

704
168

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS



PRODUCCION Y ENSAYO DE Bacillus thuringiensis
COMO AGENTE ENTOMOPATOGENO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE LUIS RIVERA ORTIZ

1 9 8 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRODUCCION Y ENSAYO DE Bacillus thuringiensis
COMO AGENTE ENTOMOPATOGENO.

" I N D I C E "

I	INTRODUCCION	1
II	TAXONOMIA, BIOLOGIA, IMPORTANCIA Y CONTROL DE <u>Ephestia cautella</u> (Walker).	9
	1. Posición Taxonómica	9
	2. Biología de <u>Ephestia cautella</u>	10
	3. Historia y Morfología	11
	4. Control Químico	13
	5. Control Biológico	14
III	<u>Bacillus thuringiensis</u> (Berliner).	17
	1. Posición Taxonómica	17
	2. Características de las bacterias entomopatógenas del género <u>Bacillus</u>	17
	3. Esporulación	18
	4. Formación y características de la proteína cristal	20
	5. Forma de acción de la proteína cristalina de <u>Bacillus thuringiensis</u>	22
	6. Producción de <u>Bacillus thuringiensis</u>	24
	7. Seguridad en el uso de <u>Bacillus thuringiensis</u>	26
	8. Ventajas y desventajas de su uso	27
	9. Persistencia en el ambiente	29
	10. Control Integrado	30

IV	OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS	33
V	MATERIAL Y METODOS	34
	1. Producción a escala de laboratorio de <u>Bacillus thuringiensis</u>	34
	2. Recuperación y procesamiento del complejo espora-cristal	42
	3. Establecimiento de un insectario experimental	44
	4. Pruebas de infectividad	46
	5. Pruebas de seguridad	48
VI	RESULTADOS Y DISCUSION	50
	1. Medios de cultivo probados para <u>Bacillus thuringiensis</u>	50
	2. Dietas probadas para el desarrollo de la palomilla de la fruta seca <u>Ephestia cautella</u>	55
	3. Pruebas experimentales de la virulencia de <u>Bacillus thuringiensis</u> sobre <u>Ephestia cautella</u>	58
	4. Recuperación de <u>Bacillus thuringiensis</u> de larvas muertas	64
	5. Pruebas de inocuidad de preparaciones de <u>Bacillus thuringiensis</u>	65
VII	CONCLUSIONES	66
VIII	LITERATURA CITADA	68

INTRODUCCION

Desde que el hombre comenzó a desarrollar la agricultura, como el camino a seguir para asegurar su sobrevivencia y con ello su desarrollo social y cultural, ha tenido que sostener una constante lucha contra insectos, roedores y microorganismos, para evitar que dañen su alimento. En escritos antiguos abundan referencias a la depredación por insectos, enfermedades de plantas y diversas contaminaciones de cosechas, e igualmente mencionan algunos principios básicos de agricultura, para evitar los problemas antes mencionados, tales como el barbechado periódico de las tierras, desviación de pestes con sulfuro y la utilización del humo. Más recientemente en el siglo pasado (31), sobreviene un incremento en la utilización de diversas sustancias en la agricultura, siendo de gran utilidad sustancias inorgánicas como el sulfuro de calcio y el sulfato básico de cobre.

Aunque ya se conocían y se usaban algunas sustancias orgánicas en estado de refinamiento muy escaso, no es sino hasta 1940 cuando se inicia el uso generalizado de diversos compuestos orgánicos, los mas importantes de estos descubrimientos fueron el D.D.T. por Muller en 1939, el 2.4.D. Patente Jones en 1945, el hexacloruro de benceno en Inglaterra y Francia y los esterres fosfóricos orgánicos por Schader. Estas nuevas sustancias fueron mucho mas potentes en su actividad biológica que todos sus predecesores, muy rápidamente desplazaron a casi todas las sustancias que hasta entonces se usaban (31).

El uso de plaguicidas en México y en general en todo el mundo,

se ha incrementado debido a la urgente necesidad de elevar la producción agrícola para la exportación y el consumo local.

Existen pocos datos sobre las pérdidas de granos debido a plagas, sin embargo, algunos estudios indican pérdidas del orden del 25 al 30% en el período de poscosecha, otros estudios tanto nacionales como internacionales, nos muestran los altos niveles de pérdidas en granos, algunos de estos datos son los siguientes:

De acuerdo a un reporte de la FAO en 1948, las pérdidas de granos y arroz alcanzaron cerca de 33 millones de toneladas, suficientes para mantener alimentadas a 150 millones de personas durante un año. Se estimó que por lo menos el 50% de esta pérdida se debía a los insectos. En 1950 Ramirez Genel demuestra que en Chapingo, México, se perdió un 30% de maíz cacahuazintle por la infestación de insectos de almacén antes de la cosecha y en Cotaxtla, Veracruz, la infestación de maíz criollo llegó hasta un 71% (38).

En una reunion del Sistema Alimentario Mexicano (SAM) y otras Instituciones dedicadas a la alimentación en México en 1981, se dijo que en México se perdieron 47,000 millones de pesos en alimento de los cuales 9,484 millones de pesos correspondian a pérdidas en granos y cereales, las pérdidas de alimentos para 1982, se predijeron en unos 70,000 millones de pesos. En ese mismo año en una reunión nacional sobre tecnología para producción de proteínas y sistemas modernos de apoyo la CONASUPO aseguró que existía un 10.9% de pérdidas de grano de poscosecha en el país, y que 2.5% de esas pérdidas eran debidas a insectos y microorganismos(39).

En el año de 1979, un año de sequías, heladas y plagas, provocó el que se importaran 10 millones de toneladas de granos básicos. En 1982 la producción de cultivos básicos se redujo en 4.2 millones de toneladas, con respecto a 1981, y las importaciones requeridas en 1983 rebasaron por mucho esta cifra (se importaron 8.3 millones de toneladas), que representa una cantidad de 1,700 millones de dólares para ese año. Además para garantizar el abasto de alimentos en 1984, se financió un crédito para su adquisición que oscilaba entre los 1,500 a 2,000 millones de dólares, de esta forma se aseguró la reserva de granos básicos para 1984, todo lo anterior debido a la insuficiente producción nacional agrícola(31).

En la actualidad se usan un gran número de plaguicidas además de otras medidas para obtener una producción agrícola elevada en las cosechas, sin embargo, el abuso y las deficientes técnicas de su aplicación, causan problemas de contaminación en los alimentos, agua y medio ambiente. Además, el espectro de acción de estos plaguicidas es muy amplio, por lo tanto, no solo ocasionan un efecto tóxico sobre las plagas que se requieran atacar, sino también afectan la flora y la fauna benéfica de tales cosechas. Otro problema, en las poblaciones de insectos, es la resistencia genética que desarrollan a los plaguicidas. Esto hace necesario utilizar el mismo plaguicida en cantidades cada vez mayores o aplicar nuevos productos, quizá más tóxicos. Por lo anterior se debe poner en práctica la actual legislación ambiental para controlar y especificar el uso de plaguicidas.

El promedio de persistencia de la mayoría de los plaguicidas organoclorados es aproximadamente de 3 a 10 años (31). Literatura

reciente revela que el paratión y el diazinón persisten también en el medio ambiente por varios meses. Estudios sobre detección de residuos de pesticidas y sus productos tóxicos en diferentes alimentos, agua, suelo, aire y la concentración de algunos pesticidas en las cadenas alimentarias, han suscitado atención considerable, por el hecho de que algunos plaguicidas se han reportado como cancerígenos y mutagénicos(31).

El hombre deberá buscar diferentes alternativas para poder controlar diferentes plagas que atacan las cosechas y los granos que almacena y también para protegerse y no dañar a la población animal y vegetal que le es útil, así como mantener un medio ambiente lo más puro posible, exento de residuos tóxicos de plaguicidas.

Es necesario también una vigilancia estricta y un monitoreo de diversos residuos tóxicos para una identificación y cuantificación de ellos, para lo cual se requieren estudios más profundos en los cuales se podrían utilizar diversas técnicas bioquímicas (espectrofotometría, cultivo de organismos hipersensibles a plaguicidas, etc.).

Actualmente, en todo el mundo y principalmente en los países con un alto nivel científico y tecnológico la búsqueda de alternativas para el control de plagas forestales, de cosechas o de granos en almacenamiento, es un reto, pero al mismo tiempo una necesidad urgente, dada la enorme cantidad de dinero y alimento que se pierde a nivel mundial. Este nuevo tipo de alternativas se basan en el control físico y biológico de plagas (38,48).

El control físico de plagas se basa en la irradiación durante

diferentes etapas de desarrollo del insecto, y pueden ser los siguientes:

- 1) Rayos Gamma,
- 2) Rayos "X",
- 3) Luz Láser de argón y neón
- 4) Radiación ultravioleta,
- 5) Cambios de temperatura y
- 6) Atmósferas controladas.

El control biológico es sin duda más usado que los métodos físicos, porque tiene muchas formas de aplicabilidad, y la mayoría no requiere de equipos sofisticados de difícil manejo y costo elevado. Algunos de ellos son los siguientes:

- 1) Utilización de enemigos naturales, sean estos parásitos o depredadores, por ejemplo se utilizan himenópteros, nemátodos, hongos o algunos otros organismos.

- 2) Seleccionando variedades de plantas resistentes al ataque de insectos. por ejemplo, seleccionando los granos más duros, con ello el insecto tendrá más dificultad de dañar y penetrar el endospermo.

- 3) Control microbiológico. En este se puede utilizar diversos microorganismos como las bacterias, hongos, protozoarios y los virus.

Plagas de Granos Almacenados

De los 26 órdenes que integran a la Clase Insecta solamente 2 son considerados como verdaderas plagas de importancia económica en los granos almacenados éstos son los coleópteros y los lepidópteros.

El daño que producen los insectos a los granos se ha clasificado en directo e indirecto. El daño directo consiste en la destrucción del grano por el insecto con fines alimenticios o de

oviposición. Por otra parte tanto los cuerpos de los insectos al morir así como sus excretas contaminan al grano haciéndolo inaccesible como alimento, ya que en estas condiciones se pueden desarrollar algunas bacterias patógenas para el consumidor. En algunas ocasiones puede tener un aspecto desagradable y originar pérdidas económicas considerables como en el caso de la seda que producen las larvas de las "palomilla del higo" Ephestia cautella, Walker o la "palomilla indiana de las harinas" Plodia interpunctella, Hubner (39).

El daño indirecto es el producido en el calentamiento del grano por el metabolismo de los insectos, lo cual origina un mal olor debido al desarrollo de microorganismos que se encuentran en un medio favorable de temperatura y humedad para su desarrollo.

Los dos tipos de daño demeritan considerablemente tanto el poder germinativo de las semillas como la calidad y cantidad del grano, inaceptable para el consumo alimenticio o industrial.

También se puede identificar a los insectos por el grado de daño que producen, de esta forma son plagas primarias aquellos insectos que logran romper la cubierta externa del grano y se alimentan de todo el grano o cuando los adultos depositan sus huevecillos sobre el grano y al nacer la larva, ésta lo perfora alimentándose de su interior. Las plagas secundarias son aquellas especies de insectos que se desarrollan una vez que el grano ha sido dañado mecánicamente o por las plagas primarias, generalmente se desarrollan entre las harinas y granos rotos perforados por los insectos primarios (39).

Entre los insectos que atacan a los granos almacenados sólo los

lepidópteros pueden ser controlados biológicamente por medio de la bacteria Bacillus thuringiensis.

La mayoría de los coleópteros, algunos de los que constituyen plagas muy importantes de granos almacenados como por ejemplo Rhizopertha dominica y Prostephanus truncatus, no son susceptibles a la acción patógena de B. thuringiensis.

En la literatura (5,29), se reportan pocos ejemplos de insectos coleópteros susceptibles a la acción de B. thuringiensis, de los cuales ninguno es considerado como una plaga importante. Por lo tanto, el grupo de interés son los lepidópteros. A nivel mundial son más de 100 especies de estos insectos contra los que se han probado diferentes cepas, de B. thuringiensis (incluyendo productos comerciales), obteniéndose resultados mas que aceptables.

Los lepidópteros son plagas de cultivos de cereales, hortalizas; plagas forestales; de granos y productos almacenados.

En México hay más de 20 plagas de insectos lepidópteros con importancia económica. Hay plagas forestales y de árboles frutales por ejemplo Hyphantria cunea, la mayoría son de cultivos de cereales y hortalizas por ejemplo Heliothis zea, Estigmene acrea y Trichoplusia ni (43).

Entre las plagas de granos y productos almacenados con mayor importancia económica en México se encuentran las siguientes:

Especie

Nombre común en México

Sitotroga cerealella

Palomilla dorada de los cereales

Producto que ataca: Arroz, sorgo, maíz, cebada y trigo.

Ephestia kuehniella Palomilla mediterranea de la harina
Producto que ataca: Semillas, nueces, frutas secas y harinas de
cereales.

Ephestia elutella Palomilla del tabaco o del cacao
Producto que ataca: Tabaco, cacao, nueces, cacahuete y harina de
cereales.

Plodia interpunctella Palomilla indiana de las harinas
Producto que ataca: Harinas de cereales, frutas secas, cacahuete
y cereales.

Ephestia cautella Palomilla de la fruta seca
+ Producto que ataca: Cereales, semillas de oleaginosas, higo,
cacao y especias.

TAXONOMIA, BIOLOGIA, IMPORTANCIA Y CONTROL DE

Ephestia cautella (Walker).

1) Posición taxonómica

La palomilla de la fruta seca o palomilla del higo se conoce científicamente con el nombre de Ephestia cautella (Walker) y corresponde a la siguiente clasificación taxonómica (10):

Clase: Insecta
Sub-clase Pterygota
Orden: Lepidóptera
Sub-orden: Frenate (Microlepidóptera)
Super-fam: Pyralidoidea
Familia: Pyralidae
Sub-fam: Phycitinae
Género: Ephestia (= Cadra)
Especie: E.cautella

Según las características observadas, se comprobó por medio de las tablas de clasificación para adultos (Borrór y Delong, 1954) su posición taxonómica dentro de la familia Pyralidae. La clasificación para el género y la especie se basó en algunas referencias; Coronado (10), Imss (23) y Loaiza (29) en los cuales se mencionan las características distintivas de la especie. Para confirmar la clasificación de la especie, también fué identificada personalmente por el M.en C. Mario Ramírez Martínez.

2) Biología de Ephestia cautella

La palomilla adulta rehúye la luz intensa y durante el día reposa en lugares oscuros. Los huevecillos son depositados sobre los costales en donde se encuentran almacenados los granos o los dejan caer por los agujeros entre las fibras de los sacos.

Las palomillas adultas, que no se alimentan, tienen una longevidad de 6 a 12 días y el número de huevecillos que puede poner una hembra varía de acuerdo con su fecundidad, algunas pueden tener hasta 300 huevecillos por postura encontrándose posturas inferiores de 120, 80 y 60 huevecillos(39).

Las hembras ovipositan normalmente dentro de los tres o seis días de haber salido del capullo. La larva se desplaza libremente entre el producto almacenado elaborando gran cantidad de finos hilos de seda que producen apelmasamientos del grano y también lo contamina con sus deyecciones dando un aspecto repulsivo. La larva se alimenta primero del embrión, pero a medida que va creciendo, se alimentara de todo el grano.

Antes de pupar, las larvas salen del producto almacenado arrastrando tras de sí un delgado hilo con el que finalmente teje un capullo de seda, en el cuál se lleva acabo la pupación. Posteriormente la pupa dará origen a un adulto. La vida del adulto dependerá de las condiciones de temperatura y humedad presentes, encontrándose que presentan una longevidad corta (6 a 12 días). Su distribución es cosmopolita(39).

Los productos que son más frecuentemente atacados por este insecto son las frutas secas, nueces, cacahuete, cocoa, higo, arroz, maíz, semilla de algodón y harinas.

3) Historia y Morfología.

La descripción original de Ephestia cautella fue hecha por Francis Walker en 1863 en especies provenientes de Ceilán clasificándola como Pempelia cautella. Posteriormente fue redescrita por Zeller en 1867 de especies provenientes del Cairo, Egipto, clasificándola como Ephestia cahiritella. Subsecuentemente fue redescrita en 1875 por Barret quien la designo con el nombre de Ephestia passulella. Según nomencluras, las especies son ahora reconocidas como Ephestia cautella Walker, con los siguientes sinónimos: E.cahiritella Zell, E.passulella Barr, y E.desuetella Walk. (29).

La siguiente descripción del huevo, larva, pupa y adulto fué hecha por Barret (23,29):

Huevo: es blanquecino cuando es puesto inicialmente, pero se torna en pocos días ocre y frecuentemente justo antes de la eclosión de la larva se pone en parte color naranja. Su forma es oval frecuentemente con un pezón distinguible en una extremidad. La superficie es subopaca fuertemente rugosa, las arrugas longitudinales son gruesas, cortas y arregladas en varias hileras irregulares alternadas, cerca de 24, y con las arrugas transversales más pequeñas, dando una apariencia reticulada.

Larva: de forma cilíndrica, el diámetro del cuerpo es casi seis veces su anchura, generalmente de forma similar a E.kuehniella. Color gris claro, verde pálido o blanco con manchas rosadas sobrepuestas arregladas en hileras longitudinales, mas o menos

definidas sobre la parte dorsal. Superficie muy finamente granulada. Cabeza de color ocre oscureciéndose hacia las piezas bucales. Placa torácica (escudo cervical) de forma similar a la de E.Kuehniella pero más oscura hacia la parte anterior y mucho más oscura tirando al negro hacia la parte posterior. Puntos pilíferos y verrugas parecidas a las de E.Kuehniella, pero todos los puntos son de color negro, más grandes y más visibles. Hileras laterales y ventrolaterales perfectamente visibles, los cuatro pares de hileras presentes en la cara dorsal arreglados en franjas rosadas, con una apariencia obviamente estriada.

Todo el cuerpo pigmentado de un color rosado o sin pigmentación presentando un color blanco; mandíbulas con tres dientes.

Una larva de 10 mm de longitud cuando se extiende mide 12.5 mm y cuando se contrae 8.5 mm .

Pupa: de color claro y mide de 7 a 8 mm de longitud, aproximadamente cuatro veces el largo del ancho.

Adulto: alas anteriores angostas, especialmente en la base. Lóbulo costal con un amplio penacho de escamas. Alas anteriores de color café claro con un tinte amarillento, escamas grandes y gruesas, fácilmente desprendibles. La primera línea transversal es de un tercio de la longitud del ala, de color oscura, bien definida, recta y ligeramente oblicua. La segunda línea es oblicua, y paralela a los dos puntos situados en la región discal, oscura y poco distinguible, con pelillos oscuro amarillentos. Alas posteriores blancas con escamas dispersas oscuras y un tenue margen café, con pelillos blancos. Macho con un penacho de escamas color ocre en la base. Cabeza, antenas, palpos, tórax y abdomen de color oscuro amarillento. Antenas

simples y engrosadas hacia el segmento basal. La expansión alar alcanza de 14 a 20 mm.

4) Control Químico

La palomilla de la fruta seca Ephestia cautella es combatida por diversos insecticidas químicos. Entre los más usados en México podemos encontrar los siguientes:

Malatión: Puede aplicarse en forma líquida o en polvo.

Malatión + Piretrinas: Su aplicación es en forma líquida, y aplicado a muy bajas concentraciones.

* Lindano: El uso de este insecticida es restringido dada su toxicidad, su aplicación deberá ser a muy bajas concentraciones.

Bromuro de metilo: Su aplicación es en forma líquida o gaseosa como fumigante; es utilizado en forma especial para el combate de plagas que atacan el maíz.

Fosfuro de Zinc: Se aplica en forma de tabletas sólidas, en forma general para el combate de diversas plagas que atacan diferentes granos y productos almacenados.

Fosfuro de Hidrógeno (Fosfina): Se aplica en forma de tabletas, seguido después de un cierto tiempo de aplicación, por una aereación total.

* Lindano: 1, 2, 3, 4, 5, 6, Hexaclorociclohexano. Es un compuesto muy tóxico para el hombre, la intoxicación puede ocurrir por ingestión, inhalación o por absorción percutánea. Los síntomas más frecuentes son: vértigos, dolor de cabeza, náuceas,

vómitos, diarreas, convulsiones y un debilitamiento general. Los vapores pueden irritar los ojos, nariz y la garganta. En algunos animales se ha observado daño hepático.

Esta sustancia y sus isómeros han sido enlistados como carcinógenos en "The Second Annual Report on Carcinogens" (35).

Los fosfuros tienen el inconveniente de que dejan residuos tóxicos por lo menos durante 2 o 3 semanas.

En general en la utilización de todos estos insecticidas se deben tener las precauciones pertinentes, para lo cual es necesario que se usen en forma correcta y oportuna. Para su empleo deben consultarse las instrucciones mencionadas en la etiqueta de cada producto, y deben extremar precauciones las personas que lo van a aplicar, teniendo éstas equipo y vestimenta apropiada.

5) Control Biológico

En el combate biológico de Ephestia cautella se han utilizado dos métodos:

1) Producción de variedades de semillas resistentes al ataque de plagas. Este método se utiliza en forma general para proteger a las semillas de diferentes plagas de granos almacenados, pudiendo ser estos lepidópteros o coleópteros. Las variedades de maíz, trigo, frijol y otros granos y semillas, presentan diferente grado de susceptibilidad a las plagas, encontrándose que los granos más duros y de alto contenido proteico son más resistentes.

II) Uso de parásitos o depredadores de E.cautella. En este caso tenemos el uso de virus, bacterias, hongos e insectos (enemigos naturales).

Entre los insectos que se emplean para este tipo de control se puede citar a la avispa Decorquilla canescens, que es en general un depredador de las palomillas (47). Otra avispa muy benéfica es el adulto de Bracon hebetor, que ataca a las larvas. Esta avispa actúa paralizándola a la larva, picándola con su ovipositor varias veces. Los huevecillos son depositados dentro del cuerpo de la larva y cuando emergen las larvitas de la avispa, se alimentan de los tejidos del huésped y por lo tanto este muere (18).

La chinche Xylocoris flavipes previene el incremento de la población pues se ha observado que puede alimentarse de los huevos y las larvas de diferentes especies de palomillas (47).

También se han realizado estudios utilizando diferentes virus, en particular utilizando virus granuloso combinados con la bacteria entomopatógena Bacillus thuringiensis (26).

Otros estudios se han basado en la utilización de ciertos hongos del género Penicillium, para la producción de micotóxicos en contra de especies de lepidópteros de granos almacenados. Los efectos que se han observado ocasionados por estas micotóxicos son: una prolongada pupación, una reducción en la fertilidad y una alta mortandad de larvas (49).

Entre los métodos de control biológico más atractivos está el microbiológico, principalmente el que se basa en el uso de la bacteria entomopatógena Bacillus thuringiensis. A partir de que se comprobó que esta bacteria afecta particularmente a

lepidópteros y dípteros, son muchos los estudios efectuados (15,20,24,42) en los cuales se han reportado excelentes resultados. En particular en el caso de Ephestia cautella, ha quedado comprobada la susceptibilidad de esta plaga a la acción de diferentes cepas de B.thuringiensis (25,33). Esta bacteria ha sido extensamente evaluada en pruebas de laboratorio y en almacenes, demostrando ser efectiva para prevenir infestaciones en granos almacenados, tales como trigo y maíz. Sin embargo, la utilización de diferentes cepas de B.thuringiensis, e incluso la producción a nivel industrial de esta bacteria solamente la realizan los países mas avanzados en el aspecto científico y tecnológico.

En México hay pocos antecedentes, sobre el uso de B.thuringiensis. En la Dirección de Sanidad Vegetal, dependencia de la SARH, se han utilizado insecticidas bacterianos; en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Nuevo Leon, México, existe un grupo trabajando en este campo; además en la Escuela Nacional de Agricultura, en Chapingo, México, se han realizado investigaciones utilizando productos biológicos (29,46). Sin embargo en todos los casos, estos trabajos de investigación se han realizado utilizando preparaciones comerciales de producción extranjera.

Es necesario e importante poder iniciar programas de investigación con el fin de poder desarrollar una tecnología propia y ser capaces de producir pesticidas bacterianos como podría ser el B.thuringiensis, utilizando materias primas de producción nacional, de esta manera poder combatir diversas plagas de lepidópteros, considerados de importancia económica en México.

Bacillus thuringiensis

1) Posición Taxonómica

La bacteria Bacillus thuringiensis (Berliner) se encuentra situada taxonómicamente de la siguiente manera (16):

Clase:	Schizomycetos
Orden:	Eubacteriales
Sub-orden	Eubacteriiaene
Familia	Bacillaceae
Genero	<u>Bacillus</u>
Especie	<u>B.thuringiensis</u>

2) Características de las bacterias entomopatógenas del género Bacillus.

Las especies de este género son células en forma de bastón, algunas veces formando cadenas, capaces de producir endoesporas que les permite permanecer en estado de latencia(20). La mayoría de las especies de este género son versátiles quimiotróficas, capaces de usar un rango considerable de compuestos orgánicos simples. Atacan una gran variedad de sustratos por medio de enzimas, las cuales son excretadas dentro del material circundante a la célula bacteriana. La función de estas exoenzimas es la de reducir los compuestos más complejos a unos más solubles para ser asimilables, y puedan pasar continuamente la pared celular(44).

Aunque la mayoría de las bacterias formadoras de esporas son mesofílicas, con temperaturas óptimas en un rango de 28 a 42°C, el grupo puede incluir un número de especies termofílicas, caracterizadas por una temperatura óptima de 62 a 65°C, e incapaces de crecer en temperaturas menores de 45°C (37).

El término cristalífera ha sido aplicado a un buen número de estas especies que además de la endoespora, producen también una inclusión característica de células que se encuentran esporulando(20). La forma de la inclusión varía considerablemente entre las especies, e igualmente es diferente entre sus variedades. Hannay (19) sugirió el término cuerpo paraesporal para mencionar la inclusión, que puede permanecer junto a la espora, pero en algunas variedades también se ha observado que está separada, y que se forma durante la esporulación.

3) Esporulación

La esporulación es la transición de una célula vegetativa a una espora latente. Este proceso ha sido considerado como el ejemplo más sencillo del proceso de diferenciación celular.

Las esporas son células altamente deshidratadas que se forman en el interior de algunas bacterias, principalmente de los géneros Bacillus y Clostridium, como respuesta a un medio ambiente desfavorable. La formación de esporas normalmente ocurre después de la fase de crecimiento logarítmico, este crecimiento cesa debido al agotamiento de nutrientes, entonces en vez de dividirse, cada célula producirá una espora intracélular llamada endoespora (3).

Las propiedades más características de la espora bacteriana son dos:

I) Su resistencia al calor, a la luz ultravioleta, a los rayos "X", a los disolventes orgánicos, a muchas sustancias químicas y a la desecación. La resistencia de la espora a los tóxicos químicos está en función de la impermeabilidad de la pared de la espora, su resistencia al calor puede deberse a su estado de intensa deshidratación.

II) Es capaz de germinar, es decir, puede volver a su forma vegetativa original de desarrollo, con todas las propiedades originales intactas, cuando se coloca una vez más en un medio favorable. Aunque las esporas libres parece que son metabólicamente inertes, contienen numerosas enzimas potencialmente activas (16).

La morfología de la formación de la espora y de la proteína cristalina está bien establecida. En la figura 1 están representados los 7 pasos que se han descrito como las etapas morfológicas de la esporulación, reconocibles en microscopía electrónica, de Bacillus thuringiensis (1).

Estadio I se forma un filamento axial, y parte de este se destina para la espora. Estadio II se pliega la membrana celular para formar el septo de la endoespora, envuelto por mesosomas. Estadio III hay un crecimiento continuo de la membrana y en el englobamiento de la endoespora, aparece el cristal paraesporal. Estadio IV se caracteriza por la formación de la corteza e incorporación del ácido diaminopimélico a la corteza. Estadio V se inicia la síntesis de la cubierta externa. Estadio VI finaliza

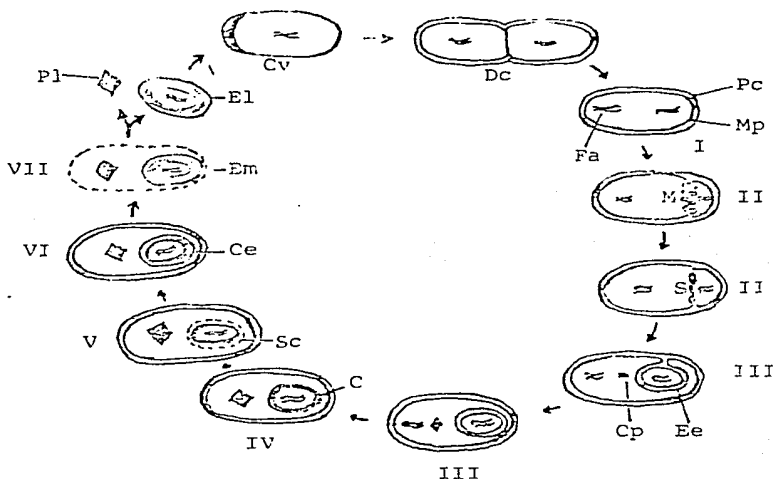


Fig 1. Etapas morfológicas durante el ciclo de vida de Bacillus thuringiensis.

Nota: En algunas cepas de Bacillus thuringiensis la síntesis de la proteína cristalina se lleva a cabo junto a la espora, e igualmente son liberadas conjuntamente, llamándose a ello complejo espora-cristal.

Abreviaturas:

C, corteza; Ce, cubiertas externas; Cp, cuerpo paraesporal ; Cv, célula vegetativa; Dc, división celular; Ee, englobamiento de la espora; El, espora libre; Em, espora madura; Fa, filamento axial; M, mesosomas; Mp, membrana plasmática ; Pc, pared celular; Pl, Proteína cristalina libre; S, septo; Sc, Síntesis de la cubierta.

la síntesis de la cubierta, se forma el exosporio, y la espora alcanza su maduración dentro del esporangio. Estadio VII las enzimas líticas liberan tanto a la espora como a la proteína cristalina.

4) Formación y características de la proteína cristal

La existencia de un cuerpo paraesporal en células de Bacillus thuringiensis durante la esporulación fue notada por primera vez por Berliner en 1915 y Mattés en 1927 quienes realizaron algunas observaciones(37), sin embargo se le dio poca importancia. No fue sino hasta 1953, cuando Hannay redescubrió la inclusión extra-esporal, a partir de aquí le fue dada mayor importancia por conocer su naturaleza y significado. Una vez que se comprobó que el cuerpo paraesporal era un tóxico para lepidópteros, se convirtió en el centro de atención. Se han realizado subsecuentes trabajos no solo para comprobar su patogenicidad en diferentes especies, sino también para conocer la biogénesis y su estructura física (37).

Se ha demostrado que el cuerpo paraesporal o proteína cristal se forma principalmente durante los estadios III y V de la esporulación (27).

Los estudios realizados por Lecadet (27), sugirieron una relación con respecto a las características físicas de la proteína cristal y una fracción de proteína de la cubierta de la espora.

Con la ayuda del microscopio electrónico se ha observado que la proteína cristal es un cristal bipiramidal con estriaciones

paralelas a la base del plano del cristal (1). Pero en algunas especies tiene forma romboide o cuboide.

Norris (37), cita que en la mayoría de las variedades de B. thuringiensis, la formación de la espora y del cristal son seguidas por la lisis de la pared del esporangio remanente, liberándose la espora y el cristal por separado en el medio de cultivo, además se ha confirmado que el cristal esta afuera del delicado exosporium que rodea a la espora.

La proteína cristal es una protóxina; está compuesta de una glicoproteína de un peso molecular de aproximadamente 120,000. Tiene más de un 17% de nitrógeno y cuando menos 18 aminoácidos, pero no contiene fósforo. Los carbohidratos consisten de glucosa (3.8%) y manosa (1.8%). En un pH alcalino la protóxina se solubiliza y se activada por un mecanismo autolítico que involucra una proteasa inherente sulfidrica que activa a la protóxina insecticida (6).

Los cristales se han obtenido en forma relativamente pura, libres de esporas y células vegetativas por diferentes métodos entre los que se incluyen centrifugación diferencial, separación por fluorocarbón e inactivación ultravioleta de la espora en una mezcla de esporas y cristales. Cooksey (8), cita diferentes métodos para la purificación de mezclas de esporas y cristales.

El cristal se tiñe fácilmente con colorantes biológicos y con facilidad se observa con tinciones gram negativas o mediante el microscopio de contraste de fases.

La proteína cristal posee una alta especificidad tóxica a muchas especies de larvas de lepidópteros, debido a que el contenido del

intestino de la larva es en general alcalino, y cuando los cristales ingeridos llegan al intestino se disuelven (13,30).

La viabilidad del cristal esta indicada por el hecho de que las preparaciones secas de esporas-cristales de B.thuringiensis pueden tener una viabilidad aproximada de 10 años (45).

5) Forma de acción de la proteína cristalina de Bacillus thuringiensis.

El efecto de la proteína cristal sobre larvas de lepidópteros ha sido bien estudiado. Heimpel y Angus (20), demostraron parálisis intestinal con una serie de fotografías utilizando rayos "X", en larvas que habían ingerido sulfato de bario y cristales de B.thuringiensis. En general se ha observado una parálisis bucal e intestinal en muchas especies, en algunas otras se ha demostrado una parálisis general del cuerpo, 1 ó 7 horas después de ingerir los cristales, como ocurre en larvas de Bombyx mori (24). Sin embargo se observan otros cambios histopatológicos en el epitelio del intestino, junto con la parálisis intestinal.

Con base en estudios realizados experimentando en diferentes plagas de lepidópteros, se ha llegado a la conclusión de que la forma de acción y la toxicidad de la proteína cristal no actúa de igual manera en las diferentes especies de lepidópteros (7,24).

La actividad tóxica de los cristales se basa sobre ciertas propiedades del contenido intestinal, tales como el pH; la secreción de enzimas proteolíticas; y la presencia de esporas bacilares ingeridas simultáneamente con los cristales (7,30).

De acuerdo a la susceptibilidad específica de cada especie Heimpel y Angus (20), reconocieron 3 tipos principales manifestando síntomas diferentes después de la ingestión de la proteína cristal.

Tipo I representada por Bombix mori, Protoparce sexta, y Colias eurytheme (7,24) las cuales sufren una parálisis general, acompañada por un aumento en la alcalinidad de la hemolinfa, una disminución del pH intestinal y destrucción del epitelio. Se ha demostrado también que la permeabilidad del intestino medio es alterada y la regulación de iones potasio dañada.

Tipo II incluye especies tales como Hyphantria cunea (24), Pieris rapae y Ephestia cautella (33), se ha demostrado que el efecto que produce es una parálisis intestinal. Los cristales son solubles bajo condiciones alcalinas y se disuelven después de la ingestión en el intestino medio de la larva. La parálisis intestinal detiene los movimientos peristálticos causando la obturación del alimento, por lo tanto, la larva no podrá seguir alimentándose; por otra parte, la proteína solubilizada provocará un desprendimiento del tejido epitelial que reviste al intestino, se ha observado que el tejido afectado está formado por 2 tipos de células, las células columnares y las células Goblet (de regeneración) (7,33). Los cristales afectarán también a las sustancias cementantes que mantienen a estas células adheridas a la pared, como consecuencia, el líquido intestinal puede mezclarse libremente con la hemolinfa, observándose una ligera disminución del pH intestinal.

Tipo III se incluyen pocas especies, están representadas por

Ephestia kuehniella y Ostrinia nubilalis (7,20,24), son poco sensibles a la acción de la proteína-cristal por sí sola; no poseen un pH intestinal muy alcalino o no contienen las enzimas necesarias para activar a la protóxina, por lo tanto los cristales sólo nunca causarán reacciones fisiológicas letales. En este caso es necesario la acción combinada de los cristales con las esporas para provocar un efecto letal. Se ha observado que la proteína cristal induce algunos cambios fisiológicos en el intestino de la larva sin causarle efectos nocivos severos, pero sí un debilitamiento y ésto combinado con los cambios mencionados, favorece la germinación de la espora, y el crecimiento de las células vegetativas; la muerte ocurre mas tarde como resultado de la invasión de la bacteria en los tejidos del cuerpo, causando una verdadera septicemia. En estas especies también se administraron solamente esporas y tampoco se han observado efectos letales, por lo tanto se concluye que se requiere la acción combinada de cristales y esporas para provocar la toxicidad (7,33).

Todas las investigaciones histopatológicas indican que el sitio primario de acción de la proteína cristal es la región anterior del intestino medio (8).

6) Producción de Bacillus thuringiensis

La producción en el laboratorio y en la industria de cultivos y preparaciones comerciales, requiere la selección minuciosa de la cepa bacteriana, del medio de cultivo y de las condiciones para el crecimiento bacteriano. Los niveles y formas

de estas sustancias y condiciones dependerán de los procesos de fermentación usados.

El medio de cultivo requiere fuentes de carbono, porque éste es la materia prima para la síntesis del nuevo material celular o productos celulares y para la obtención de energía, fuentes de nitrógeno son necesarias para la síntesis de péptidos y con ello la de proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, elementos minerales como las sales inorgánicas son esenciales para el crecimiento bacteriano, estas incluyen K^+ , Mg^{2+} , P^{5-} , S^{2-} , y en menores cantidades Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , u otros minerales (12).

Los principales factores que influyen el crecimiento bacteriano son el pH, la temperatura, la agitación y la aereación. El crecimiento óptimo de B.thuringiensis, ocurre cerca de un pH de 7, sin embargo dependiendo del tipo del medio de cultivo, el rango de pH puede variar, encontrándose entre pH de 7 a 8. Además tiene un amplio rango de temperatura en la cual la proliferación celular puede ocurrir, la temperatura más usada en los cultivos se encuentra entre 25 y 32°C. La aereación es importante para administrar el oxígeno necesario para las diferentes fases de crecimiento, y mediante la agitación distribuirlo en todo el medio, al mismo tiempo que se está homogenizando todo el contenido (12).

El primer producto comercial fué producido por una firma francesa llamado Sporeine; producido poco antes de la segunda guerra mundial. El Sporeine era un polvo que contenía esporas bacterianas secas y se cree que contenía cristales proteínicos, pero su presencia no fué comprobada, este polvo era mezclado con

un acarreador inerte, la bentonita (36). A partir de este acontecimiento la industrialización de B.thuringiensis, en muchos países del mundo se está desarrollando y también se está obteniendo en muchas presentaciones, sea está como líquidos, suspensiones acuosas, o polvos. Los líquidos son preparaciones muy efectivas pero se ha probado que son menos estables que los polvos secos, los cuales pueden ser almacenados por años sin que pierdan su virulencia (12).

Muchos productos comerciales están ahora disponibles para pruebas de campo, de laboratorio y para su uso práctico; son vendidos por industrias o agencias gubernamentales. Los nombres de los productos y los países que los producen son: Biotrol, Thuricide, Dipel, Baktthane, Agritol y Parasporin de Estados Unidos; Sporeine, Bactospeine, y plantibac de Francia; Bathurin y Bactosporine de Checoslovaquia; Biospor de Alemania; Baktukal de Yugoslavia; Dendrobacillin y Entobakterin de U.R.S.S. (17).

7) Seguridad en el uso de Bacillus thuringiensis

El uso de insecticidas microbianos plantea el problema de la seguridad de las preparaciones que se utilizan. En el caso de B.thuringiensis, aún no se han reportado efectos adversos en el hombre, mamíferos, aves, peces, insectos benéficos o plantas. En pruebas realizadas con diferentes mamíferos, no se ha reportado patogenicidad, aún con preparaciones concentradas (21,45).

En 1956 Steinhaus y Fisher (14,21) iniciaron un trabajo experimental, en la Bioferm Corporation, para producir un insecticida con base en el B.thuringiensis; el Thuricide. Una vez

producido se realizaron pruebas rigurosas en puercos, roedores y voluntarios humanos, para demostrar la inocuidad del insecticida biológico. En una de las pruebas 18 personas se sometieron a un experimento ingiriendo un gramo diario por un lapso de 5 días, posteriormente exámenes físicos y de laboratorio demostraron que no existía ninguna alteración funcional o incapacidad de los individuos que fueron sometidos a la prueba. El análisis de las preparaciones usadas indicó que contenían 3×10^7 esporas viables/gramo (21). En otras pruebas los sujetos inhalaban 100 mg de una preparación por un lapso de 5 días, los resultados fueron negativos (14,21).

Se probó en ratas y ratones la virulencia del Thuricide por vía peritoneal y se encontró que B.thuringiensis permanecía en la sangre de los animales, durante las siguientes 48 horas y desaparecía totalmente a las 72 horas, sin observar efectos nocivos atribuibles al B.thuringiensis (14). En muchas de estas pruebas se utilizaron cerca de 9×10^7 esporas viables/ gramo. En otras pruebas utilizando gallinas y patos, se observó que aún ingiriendo un gramo diario de estas preparaciones durante 23 meses, no se encontraron efectos nocivos. Los peces también han sido sometidos a pruebas con el B.thuringiensis, sin indicios de efectos adversos (21).

B) Ventajas y desventajas de su uso. Heimpel, A.M. (21) y Norris, J.R. (36).

Ventajas:

- 1) Relativamente específica para la especie plaga.
- 2) Los productos son seguros. No dañan al hombre, mamíferos, aves, peces, insectos benéficos o plantas.
- 3) No deja residuos tóxicos.
- 4) Ejerce poca influencia sobre la bioscena.
- 5) No desarrollan resistencia las poblaciones de insectos tratados.
- 6) Las formulaciones tienen buena persistencia bajo condiciones normales, aunque la exposición a la luz solar por más de 3 meses puede inhibir la germinación de la espora.
- 7) La bacteria se puede mezclar con una variedad amplia de aditivos, insecticidas químicos, hormonas de insectos, sin perder su virulencia.
- 8) El costo de las preparaciones, el cual al principio fué muy elevado, ha sido reducido por el desarrollo de los métodos de producción, y es ahora comparable con el gasto que se hace en insecticidas químicos sobre una base de eficiencia-costo.
- 9) Las cepas más virulentas de B.thuringiensis, pueden ser seleccionadas para poder combatir más eficientemente una plaga.

Desventajas:

- 1) La especificidad de B.thuringiensis, es tal que no siempre protege completamente una especie de planta o de grano, contra todos los insectos plaga que lo atacan.
- 2) El tiempo crítico de aplicación en el campo, en algunos casos es determinante, para poder lograr un eficiente control.

- 3) En muchos casos el período efectivo en el campo no es mayor de dos semanas.
- 4) Los productos comerciales importados son caros, lo cual limita los cultivos en los cuales puede ser usado.
- 5) Las preparaciones son venenos estomacales y solamente serán muy efectivos contra insectos que se alimentan activamente.
- 9) Persistencia en el ambiente

El medio ambiente es considerado como la suma de todos los factores externos que influyen en la interacción entre el patógeno y el huésped. Se pueden diferenciar varios factores entre los cuales encontramos a los físicos, bióticos y el habitat, que influyen de manera determinante en la viabilidad de los cristales y las esporas. Se ha encontrado de manera general que las esporas presentan una actividad por períodos más prolongados que los cristales.

Entre los factores físicos determinantes está la temperatura, la lluvia, la humedad, la luz solar, la radiación y el pH. Se ha observado que B.thuringiensis se inactiva rápidamente en suelos con pH menores de 5.1 (15). Se cita una reacción desfavorable sobre 5 variedades de B.thuringiensis, por sustancias volátiles de algunas plantas en el campo (48). También se menciona que en ciertas épocas del año puede existir en el follaje de algunos árboles un compuesto que inhibe la germinación de la espora en el intestino del insecto (32).

En un experimento en el campo Reardon y Haissig (40,41),

utilizaron dos productos comerciales (Thuricide 16B y Dipel 4L), sobre 2 especies de árboles en contra de Choristoneura fumiferana, entre los resultados se encontró que la proteína cristal fué detectada sobre el follaje por un máximo de 16 días y esporas viables se recobraron en el follaje de una de las especies un año después del tratamiento.

La principal ventaja de utilizar este insecticida biológico en el campo, es que no existe el problema de la contaminación ambiental.

10) Control Integrado

Se habla de control integrado cuando dos o más métodos de control son utilizados simultáneamente, estos pueden ser métodos físicos, químicos y biológicos.

Se reportan principalmente el uso de los insecticidas químicos junto con microorganismos, y la combinación de diferentes microorganismos. En el primer caso el control integrado de insectos ofrece la posibilidad de minimizar el severo impacto de los pesticidas en el ecosistema.

Todos estos tipos de combinaciones o interacciones, pueden traer consigo dos diferentes resultados; uno sería el antagonismo, cuando se tiene una reducción en la toxicidad, y el sinergismo cuando aumenta la toxicidad como resultado de la combinación de un insecticida químico y un microorganismo o de la interacción de patógenos (4,26).

I) Combinación de B.thuringiensis con insecticidas químicos.

Se ha observado que los insectos, son más susceptibles a las enfermedades cuando han sido sometidos a algún factor o condición adversa. Por ello la utilización de insecticidas químicos a bajas dosis, podrían facilitar a que los insectos adquirieran enfermedades, o quedaran debilitados y de esta forma sean más susceptibles a la acción de B.thuringiensis (4,14).

Los reportes indican aumento en la mortalidad de insectos cuando se ha utilizado B.thuringiensis y éstos previamente habían sido expuestos a bajas dosis de DDT. Preparaciones de B.thuringiensis pueden ser mezcladas con muchos insecticidas, fungicidas, agentes dispersantes, conservadores y otros coadyuvantes, sin que sufran pérdida importante en su actividad (4,14).

Benz (4), reporta datos sobre mortalidad de diferentes especies de insectos, en los cuales se ha observado sinergismo y antagonismo utilizando preparaciones de B.thuringiensis y diferentes insecticidas químicos.

Se ha determinado que el sinergismo o el antagonismo de algunas combinaciones dependerá más de factores cuantitativos que cualitativos, porque la misma combinación, pero en proporciones diferentes, puede producir efectos antagonistas o sinergistas, o bien, pueden obtenerse resultados positivos en una especie y negativos en otra.

Es importante por lo anterior, experimentar utilizando diferentes combinaciones para encontrar la más adecuada en cada caso y la evaluación la podremos dar con base en el porcentaje de mortalidad observada, considerando el tiempo de la mortalidad, o

por la reducción del daño al medio ambiente.

II) Interacción de B.thuringiensis con otros microorganismos

La mayor parte de los trabajos realizados se han basado en la utilización de B.thuringiensis, en combinación con virus (2,50). Se ha observado que los virus latentes pueden también ser activados por patógenos como B.thuringiensis. Entre los resultados más significativos está el de Shekhrina (1966), reportado por Krieg (26), en el que encontró resultados positivos con una combinación de virus granulosos y B.thuringiensis, utilizados simultáneamente en contra de la palomilla del género Agrotis y probadas en el campo; los resultados obtenidos fueron empleando solamente B.thuringiensis se indujo el 60% de mortalidad, con virus solamente el 75% de mortalidad, y con una combinación de ambos patógenos se produjo el 92% de mortalidad.

Young (49), reporta que utilizando simultáneamente otro tipo de virus (NPV) en combinación con B.thuringiensis se presenta antagonismo cuando las dosis de los virus son bajas. Sin embargo la mortalidad es mayor y más rápida cuando un tratamiento con B.thuringiensis es seguido por la exposición a los virus.

Por lo tanto, la interacción entre microorganismos también nos puede dar efectos sinérgicos o antagonistas, dependiendo de los microorganismos y proporciones utilizadas. La principal ventaja en la utilización de esta combinación es el hecho de que definitivamente ningún problema de contaminación ambiental se ha determinado.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS :

- 1) Establecer un medio de cultivo para Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis cepa ATCC No.10792, que permita su rápido crecimiento y abundante esporulación. Dicho medio deberá estar constituido por nutrientes baratos y de fácil obtención en México.
- 2) Establecer un método para la eficiente recuperación y procesamiento del complejo espora-cristal.
- 3) Establecer un insectario experimental, para el cultivo de la palomilla de la fruta seca Ephestia cautella, con base en una dieta que permita una rápida y abundante reproducción.
- 4) Demostrar experimentalmente que el Bacillus thuringiensis posee gran virulencia sobre Ephestia cautella.
- 5) Constatar la inocuidad de nuestras preparaciones sobre una especie animal (raton albino Mus musculus).
- 6) Evaluar las perspectivas para la aplicación de insecticidas biológicos en México.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo fué necesario solicitar la cepa bacteriana, pero dado que en México no se ha desarrollado la tecnología para la producción de B.thuringiensis no existen colecciones Mexicanas, por lo tanto, se acudió a colecciones extranjeras. Se escribió a las instituciones que las poseen, y algunas de ellas respondieron positivamente proporcionando algunas de sus cepas. La variedad thuringiensis cepa ATCC No.10792, fué enviada por el Dr. Holmberg, A. y Carlberg, G. del departamento de Microbiología de la Universidad de Helsinki, Finlandia.

1) Producción a escala de laboratorio de Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis cepa ATCC No.10792.

Para la mayor comprensión de este capítulo se decidió desglosarlo mencionando todos los medios de cultivo probados pero además se integran algunos resultados con el objeto de que se entienda más claramente la metodología usada.

Se encontró que en la literatura se reportan diversos medios de cultivo, de diferente composición para el crecimiento y esporulación de B.thuringiensis. En algunos medios de cultivo los componentes utilizados son relativamente caros y por tanto, dado que uno de los objetivos es establecer condiciones de cultivo aplicables y rentables a nivel industrial, se decidió establecer y definir varios medios de cultivo en cuya composición se

utilizarán materias primas baratas y producidas en nuestro país; por otra parte, basándose en el hecho de que lo más importante era obtener esporas y cristales de esta bacteria lo más rápido posible y en gran cantidad, se seleccionó el medio modificando tanto los componentes como sus cantidades, hasta encontrarse aquel que ofreciera las condiciones de crecimiento y esporulación deseadas.

Los medios de cultivo seleccionados por sus componentes y cantidades utilizadas son los siguientes:

1) Medio de Lecadet (27). Composición en gs./lt.

Hidrolizado de caseína	5.0 gs.
K_2HPO_4	6.8 gs.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.12 gs.
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.0022 gs.
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.014 gs.
$Fe_2(SO_4)_3$	0.02 gs.
$CaCl_2 \cdot 4H_2O$	0.18 gs.
Glucosa	3.0 gs.

Condiciones de crecimiento y esporulación:

Temperatura 30°C, pH inicial del medio ajustado a 7.2, agitación 200 rpm. Se prepararon 2 matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad, conteniendo cada uno 100 ml de medio. Este medio permitió un rápido crecimiento vegetativo. Al finalizar el proceso de esporulación, se pudo apreciar que la cantidad de esporas y cristales producida en este medio era baja, una

dilución 1:10 de medio recuperado tenía una absorbancia a 540 nm = 0.047, lo cual significa que se obtuvo un bajo rendimiento.

2) Medio de Lecadet + Extracto de levadura.

Se utilizaron los mismos componentes y las mismas cantidades del medio de Lecadet original, pero además se le agregó 2 gs de extracto de levadura. Se decidió agregarle extracto de levadura porque con esto se pensó que se podría obtener mayor crecimiento bacteriano y por tanto obtener mayor cantidad de esporas.

Condiciones de crecimiento y esporulación:

Temperatura 30°C, pH inicial del medio ajustado a 7.2, agitación 200 rpm. Se prepararon 2 matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad, conteniendo cada uno 100 ml de medio.

El tiempo transcurrido desde que se inoculó la bacteria en este medio hasta que se obtuvieron esporas y cristales, fué ligeramente mayor que en el medio de Lecadet original. Se determinó la cantidad de esporas-cristales, midiendo la absorbancia a 540 nm de una dilución 1:10, obteniéndose = 0.069. Comparando este resultado con el anterior, en este segundo medio se presenta un mayor rendimiento de esporas-cristales, pero puede considerarse bajo ya que había sido enriquecido con extracto de levadura.

3) Medio Holmberg (22). Composición en gs./lt.

KH_2PO_4	5.0 gs.
K_2HPO_4	5.0 gs.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 gs.
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03 gs.
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 gs.
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 gs.
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.7 gs.
Harina de soya	30 gs.
Melaza	25 ml.

Condiciones de crecimiento y esporulación:

Temperatura 30°C, pH inicial del medio ajustado a 7.2, agitación 200 rpm. Se prepararon 2 matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad, conteniendo cada uno 100 ml de medio.

Durante el crecimiento se observó una rápida acidificación, obteniéndose un pH de 5.5 y 5.1 después de 24 y 48 horas de crecimiento. Esta condición inhibió la esporulación.

4) Medio de Holmberg modificando su poder amortiguador.

Composición en gs./lt.

K_2HPO_4	10 gs. (medio A) y 15 gs. (medio B).
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 gs.
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.043 gs.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 gs.
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.08 gs.
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5 gs.
Harina de soya	30 gs.
Melaza	25 ml.

Debido a que en el medio de Holmberg original se tuvieron muchos problemas con el control del pH, se decidió aumentar el poder amortiguador del medio, eliminando el fosfato monobásico sustituyéndolo por fosfato dibásico. Con esto, el medio tendría una mayor capacidad para controlar la acidificación producida por la fermentación, durante la fase de crecimiento vegetativo.

Se prepararon dos medios, uno conteniendo 10 gs de K_2HPO_4 (medio A) y otro conteniendo 15 gs de K_2HPO_4 (medio B).

Condiciones de crecimiento y esporulación:

	medio A	medio B
Temperatura	30°C	30°C
pH inicial	7.6	7.7
Agitación	200 rpm	200 rpm

El incremento del poder amortiguador del medio no fue suficiente para controlar la acidificación del medio durante el crecimiento vegetativo.

En esta situación se presentaron 2 alternativas: 1) Aumentar el poder amortiguador del medio añadiendo más fosfato dibásico, ó 2) Disminuir la cantidad de fuentes de carbono y nitrógeno para evitar la producción y acumulación excesiva de ácidos orgánicos. Se decidió ensayar la segunda alternativa debido a que el incremento de fosfato en el medio por arriba de 1.5% provoca una precipitación de sales en el medio.

5) Medio Holmberg, modificando las cantidades de harina de soya y melaza. Composición en gs./lt.

	5A*	5B*	5C*	5D*
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	5.0	5.0	5.0	5.0 (gs.)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	0.05	0.05	0.05 (gs.)
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.043	0.043	0.043	0.043 (gs.)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	0.01	0.01	0.01 (gs.)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.08	0.08	0.08	0.08 (gs.)
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5	1.5	1.5	1.5 (gs.)
Harina de soya	5.0	10.0	5.0	10.0 (gs.)
Melaza	10.0	10.0	5.0	5.0 (ml.)

* El número y letra asignado a cada uno de los medios empleados fué elegido arbitrariamente, con el único fin de diferenciar un medio de otro. Todos presentan las mismas sales, en las mismas cantidades, y se diferencian solamente por las cantidades de harina de soya y melaza empleadas.

Como se sabe durante el crecimiento logarítmico (vegetativo) a partir de las fuentes de carbono (melaza), se liberan al medio gran cantidad de ácidos y mediante las fuentes de nitrógeno (harina de soya), se liberan algunos aminoácidos, haciendo a éste más ácido. Por tanto si se limita al medio de fuentes de carbono y nitrógeno, se obtendría una menor cantidad de ácidos y aminoácidos liberados en él y se mantendría un pH más favorable para que se realizara la esporulación.

De los 4 medios probados, modificando las cantidades de melaza y harina de soya, el que mostró ser el más aceptable con base en los objetivos terminales del presente trabajo, fué el designado como el 5C, que está compuesto de la siguiente forma:

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	5.0 gs.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 gs.
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.043 gs.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 gs.
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.08 gs.
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5 gs.
Harina de soya	5.0 gs.
Melaza	5.0 ml.

Este fue el medio que finalmente se eligió para la producción a escala de laboratorio de Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis cepa ATCC No. 10792. Se decidió utilizar este medio por varias razones:

- 1) Permitió un rápido crecimiento y una abundante esporulación.
- 2) Está constituido por nutrientes baratos, y las cantidades que

se utilizaron de ellos son mínimas.

3) Los componentes del medio pueden adquirirse fácilmente en México y a bajo costo.

Una vez definido el medio de cultivo óptimo para el crecimiento y esporulación de B.thuringiensis, se inició la etapa de producción, recuperación y procesamiento del complejo esporacristal.

Los cultivos se elaboraron en un biofermentador con capacidad máxima de 25 litros, diseñado y construido por el centro de instrumentos de la UNAM. Para iniciar el cultivo, se utilizó un inóculo de 5% en relación al volumen contenido en el biofermentador. El inóculo fué previamente preparado de la siguiente forma: de un vial (frasco conteniendo medio sólido), donde se encuentra en crecimiento el B.thuringiensis, se transfirió a un matraz erlenmeyer de 2 litros de capacidad, conteniendo un litro de medio de Holmberg modificado (5C); la bacteria fue dejada por 14 horas en este medio. Después se procedió a hacer la inoculación transfiriendo todo el contenido del matraz al biofermentador.

El crecimiento logarítmico de esta cepa bacteriana en el biofermentador duro poco más de 6 horas (figura 2). Un problema que se observó en el medio de cultivo, es la formación de espuma durante el crecimiento, esto ocurrió en 2 ocasiones, sin embargo esto fué solucionado añadiendo antiespumante (Antifoam A. Sigma Chemical Co.) a discreción.

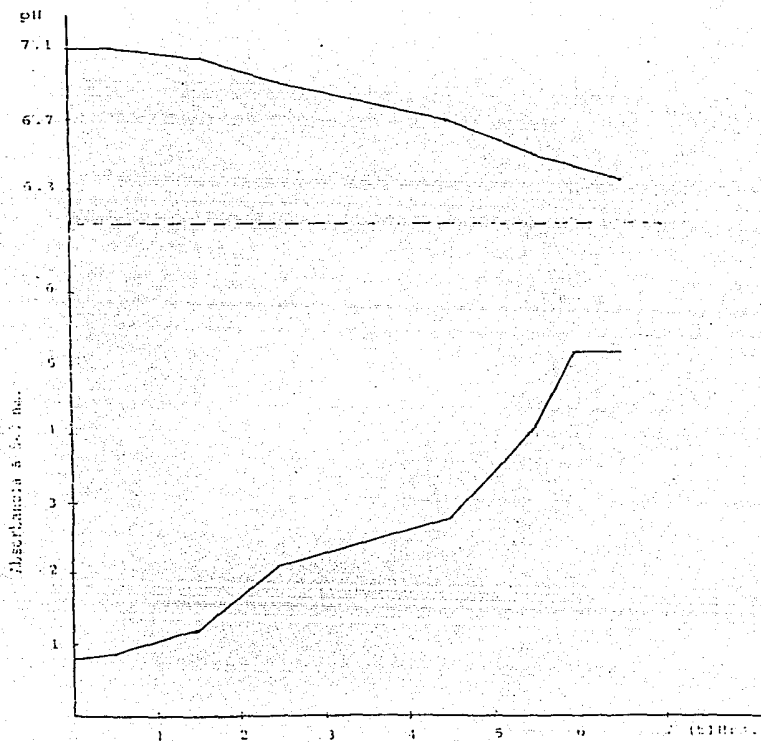


Fig 2. Curva de crecimiento de Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis cepa ATCC No.10792 en medio de Holmberg modificado.

2) Recuperación y procesamiento del complejo espóra-cristal.

Debido a que las esporas y cristales se encuentran en suspensión al final del proceso fermentativo, era necesario recuperarlos y secarlos. Para la recuperación se utilizó una centrifuga de flujo continuo, mediante la cual se recupera la totalidad del material. Para secar las esporas se ensayaron 2 procesos:

A) Secado por lactosa-acetona y liofilización.

B) Secado por liofilización directamente.

El primer proceso (A), se basa en el método sugerido por Dulmage (11), para recobrar el complejo espóra-cristal. El procedimiento para un litro de medio es el siguiente:

Al total de la fermentación ajustar un pH de 7.0 con HCl. Centrifugar a 7,500 rpm por 15 minutos (Rotor GSA). El sobrenadante descartarlo y el precipitado suspenderlo en 75 ml de lactosa al 5%. Agitar de 15 a 30 minutos. Añadir lentamente mientras se agita 4 volúmenes de acetona (300 ml), agitar por 20 minutos. Detener 10 minutos para dejar sedimentar el material. Se filtra en un embudo de separación por succión (a través de 3 capas de papel filtro del #1). El sobrenadante descartarlo y el residuo (filtrado) agitarlo con un pequeño volumen de acetona (50 ml). Filtrar nuevamente en el embudo de separación por succión. Dejar secar toda la noche. Congelar la pastilla obtenida, secarla en la liofilizadora y después se muele en un mortero hasta obtener un polvo gris claro.

En el segundo proceso, las esporas-cristales fueron colectadas por centrifugación a 7,500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se descarta, y el precipitado es secado directamente en la liofilizadora, una vez que estuvo totalmente seca, se recuperó como una pastilla, ésta se trituró en un mortero hasta obtener un polvo café-crema.

En pruebas realizadas posteriormente, se encontró que utilizando esporas-cristales, obtenidos por cualquiera de los 2 métodos, los resultados obtenidos eran muy similares.

2.1) Ventajas de la aplicación del insecticida biológico en polvo.

- 1) Puede mezclarse homogéneamente con el grano a tratar.
- 2) La efectividad es mayor por la penetración de sus partículas.
- 3) No alteran el estado pasivo de almacenamiento del grano.
- 4) El polvo excedente puede aplicarse nuevamente.

3) Establecimiento de un insectario experimental

Para poder experimentar en el laboratorio las preparaciones obtenidas, fué necesario localizar alguna plaga de importancia reconocida, aislarla y establecer un cultivo de ésta con fines experimentales. Finalmente luego de cultivar diferentes especies de palomillas plaga de granos almacenados, se seleccionó a la palomilla de la fruta seca Ephestia cautella, por las siguientes razones:

- 1) Por ser una plaga de importancia económica nacional.
- 2) Por su abundancia en el momento de la colecta en las bodegas de ANDSA.
- 3) Por que con una dieta a base de salvado preparado, se observó una mayor emergencia de esta especie, que cualquier otra especie de lepidópteros de granos almacenados.

En la literatura se reportan diferentes medios de cultivo para esta especie (7,28). Las 4 dietas probadas, para el desarrollo de esta especie, fueron las siguientes:

Dieta	Componentes	Partes
1	Miel de maíz	8
	Harina de trigo	8
	Alimento para perros	4
	Levadura	2
	Miel de abeja	2
	Glicerina	2
	Avena en hojuelas	2
	Germen de trigo	1

Dieta	Componentes	Partes
2	Grano de maíz cacahuazintle	4
	Harina de maíz	1
	Harina de trigo	1
	Maíz duro (toluco)	1
3	Grano de maíz entero	3
	Trigo	1
	Harina de maíz	1
4	Salvado	10
	Glicerina	3
	Extracto de levadura	1

Después de probar varias mezclas, se encontró que una mezcla de salvado, glicerina y extracto de levadura en una proporción 10:3:1 respectivamente, permitía el crecimiento más rápidamente y la mayor reproducción.

Las condiciones de temperatura y humedad relativa, usadas para el desarrollo de esta especie dentro de una cámara de cultivo, en el insectario fueron:

Temperatura de 27 a 29°C, y humedad relativa de 66 a 72% .

4) Pruebas de infectividad

Como se conoce por la literatura, la especie Ephestia cautella es muy susceptible a la acción de diferentes cepas de E.thuringiensis (25,33,34); se ha demostrado el efecto que produce y que se manifiesta en forma de una parálisis intestinal antes de la muerte de la larva. Por consiguiente durante las pruebas de infectividad se trató de observar el comportamiento de la larva durante la experimentación, con el fin de relacionarlo con una posible parálisis intestinal sufrida por ésta.

Una vez que se reunió suficiente material microbiológico y se logró establecer un insectario productivo se procedió a realizar pruebas de infectividad.

Se utilizaron las larvas más jóvenes; para su selección se utilizó un microscopio estereoscópico.

Se realizaron 3 experimentos: el primero se realizó para saber como influía el proceso de secamiento en la potencia de las esporas-cristales obtenidas. Para ésto se prepararon 2 frascos de aproximadamente 800 ml de capacidad, conteniendo cada uno 250 gs de salvado preparado, y 2 gs de una preparación al 5% elaborada con harina de maíz y polvo de esporas-cristales, uno obtenido por el proceso de secamiento A y el otro por el proceso de secamiento B. Se prepararon 2 frascos como control conteniendo 250 gs de salvado y 2 gs de harina de maíz.

Los siguientes 2 experimentos fueron realizados para comprobar el grado de susceptibilidad de E.cautella a diferentes dosis de preparaciones de E.thuringiensis.

Las larvas fueron colocadas en cajas petri de 9 cm de diámetro por 1.5 cm de altura. Para cada experimento se prepararon 5 cajas conteniendo cada una 25 gs de granos de maíz y 0.2 gs de una formulación elaborada con harina de maíz (acarreador), y polvo de esporas-cristales, obtenido por el proceso de secamiento B, en diferentes concentraciones, dando con ello 5 dosis diferentes (10, 5.0, 1.0, 0.5 y 0.1%). Una caja fué el control y contenía únicamente 25 gs de granos de maíz y 0.2 gs de harina de maíz.

Las mezclas de los granos de maíz con la formulación se hizo en las cajas petri, agitándose por 2 ó 3 minutos hasta que quedara visiblemente todo el grano cubierto por el polvo. Hechas las mezclas, se procedió a pasar las larvas a las cajas petri con la ayuda de agujas de disección y pinceles, las larvas colgaban de finos hilos de seda que ellas mismas producían.

El número de larvas utilizadas para los 3 experimentos fué de 395, distribuidas de la siguiente forma:

Experimento	1º	2º	3º
Número de larvas por una dosis	100	15	20
Dosis probadas	1	5	5
Número de larvas en el testigo	50	15	20
Testigos probados	1	2	2
Total de larvas	150	105	140
Número total de larvas utilizadas		395	

La experimentación se hizo en un cuarto con temperatura constante, fluctuando ésta entre 28 y 29°C, y 65 a 70% de humedad

relativa. Las larvas muertas se lavaron y esterilizaron utilizando la técnica de Loáiza (29). Después fueron sembradas en medio sólido, elaborado con agar nutritivo, al final se obtiene como resultado el cultivo y aislamiento del Bacillus thuringiensis; para su identificación se utilizó un microscopio óptico.

5) Pruebas de seguridad

Aunque la literatura nos aseguraba la inocuidad de preparaciones de B.thuringiensis sobre diferentes especies animales y en especial se mencionan varios casos en los cuales se probó en ratas y ratones sin detectar efectos nocivos atribuibles al B.thuringiensis (21,45), se decidió constatar la inocuidad de las preparaciones que se elaboraron y se probaron sobre el ratón albino Mus musculus.

Se elaboró una preparación con una alta densidad de esporas y cristales; 10 gs/200 ml de un jarabe de azúcar (este sirvió como un absorbente de las esporas-cristales). Este jarabe fué preparado en el laboratorio y tenía una concentración de 30% de azúcar. La preparación fué mezclada con el alimento del ratón (nutricubos de Purina), permitiendo una impregnación homogénea y posteriormente se dejaba secar. Este alimento conteniendo una alta densidad de esporas y cristales fue administrado a un grupo de 20 ratones de las siguientes características: hembras jóvenes de ratón albino Mus musculus cepa C-D1.

Los ratones fueron alimentados con la preparación arriba mencionada, por un período de 4 semanas. El desarrollo (peso,

aparición y actividad motora), fué comparado con un segundo grupo de ratones (testigo), que recibió alimento no tratado con esporas-cristales.

Los ratones eran pesados cada tercer día en una balanza granataria, e igualmente se realizaban observaciones de ambos grupos. Estas pruebas de seguridad, se llevaron acabo en las instalaciones del Bioterio, dependencia del Instituto de Fisiología Célular.

RESULTADOS Y DISCUSION

1) Medios de cultivo probados para Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis cepa ATCC No. 10792.

Inicialmente por medio de la revisión de información bibliográfica se elaboró una lista de medios de cultivo para B.thuringiensis. En esta lista se mencionan los componentes y cantidades óptimas para el mejor desarrollo de la bacteria, y se sugiere uno u otro medio dependiendo de la variedad del B.thuringiensis que se quiera cultivar. Después de analizar los medios de cultivo para B.thuringiensis variedad thuringiensis se decidió utilizar dos, el medio de cultivo de Lecadet y el de Holmberg; se realizaron las modificaciones pertinentes hasta que se encontró el que ofreció más ventajas económicas y de producción en el laboratorio.

1) Medio de Lecadet

Se decidió probar este medio porque en la literatura (27), se reporta que este medio fué probado para el crecimiento y la esporulación de B.thuringiensis variedad thuringiensis cepa 1715 de la colección del Instituto Pasteur, obteniéndose buenos resultados con respecto a la esporulación. Dada la similitud de la cepa mencionada anteriormente con la que nos fué donada, se pensó que igualmente podría ser provechoso la utilización de dicho medio de cultivo.

Se determinó la absorbancia a 540 nm de una dilución de esporas-cristales (1:10), obteniéndose un resultado = 0.047, este rendimiento se considera bajo si se le compara con los de otros medios, pues con la misma dilución produce una absorbancia de 0.3 a 0.4 . Por otro lado, al utilizarse glucosa como fuente de carbono, resulta un medio caro si se le quiere emplear industrialmente.

2) Medio de Lecadet + Extracto de levadura

Se determinó la cantidad de esporas-cristales, midiendo la absorbancia a 540 nm de una dilución de esporas-cristales (1:10), lográndose una absorbancia = 0.069 . Este resultado indica que se tuvo un aumento en la cantidad de esporas-cristales obtenidos si se compara con el medio de Lecadet original; pero no fué un aumento importante si se le confronta con el rendimiento alcanzado regularmente con otros medios, por lo tanto se concluye que el rendimiento fué bajo. Además, el uso de glucosa así como el extracto de levadura hacen que este medio sea aún más caro que el original, y en consecuencia tampoco sería costeable.

3) Medio de Holmberg

Se decidió usar el medio de cultivo que es sugerido por Holmberg (22) para esta cepa bacteriana. Cabe mencionar que este medio de cultivo fué empleado por este investigador para otros fines experimentales, no reportando datos acerca de la esporulación. Dentro de las condiciones experimentales que

usaron, sugieren utilizar de 0 a 40 gs/lit de fuentes de carbono y de 20 a 60 gs/lit de fuentes de nitrógeno. Partiendo de estos datos se supuso que el crecimiento y la esporulación sufrirían alteraciones dependiendo de las cantidades usadas de harina de soya y melaza.

Las primeras cantidades de harina de soya y melaza empleadas para este medio, fueron elegidas al azar, pero respetando el rango sugerido por los autores del medio.

En este medio no se pudo realizar la esporulación debido a que el pH se tornaba ácido rápidamente. En 24 horas descendió de 7.2 a 5.2 por lo que se procedió entonces a elevar el pH del medio agregándole NaOH, hasta que llegó a 6.5. Se esperaba que con esta modificación la bacteria esporulara, sin embargo, después de 24 horas, la bacteria aún no había esporulado y nuevamente el pH del medio decreció a 5.5. En esta ocasión se decidió mantener a la bacteria en este pH ácido por otras 24 horas, al terminar este período de tiempo se midió y se encontró que este descendió aún más siendo de 5.1, no encontrándose esporas libres en el medio.

4) Modificación al medio de Holmberg incrementando su capacidad amortiguadora.

Para controlar el descenso del pH en el medio, se decidió incrementar la capacidad amortiguadora de éste. Inicialmente en los 2 medios preparados, 4A y 4B (ver métodos), no se les ajustó un pH de 7.2 como había ocurrido anteriormente con el medio de Holmberg original, sino que ambos fueron inoculados teniendo un pH básico, con ello se buscaba que aunque descendiera el pH, éste

no fuera tan ácido y por lo tanto más favorable para que se realizara la esporulación.

A pesar de haber aumentado el poder amortiguador del medio, eliminando el fosfato monobásico y agregarle mayor cantidad de fosfato dibásico no se logró controlar la rápida disminución del pH. Por otro lado, tampoco fué la solución dejar a los medios con su pH inicial puesto que nuevamente después de 48 horas, el pH descendía por debajo de los valores permisibles para la esporulación. Los resultados obtenidos de los cambios de pH después de 24 y 48 horas, fueron los siguientes:

Medio	pH inicial	24 horas	48 horas
4A	7.6	6.1	5.4
4B	7.7	6.2	5.6

Dados los resultados obtenidos, se disminuyeron las cantidades de las fuentes de carbono (melaza), y de las fuentes de nitrógeno (harina de soya), para evitar la producción y acumulación excesiva de ácidos orgánicos que influyen drásticamente en el pH del medio.

5) Modificación al medio de Holmberg variando las cantidades de harina de soya y melaza.

Los cambios de pH en los medios de Holmberg probados anteriormente, son un factor limitante para la esporulación, por lo tanto, basándose en que los autores sugieren rangos en las

proporciones en las cuales se puede utilizar las fuentes de carbono y nitrógeno, se decidió probar 4 medios en los cuales se usaron cantidades limitadas de estos componentes, y se escogió el más aceptable tomando en cuenta que las fuentes de carbono y nitrógeno fueran las mínimas pero suficientes para que el crecimiento vegetativo de la bacteria sea aceptable y al mismo tiempo se realice la esporulación en una alta proporción de la población.

Los resultados obtenidos en cada uno de los 4 medios fueron los siguientes:

Medio 5A: Después de 48 horas se observaron foresporas y después de 72 horas la mayor parte del cultivo presentaba esporas.

Medio 5B: Después de 48 horas se observaron sólo células vegetativas y después de 72 horas algunos esporangios presentando su endoespora.

Medio 5C: Después de 48 horas se observaron esporas libres bien definidas en todo el cultivo. Este medio, comparado con los otros tres, permitió un rápido crecimiento y la esporulación se realizó en un menor tiempo, obteniéndose finalmente una abundante esporulación.

Medio 5D: Después de 48 horas se observó un cultivo asincrónico, ésto es, que en ese momento se encontraron tanto esporangios en diferentes estadios de la esporulación como algunas esporas libres.

2) Dietas probadas para el desarrollo de la palomilla de la fruta seca Ephestia cautella.

Dentro del insectario se observó el desarrollo de esta especie. De una manera general el ciclo de vida, bajo condiciones óptimas, según observaciones personales es como sigue:

Huevo : de 3 a 6 días
Larva : de 21 a 35 días
Pupa : de 6 a 19 días
Adulto : de 6 a 12 días

Condiciones de temperatura y humedad relativa para su desarrollo.

	Mínima	Máxima	Optima
Temperatura en °C	15	38	28
% de Humedad relativa	48	90	70

Cuando se hizo la colecta de Ephestia cautella en las bodegas de ANDSA, la especie fue proporcionada en recipientes de vidrio los cuales contenían maíz, siendo este su único alimento.

Se detectó que el uso del maíz como su único alimento, no era suficiente para obtener una población abundante. Se buscó dentro de la literatura dietas sugeridas para esta especie, hasta que finalmente se encontró y comprobó, una dieta de salvado preparado como la más eficaz para obtener buen número de organismos de E.cautella.

Antes de iniciarse los cultivos de esta especie, se seleccionó

la etapa de desarrollo del organismo, con el fin de tener diferentes cultivos, en los cuales se tuvieran a los organismos lo más sincrónizados posibles. De esta forma se iniciaron cultivos con larvas de primeros estadios, con larvas de estadios intermedios, con larvas de estadios finales y con adultos únicamente. Así se trató de asegurar que en el momento de iniciar las pruebas de toxicidad, las larvas seleccionadas presentaran prácticamente la misma edad de desarrollo.

Se probaron 4 dietas, los resultados obtenidos en cada una fueron los siguientes:

Dieta # 1: por los componentes que contiene es considerada como la más nutritiva, por lo que se desarrollaron gran cantidad de larvas y adultos de E. cautella. Sin embargo tiene 2 desventajas: 1) Es una dieta muy costosa y 2) La mezcla final que se obtiene es una masa pegajosa que dificulta la recuperación de las larvas, éstas se introducen dentro de la masa y es muy difícil sacarlas, cuando se intenta obtenerlas se corre el riesgo de dañarlas.

Dieta # 2 y # 3: son fácilmente elaborables, tienen bajo costo, y las larvas se pueden recuperar sin dificultad, pero el inconveniente está en el desarrollo de la palomilla, observándose que el rendimiento de larvas y adultos es muy bajo.

Dieta # 4: está resultó ser entre las 4 dietas probadas para el cultivo de esta especie como la más ventajosa. Entre las principales ventajas tenemos:

- 1) Su elaboración es fácil.
- 2) El número de componentes son pocos, y el precio de ellos barato, excepto el extracto de levadura, pero sólo se requiere 1/14 parte del total para esta dieta.
- 3) El desarrollo de larvas y adultos es constante, y se obtienen en cantidades aceptables.
- 4) Las larvas pueden recuperarse fácilmente.

3) Pruebas experimentales de la virulencia de Bacillus thuringiensis sobre Ephestia cautella.

Se ha demostrado en estudios realizados en forma general, que la susceptibilidad de una especie lepidóptera a la acción del B.thuringiensis, en mucho dependerá de la cepa (24,34). Se ha observado que la dosis letal media (cantidad necesaria, de cristales ó cristales y esporas, para matar sólo el 50% de la población), puede variar enormemente entre una y otra cepa (25).

En la literatura no se encontraron reportes de trabajos en los cuales se mencione el uso de la cepa ATCC No.10792 en contra de E.cautella, de ahí que se decidió utilizar esta cepa, probarla y concluir si realmente se puede utilizar como una solución para el combate de esta plaga de importancia económica en México.

Experimento # 1. Evaluación de los métodos de secado empleados para obtener el complejo spora-cristal.

La recuperación del complejo spora-cristal mediante la centrifugación de flujo continuo, fué muy eficiente recuperándose la totalidad del material celular. Se obtiene aproximadamente 6.5 gs por cada litro de medio preparado (peso humedo), y después del proceso de secamiento se tiene de 0.9 a 1.0 gs de esporas-cristales en polvo (peso seco).

Debido a que se utilizaron 2 métodos de secamiento de esporas-cristales, se decidió comprobar si el método A (por lactosa-acetona-liofilización) podría dar preparaciones con mayor virulencia en contra de esta especie. Se Pensó que podría ser

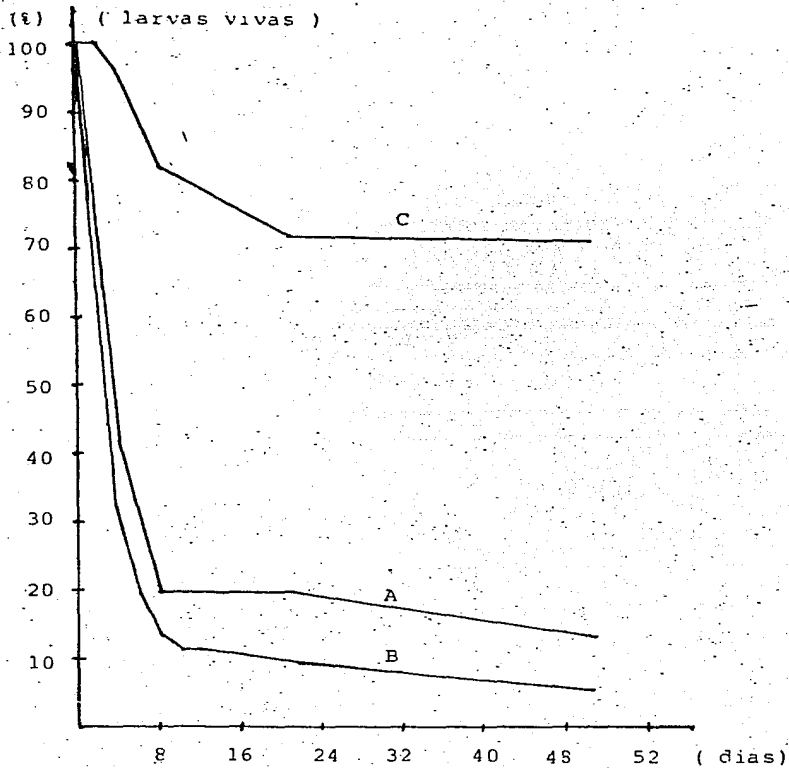


Fig 3. Comparación de la toxicidad de polvo de esporas-cristales, obtenidos por 2 diferentes procesos de secamiento.

Abreviaturas:

- A: Secado por lactosa-acetona-lio-filización.
- B: Secado por lio-filización directa.
- C: Control (sin esporas-cristales).

factible, con base a lo reportado por Dulmage (11), quien utilizando este método pudo obtener el complejo espora-cristal, lo más puro y sin perder la virulencia.

Los resultados obtenidos (figura 3), muestra una pequeña diferencia entre uno y otro método.

Se observó que utilizando el método B (liofilización directa), la virulencia de una preparación al 5% es ligeramente mayor que una preparación al 5% obtenida por el método A.

Después de 50 días de este tratamiento, de las larvas que fueron sometidas a la preparación obtenida por el método B, se produjo la emergencia del 6% de adultos, y las que fueron sometidas a la preparación obtenida por el método A produjeron la emergencia del 14% de adultos. Por otra parte en el control se pudo observar una emergencia de adultos del 72% .

Experimentos # 2 y # 3. Susceptibilidad de Ephestia cautella a la acción de preparaciones de esporas-cristales de Bacillus thuringiensis.

La elaboración de las dosis para estos experimentos fue de la siguiente manera:

Concentración	Polvo de esporas-cristales	Harina de maíz
10.0%	20 mg	180 mg
5.0%	10 mg	190 mg
1.0%	2 mg	198 mg
0.5%	1 mg	199 mg
0.1%	0.2 mg	199.8 mg

Experimento # 2

En el experimento anterior (# 1) se hizo una comparación con base en una sólo preparación (dosis al 5%), en la cual se pudo comprobar la alta virulencia de está dosis; sin embargo, sabemos que conforme aumenta la concentración de esporas-cristales la virulencia deberá ser mayor, por tanto se decidió elaborar preparaciones de esporas-cristales a diferentes concentraciones y probarlas sobre larvas de E. cautella.

Estas preparaciones fueron elaboradas con las esporas-cristales obtenidas por el método B. Se utilizaron éstas porque la virulencia es un poco mayor y porque prácticamente sería más fácil, más rápido y más costeable obtener esporas-cristales por este método.

Basados en amplios antecedentes en los cuales se menciona que las larvas más jóvenes son las más susceptibles de control (8,42) se decidió comprobar experimentalmente dicho efecto.

Este experimento se inició con 15 larvas para cada uno de los 5 tratamientos y 2 de control.

Los resultados indicaron que el efecto de las preparaciones es más letal en los primeros días de desarrollo de la larva (figura 4): Se observó que todas las larvas que sobrevivían hasta el 9º día, llegaban vivas hasta el 15º día de experimentación (fin del tratamiento), excepto una larva de la caja experimental con la dosis al 1%, la cual murió al 13º día.

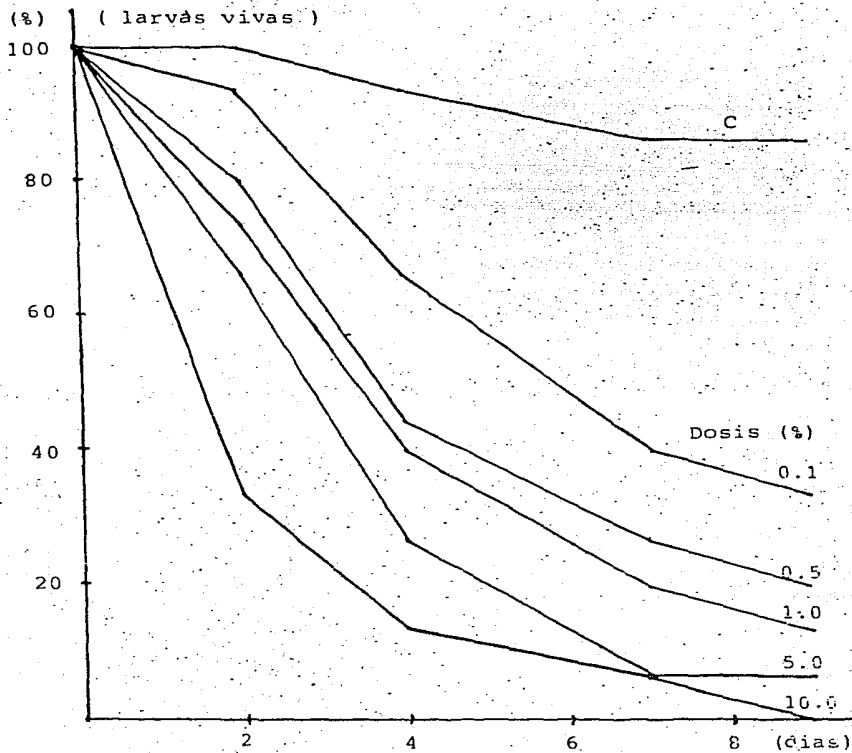


Fig 4. Virulencia de Bacillus thuringiensis sobre Ephestia castella, utilizando 5 doses diferentes (Iniciado con 15 larvas).

Experimento # 3

En los cultivos de Ephestia cautella se pudo obtener una mayor cantidad de larvas jóvenes, iniciándose las pruebas de toxicidad con 20 larvas en cada uno de los 7 lotes; 5 experimentales y 2 de control.

En las figuras 5 y 6 se puede observar el porcentaje de mortandad obtenido para cada una de las dosis probadas. Las preparaciones de esporas-cristales con las dosis al 10, 5 y 1% evitaron la proliferación de E. cautella. Con la dosis al 0.5% solamente emergió el 5% de los adultos, esto es, sólo una larva alcanzó el estado adulto. Con la dosis al 0.1% se determinó que fué la menos efectiva para evitar la proliferación de adultos, teniendo al final el 35% de adultos.

Las figuras 4 y 5 se complementan para reforzar la idea de que las larvas más jóvenes son las más susceptibles de control. Se puede observar claramente que en todos los casos las preparaciones de esporas-cristales evitaron la proliferación de E. cautella, matando a las larvas en los primeros días de desarrollo. Es muy notable el gran efecto tóxico que se presenta en los primeros 7 días de experimentación, después de esta fecha se observó que una gran parte de las larvas sobrevivió, principalmente las encontradas en lotes con las dosis más bajas; sin embargo, ésto no significa que hayan adquirido resistencia hacia las preparaciones de esporas-cristales, sino que esto está relacionado con cambios fisiológicos intestinales que sufre la larva conforme ésta se va desarrollando y que no son favorables para la germinación de la espora.

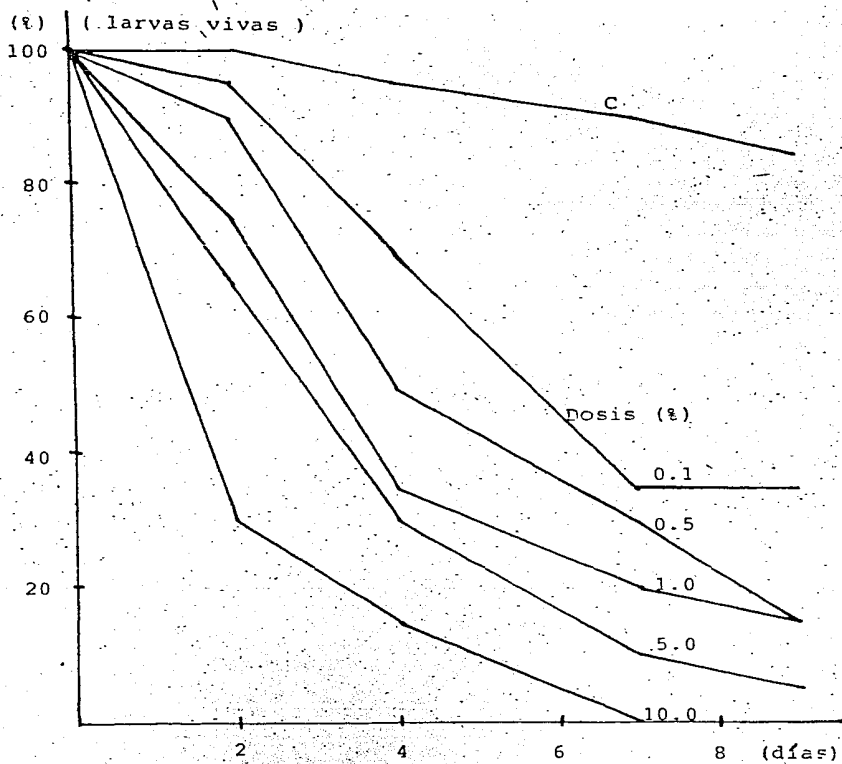


Fig 5. Virulencia de Bacillus thuringiensis sobre Ephestia castellé, utilizando 5 dosis diferentes. (Iniciada con 20 larvas).

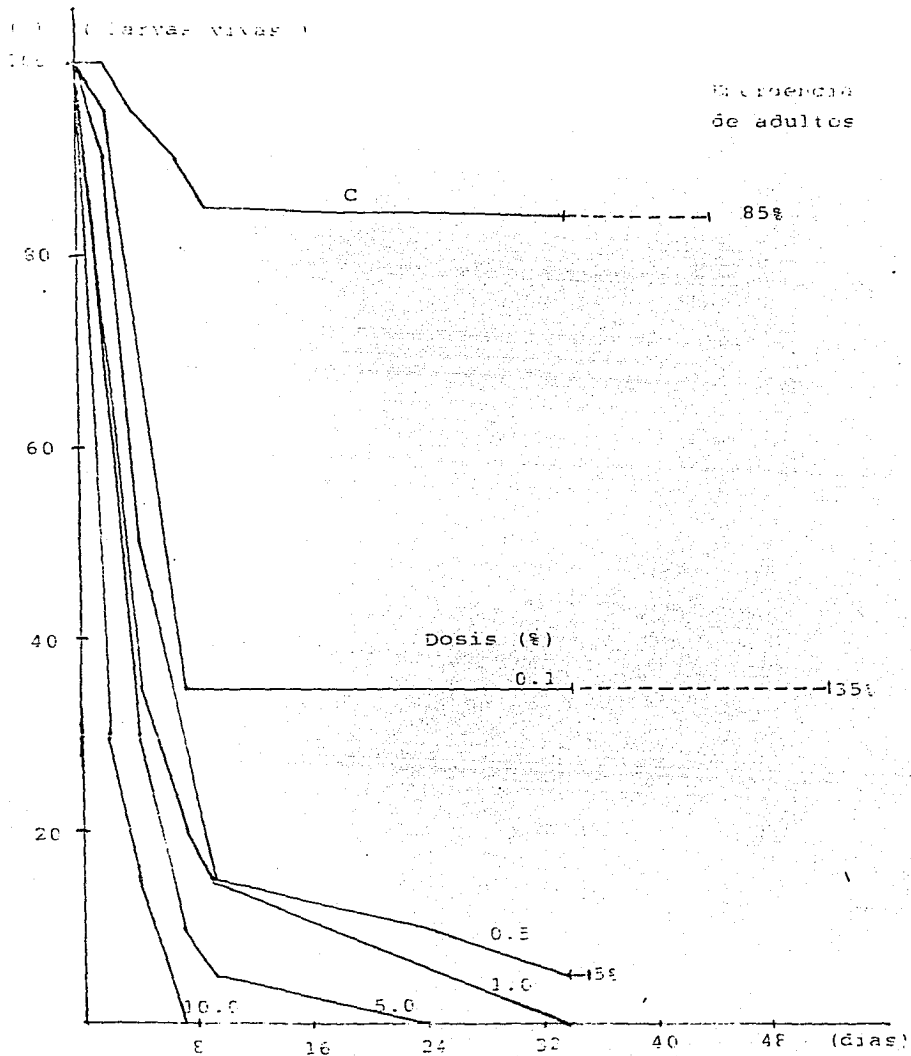


Fig. 4. Virulencia de *Bacillus thuringiensis* sobre *Ephestia cautella*, utilizando 5 dosis diferentes, durante 50 días de tratamiento (Iniciado con 20 larvas).

B. THURINGIENSIS (SPO.)

CONTROL



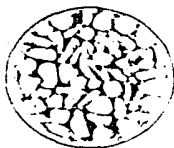
0.1%



0.5%



1%



5%



10%

Fig 7. Evaluación del daño causado por la palomilla de la fruta seca Ephestia cautella, sobre el maíz.

En la caja control, no protegida con preparaciones de esporas-cristales, se observa que el maíz fué intensamente dañado. En las cajas experimentales se observa que el daño en el maíz disminuye conforme aumenta la concentración de preparaciones de esporas-cristales.

En la figura 7 se muestra claramente que después de 2 meses de almacenamiento, el recipiente control no protegido con preparaciones de esporas-cristales muestra un daño intenso; en los experimentales protegidos el daño es mucho menor en los que se les protegió con baja densidad de esporas-cristales (dosis al 0.1, 0.5 y 1.0%); y no hay daño significativo en los protegidos con alta densidad de esporas-cristales (dosis al 5.0 y 10.0%).

La figura 6 podría servir como base para escoger la dosis mas conveniente. Si se quiere obtener el 100% de mortandad de la plaga se recomienda usar las dosis al 10.0, 5.0 y 1.0% pero el tiempo requerido para alcanzar este porcentaje es variable dependiendo de la dosis usada. La dosis al 0.5% no es tan efectiva sin embargo, si asegura que sólo una pequeña parte de la población llegará al estado adulto. Estas 4 dosis mencionadas (10.0, 5.0, 1.0 y 0.5%) aseguran excelentes resultados a corto plazo sin embargo, si por alguna razon algunos adultos emergieran y pusieran huevecillos al momento de emerger estas larvitas, si aún se mantiene el polvo de esporas-cristales, serían bastante susceptibles a la acción del insecticida biológico, por tanto también podría usarse como un control a largo plazo.

En la tabla # 1 se reunen los resultados de los experimentos # 2 y # 3. En esta tabla se compara el porcentaje de mortandad obtenido hasta el 9º día de experimentación, por que es hasta este día, en el cual el efecto tóxico aún alcanza a manifestarse significativamente. La comparación de ambos experimentos muestra claramente la confiabilidad de los resultados.

Tabla # 1

Resultados de la mortandad en larvas de Epehestia cautella, después de 9 días de estar sometidas a diferentes dosis de esporas-cristales de Bacillus thuringiensis.

	Exp. # 2 (iniciado con 15 larvas)	Exp. # 3 (iniciado con 20 larvas)
Dosis (%)	No. de larvas muertas (%)	No. de larvas muertas (%)
10.0	15 (100)	20 (100)
5.0	14 (93.4)	19 (95)
1.0	13 (86.6)	17 (85)
0.5	12 (80.0)	17 (85)
0.1	10 (66.6)	13 (65)
Control	2 (13.3)	3 (15)

Si se toma en cuenta que las dosis fueron ensayadas sobre 25 gs de granos de maíz, al extrapolar esta relación se tiene que para cubrir la totalidad del grano por tratar y lograr mayor efectividad en el control de la plaga, se requiere de 8 Kg de polvo para una tonelada de granos de maíz

Estos resultados son únicamente válidos para la especie Ephestia cautella, sin embargo, la susceptibilidad de cualquier otro lepidóptero, sea o no plaga de granos almacenados, a la acción del Bacillus thuringiensis puede variara ampliamente. Igualmente la susceptibilidad de E. cautella a la acción de cualquier otra variedad que pertenezca a la especie B. thuringiensis puede ser mayor o menor dependiendo de la variedad y la cepa.

4) Recuperación de Bacillus thuringiensis de larvas muertas.

Para poder recuperar el patógeno, se utilizó la técnica sugerida por Loaiza (29):

Se lavan las larvas durante 2 ó 3 minutos en $HgCl_2$ (solución 1:1000), y después en agua esteril por el mismo tiempo. Se elaboran 2 lotes, uno con larvas maceradas y otro con larvas enteras. Se siembran en cajas petri en un medio sólido de agar nutriente, se hacen estrias con las larvas maceradas y se depositan sobre el medio las larvas enteras.

Después de 24 horas se realizan observaciones. En el lote con larvas maceradas había colonias grandes, blanquecinas como espuma, y en donde se encontraban las larvas enteras éstas colonias también grandes crecieron alrededor de la larva,

presentándose una mayor densidad en la parte anterior y posterior de la larva.

5) Pruebas de inocuidad de preparaciones de Bacillus thuringiensis.

El desarrollo observado fué paralelo en los 2 grupos y no se presentó merma en el peso, o cambio en su apariencia y actividad motora, que hicieran sospechar de algún efecto nocivo atribuible a las esporas-cristales.

Con respecto al peso, en la figura B se muestra que después de 25 días de tratamiento, si se compara el grupo de ratones testigo con el de los ratones experimentales, se nota que éste último grupo fué obteniendo un ligero aumento de peso conforme transcurría el tratamiento. Esta diferencia pudo deberse a que su alimento fue previamente revuelto con un jarabe, de esta manera la adición extra de carbohidratos en la dieta de los ratones experimentales, pudo ser la causa directa de esta diferencia en el peso.

Estos ratones tratados sirven actualmente como pie de cría, de esta forma se comprueba que tampoco hay efecto adverso en su reproducción ni en su descendencia. A la fecha ambos grupos de ratones han procreado en 2 ocasiones, y la primera camada de éstas se encuentra actualmente en reproducción.

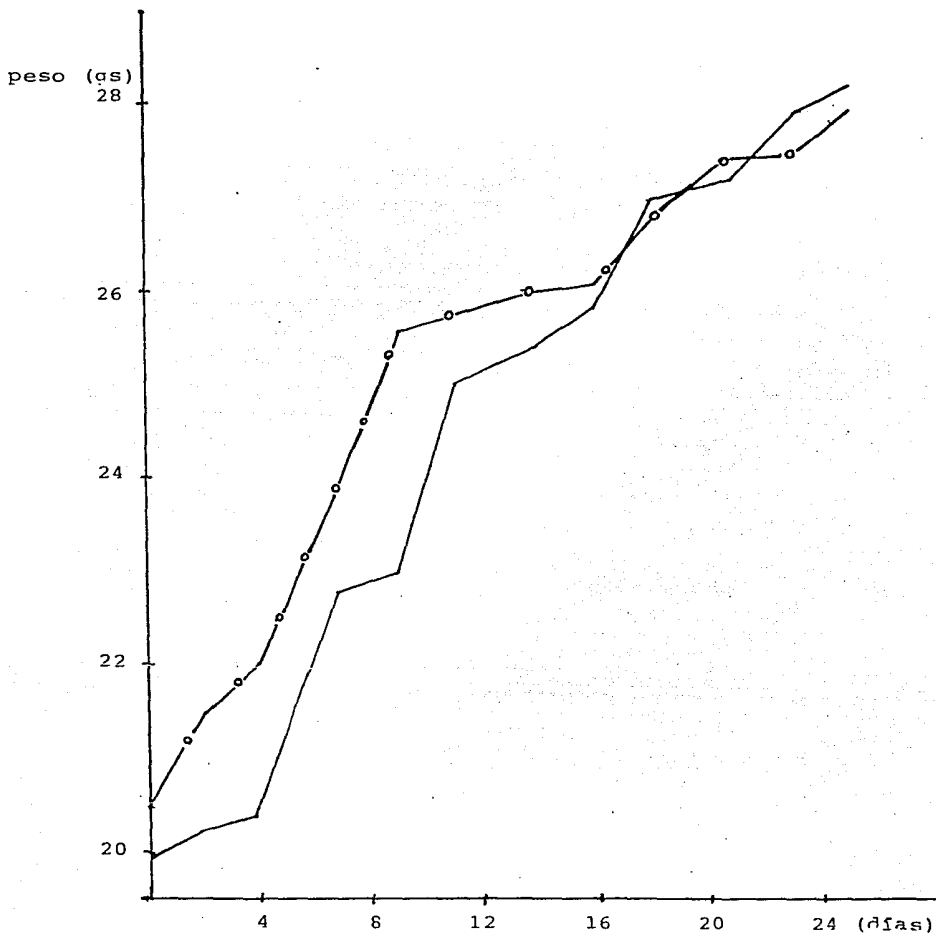


Fig 8. Evaluación del peso del ratón Mus musculus
(peso promedio de 20 ratones).

A: Grupo de ratones con alimento normal.

B: Grupo de ratones con alimento tratado con
esporas-cristales de Bacillus thuringiensis.

CONCLUSIONES

- 1) El medio de Lecadet no es recomendable pues se obtiene un rendimiento de esporas-cristales bajo y es costoso.
- 2) El medio de Holmberg modificado es el más recomendable y puede ser usado para cualquier otra variedad perteneciente a la especie Bacillus thuringiensis.
- 3) La recuperación del complejo espора-cristal es óptima con el método de centrifugación de flujo continuo.
- 4) Se recomienda el uso de secado directo por medio de la liofilización para la obtención de las esporas-cristales en polvo porque es el más barato, fácil y rápido.
- 5) Con base en la dieta preparada con salvado, glicerina y extracto de levadura (10:3:1), se obtiene una abundante población de la especie Ephestia cautella.
- 6) Bacillus thuringiensis posee gran virulencia sobre Ephestia cautella.
- 7) El porcentaje de mortandad de Ephestia cautella varía dependiendo del desarrollo de la larva (edad) y de las dosis utilizadas (10.0, 5.0, 1.0, 0.5 y 0.1%).
- 8) La dosis al 0.5% es la mínima cantidad requerida para ocasionar un elevado porcentaje de mortandad de larvas, y que corresponde a la cantidad de 40 gs de esporas-cristales como lo necesario para tratar una tonelada de granos de maíz.

9) Bacillus thuringiensis puede utilizarse como un excelente insecticida biológico para controlar plagas de Lepidópteros.

10) Bacillus thuringiensis no ocasiona efectos secundarios para otros organismos ni causa un deterioro irreversible del medio ambiente.

11) En México se pueden producir insecticidas biológicos con base a que se cuenta con recursos humanos y económicos para industrializar su producción.

12) El costo de producción de las preparaciones bacterianas son comparativamente menor o igual que el gasto que se destina a los insecticidas químicos.

LITERATURA CITADA

- 1) Bechtel, B.D. and Bulla, L.A. 1976 Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis. J. of Bacteriology (Sept.) p. 1472-1481.
- 2) Bell, M.R. and Romine, C.L. 1980 Tobacco budworm Field evaluation of microbial control in cotton using Bacillus thuringiensis and a nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. J. Economic Entomol, 73 : 427-430.
- 3) Benito, M.M. 1979 Regulación de la succinato deshidrogenasa durante el crecimiento y esporulación de E.cereus. Tesis licenciatura. Fac. Química U.N.A.M. México D.F.
- 4) Benz, G. 1971 Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2ª ed. London-New york. p. 327-356.
- 5) Cantwell, E.G. 1974 Insect Diseases Vol. I Ed. Marcel dekker, inc. New York, U.S.A.
- 6) Bulla, L.A., Kramer, J.K. and Davidson, I.L. 1977 Characterization of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis. J. of Bacteriology (Apr) p. 375-383.
- 7) Burgerjon, A. and Martouret, D. 1971 Determination and significance of the host spectrum of Bacillus thuringiensis. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and

Hussey, N.W.) Academic press inc. 2^a ed. London-New york p. 305-326.

8) Cooksey, K.E. 1971 The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biochemistry and mode of action. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2^a ed. London-New york. p. 247-274.

9) Coppel, H.C. 1977 Biological insects pest suppression. Ed. Academic press inc. London-New york.

10) Coronado, P.R. y Marquez, D.A. 1985 Introducción a la Entomología. Ed. Limusa México.

11) Dulmage, H.T., Correa, J.A. and Martinez, A.J. 1970 Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-cristal complex of Bacillus thuringiensis. J. of Invertebrate Pathology, 15: 15-20.

12) Dulmage, H.T. and Rhodes, R.A. 1971 Production of pathogens. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2^a ed. London-New york. p. 507-540.

13) Dulmage, H.T. 1974 Bacillus thuringiensis Endotoxin su pasado, su presente y futuro. IX Congreso Nacional de Entomología. México D.F.

14) Escamilla, M. J.E. 1979 El control biológico de plagas. Naturaleza, 6: 363-373.

- 15) Falcon, L.A. 1971 Use of bacteria for microbial control of insects. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2^a ed. London-New york. p. 67-96.
- 16) Frobisher, M. (et al) 1974 Fundamentals of Microbiology. Ed. W.B. Saunders Copany. Toronto, Canada.
- 17) Grison, P. 1971 Commercial products (apéndice 6). In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2^a ed. London-New york. p. 744-745.
- 18) Hagstrum, W.D. 1983 Self-provisioning with paralyzed hosts and age, density, and concealment of host as factors influencing parasitization of Epehestia cautella (Walker) by Bracon heberton (Say). Environmental Entomology, 12 (6): 1727-1732.
- 19) Hannay, C.L. 1953 Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. Nature, 172: 1004.
- 20) Heimpel, A.M. and Angus, T.A. 1963 Diseases caused by certain sporeforming bacteria. In " Insect pathology an advanced treatise" (Steinhaus, E.A.) Vol. II Academic press inc. London-New york. p. 21-67.
- 21) Heimpel, A.M. 1971 Safety of insects pathogens for man and vertebrates. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2^a ed. London-New york. p. 469-490.

- 22) Holmberg, A., Sievanen, R. and Carlberg, G. 1980 Fermentation of Bacillus thuringiensis for exotoxin production: Process analysis study. Biotechnology and Bioengineering, 22: 1707-1724.
- 23) Imms, A.D. 1955 Textbook of Entomology. Ed. Methven and Co. LTD. London.
- 24) Junko, N. and Yasuhisa, E. 1981 Mode of action of Bacillus thuringiensis Delta-Endotoxin: Effect on Galleria mellonella. Appl. Entomol Zool., 16 (2): 79-87.
- 25) Kinsinger, R.A., Mc Gaughey, Wm.H. and Dicke, E.B. 1980 Susceptibilities of Indian meal moth and Almond moth to eight Bacillus thuringiensis isolates (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of the Kansas Entomological Society, 53 (3): 495-500.
- 26) Krieg, A. 1971 Interactions between pathogens. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2nd ed. London-New york. p. 459-468.
- 27) Lecadet, M.H. and Dedonder, R. 1971 Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Eur. Biochem., 23: 282-291.
- 28) Lecato, G.L. 1976 Yield, development, and weight of Cadra cautella (Walker) and Plodia interpunctella (Hubner) on twenty-one diets derived from natural products. J. Stored Prod. Res., 12: 43-47.
- 29) Loaiza, M.V. 1961 Control biológico de plagas de granos almacenados. Tesis Licenciatura. Chapingo México.

- 30) Luthy, P. 1980 Insecticidal toxins of Bacillus thuringiensis. FEMS Microbiology Letters, 8: 1-7.
- 31) Martínez, J.M. 1984 Los plaguicidas y su uso en la conservación de granos. Memorias de las conferencias del PUAL.
- 32) Mc Brain, J.W. 1963 Factors affecting the use of microbial pathogens in insects control. Ann. Rev. Entomology, 8: 265-286.
- 33) Mc Gaughey, Wm.H. 1978 Response of Plodia interpunctella y Ephestia cautella larvae to spores and parasporal crystals of Bacillus thuringiensis. J. Economic Entomology, 71: 687-688.
- 34) Mc Gaughey, Wm. H. and Dicke, E.B. 1980 Methods of applying Bacillus thuringiensis to stored corn for moth control. J. Economic Entomology, 73: 228-229.
- 35) Merck and Co. Inc. 1983 The Merck Index 10th ed. U.S.A. p. 789.
- 36) Norris, J.R. 1969 Sporeformers as insecticides. In " The bacterial spore " (Gould, G.W. and Hurst, A.) Academic press inc. London-New york. p. 485-616.
- 37) Norris, J.R. 1971 The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biosynthesis and physical structure. In " Microbial control of insects and mites " (Burges, H.D. and Hussey, N.W.) Academic press inc. 2nd ed. London-New york. p. 229-246.
- 38) Ramírez, M.M. 1981 Insectos y almacenamiento de granos. Naturaleza, 2: 92-100.

- 39) Ramirez, M.M. 1985 Insectos que atacan a los granos almacenados. Apuntes del curso sobre granos almacenados. PUAL. p. 14-25.
- 40) Reardon, R.C. and Haissing, K. 1983 Spruce budworm larval populations and field persistence of Bacillus thuringiensis after treatment in Wisconsin. J.Economic Entomology, 76(5): 1139-1143.
- 41) Reardon, R.C. and Haissing, K. 1984 Efficacy and field persistence of Bacillus thuringiensis after ground application to balsam fir and white spruce in Wisconsin. Can. Entomology, 116: 153-158.
- 42) Salama, H.S. (et al) 1981 Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxin of Bacillus thuringiensis for different periods. J. of Invertebrate pathology, 38: 220-229.
- 43) Sandoval, P.A. 1981 Compendio de las principales plagas que atacan a los cultivos en México. T. 2 Chapingo, México.
- 44) Stainer, R.Y. (et al) 1970 The microbial world 3^a ed. Prentice-Hall Inc. New York. p. 635-652.
- 45) Steinhaus, E.A. 1963 Insect pathology an advance treatise. Vol. II. Academic press inc. New York. p. 635-647.
- 46) Valenzuela, L.E. 1975 Combate del gusano de bolsa del sauce, Malacosoma azteca, utilizando productos biológicos, y observaciones sobre su biología. Tesis Licenciatura. Chapingo, México.

- 47) Vazquez, Y.C. (et al) 1979 La Biosfera; Las plagas de insectos. Naturaleza, 2: 86-97.
- 48) Weisen, J. 1970 Recent advances in insect pathology. Ann. Rev. Entomology, 15: 245-249.
- 49) Wright, V.F. and Harein, P.K. 1982 Effects of some mycotoxins on the Mediterranean flour moth. Environmental Entomology, 11 (5): 1043-1045.
- 50) Young, S.Y., Mc Caul, L.A. and Yearian, W.C. 1980 Effect of Bacillus thuringiensis-trichoplusia nuclear polihedrosis virus mixtures on the cabbage looper Trichoplusia ni. J. Georgia Entomology Soc., 15 (1): 1-8.