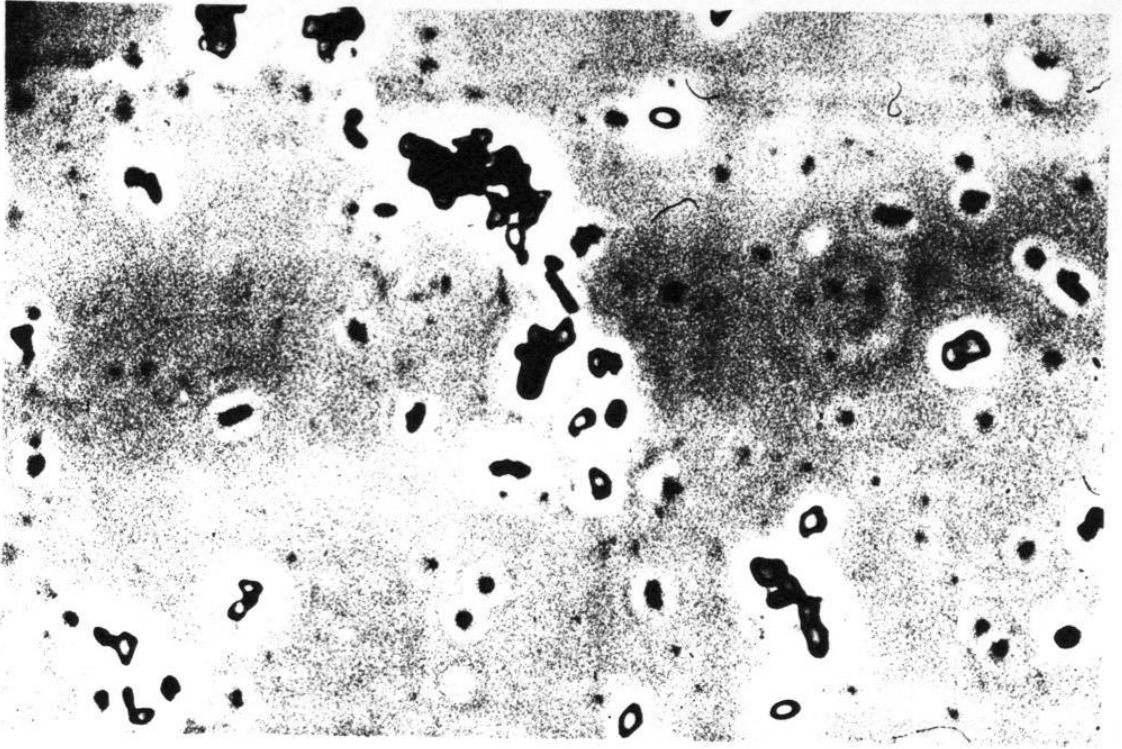
POTENCIA DEL EXT.= 8,267 UI/mg.



Células de B.t. con esporas y cristales.



Cristales proteicos en células de B.t.



Cuerpos paraesporales de B.t.



Formas cristalinas libres de B.t.

FE DE ERRATAS.

PAG 22.- Falta incluir la concentración de 50 ug/ml

PAG 88.- Debe decir DI_{50} Est= 21.7ppm en lugar de
 DI_{50} Ext.

**BIBLIOTECA DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES**

IMPRESA "PEREZ SANTOS"
OBREGON SUR 568
TEL. 14-32-78
SALTILLO, COAHUILA

