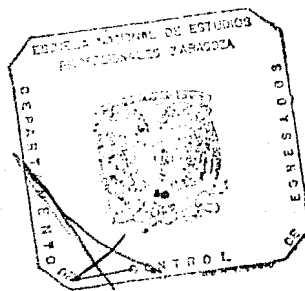




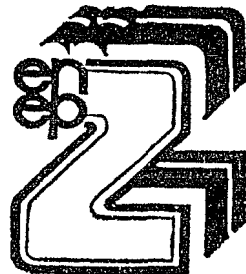
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"



PRODUCCION DEL COMPLEJO ESPORACRISTAL DEL BACILLUS
THURINGIENSIS MG-1 Y VALORACION DE ALGUNOS
ASPECTOS DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATAS
INTOXICADAS CON EL BIOINSECTISIDA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N
MARIA LUISA E. DIAZ REYES
JORGE RICO ALVAREZ
MEXICO, D. F., 1985





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

C O N T E N I D O

- I. FUNDAMENTOS PARA LA ELECCION DEL TEMA
- II. INTRODUCCION
- III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- IV. OBJETIVOS
- V. HIPOTESIS
- VI. REACTIVOS
- VII. MATERIAL Y EQUIPO
- VIII. METODOS
- IX. RESULTADOS
- X. DISCUSION DE RESULTADOS
- XI. CONCLUSIONES
- XII. APENDICE
- XIII. BIBLIOGRAFIA

FUNDAMENTOS PARA LA ELECCION DEL TEMA

FUNDAMENTOS PARA LA ELECCION DEL TEMA

El control de plagas de insectos en nuestro país es muy importante, ya que su economía se apoya principalmente en la producción agrícola (7).

En las dos últimas décadas se han venido usando bioinsecticidas químicos orgánicos del tipo sistémicos, los cuales se han observado que tienen un amplio espectro de toxicidad (4), tanto para los animales invertebrados como los vertebrados, -- por lo cual en la última década, se ha tratado de desarrollar la tecnología para la producción de insecticidas microbiológicos como otra posibilidad para el control de plagas de insectos, considerando que estos insecticidas tienen un bajo espectro de toxicidad, pero no se ha valorado los posibles transtornos inmunológicos que pueden provocar tanto en animales como en humanos (2).

Los insecticidas microbiológicos se basan principalmente en la utilización de bacterias enteropatógenas, como son varias especies de *Bacillus*, entre los que contamos al *B. thuringiensis* (4). Este bacilo forma una espora y es el único -- que puede producir uno o más cristales paraesporales durante -- el proceso de esporulación. Este cristal de origen proteico -- llamado por Hannag cuerpo parasporal, es tóxico para la larva de los Lepidópteros (2). La enterotoxina se hidroliza en el intestino de la larva y sus subunidades atacan el revestimiento

del intestino causando parálisis intestinal y disminuyendo la alcalinidad del mismo, lo cual favorece el crecimiento y proliferación del bacilo provocando septicemia (7).

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La idea de usar una especie viva para controlar a otra no es reciente, pero sí en los últimos veinte años se han incrementado nuestros conocimientos acerca de la producción, uso y control de estos agentes microbiológicos. Hoy sabemos que insectos, son susceptibles a que tipo de agentes infecciosos. La potencialidad tanto económica como biológica, depende de la relación costo efectividad que deberá ser comparativamente más ventajosa que la de los agentes químicos normalmente usados. Es importante tener una acción selectiva para los insectos patógenos. La idea de usar una bacteria la cual fuera altamente tóxica y que produjera esporas resistentes por largos periodos de tiempo, fue muy atractiva para los investigadores interesados en controlar plagas de insectos; para los años treinta ya se empezaba a usar en Francia un producto llamado "Sporiene", cuya fórmula contenía un gran número de esporas del Bacillus thuringiensis.

Bacillus thuringiensis crece bien en el medio de Stainhaus, medio diseñado por investigadores de la Universidad de California, investigaciones posteriores llevaron a producir en escala semi-comercial la spora del bacilo, ya que se demostró que es la spora la responsable de la actividad bioinsecticida del bacilo. El producto final del crecimiento del Bacillus thuringiensis en un medio de cultivo es una mezcla de esporas y -

cristales, que resultan de los residuos de la pared de la espora. La mezcla de esporas y cristales son patogénicas para un gran número de larvas de lepidópteros y aparentemente no son tóxicos para otras formas de vida.

Después de analizar la potencialidad patogénica de la mezcla espora-cristal se observó que ambos elementos son importantes, aunque la espora tiene una potencialidad menor que el cristal proteico. La proteína para espora es la toxina importante para la actividad insecticida del Bacillus thuringiensis. El cuerpo paraesporal esta presente en todas las colonias del bacilo, el cual presente una toxina termolábil, pero también se encontró una segunda toxina termoestable o θ -exotoxina. La exotoxina tiene un peso molecular entre los 800 y 900 daltons, tiene un nucleótido con un grupo fosfato por molécula de adenina y además cuenta con un azúcar raro, el ácido allomucico --- (Fig. 1). La exotoxina actúa aparentemente por inhibición de la síntesis de RNA.

El uso constante de los agentes químicos y biológicos ha creado una gran polémica acerca de la toxicidad de estos en el humano, ya que ese tipo de sustancias son difícilmente eliminadas del organismo y aún no se ha podido establecer con toda claridad los efectos citotóxicos y el mecanismo que se sigue.

Una opción en el estudio de los efectos tóxicos de los insecticidas, se refiere al campo inmunológico. Como se sabe el individuo normal tiene la capacidad de defenderse de los agentes nocivos que encuentra en su medio ambiente, gracias a una

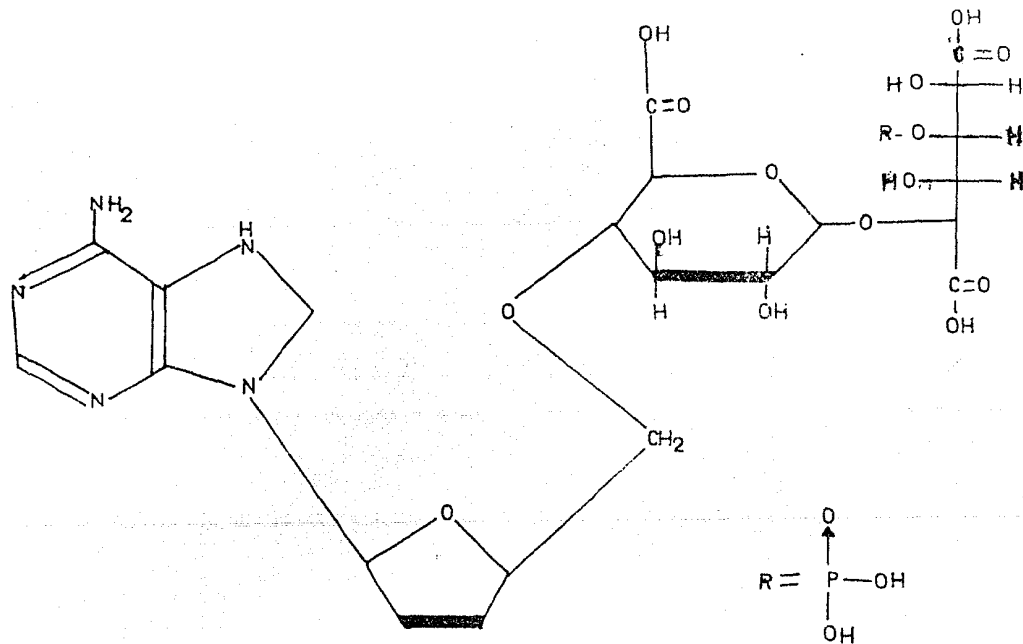


FIG. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA EXOTOXINA DEL *B. thuringiensis*

serie de mecanismos presentes desde el nacimiento, algunos de los cuales mencionaremos abajo, aunque no siempre depende su efectividad de experiencias previas con un microorganismo o partícula extraña (antígeno), en tanto que otros más especializados "aprenden" de una experiencia previa y actúan más efectivamente ante un segundo ataque por el mismo antígeno.

Por inmunidad se entiende el conjunto de mecanismos de defensa de un organismo, gracias a los cuales este se puede defender de los microorganismos patógenos presentes en su medio ambiente, o librarse de las células anormales que se desarrollan en su interior (neoplasias), u oponerse al ingreso de células extrañas. Los mecanismos de defensa o inmunidad son:

Factores innatos. Están genéticamente controlados y varían entre las especies y en un grado menor entre individuos de la misma especie. La edad, el sexo, el balance hormonal, son los factores más importantes desde este punto de vista.

Fagocitosis. Los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos acuden en defensa del organismo cuando los factores innatos no logran detener la invasión de un germen o de un antígeno cualesquiera. Así como los factores anteriores, la fagocitosis es inespecífica, es decir, obra contra cualquier agente que aparezca en el medio interno, estas células incorporan a su citoplasma vacuolas fagocíticas en las que se han incluido las partículas antigénicas, para destruirlas por procedimientos enzimáticos o impedir su reproducción si se trata de gérmenes.

Inflamación. Gracias a este mecanismo se produce una vaso dilatación local en el punto de agresión, lo cual asegura el arribo de factores plasmáticos que intervienen en la defensa del organismo a la vez que facilitan la llegada de un mayor número de células fagocíticas. Una vez vencido el agresor, se encarga de reparar los daños tisulares ocasionados por el ataque y de limpiar la zona de residuos de antígenos dañados y de células desintegradas.

Sistema de inmunidad específica. Esta constituida por -- las células y órganos del sistema linfóide y gracias a él, se producen una serie de reacciones específicas contra cada uno -- de los diferentes antígenos que pueden agredir al organismo, -- reacciones que son lentas ante el primer contacto, pero que -- gracias a un proceso de aprendizaje del sistema se producen -- con inusitada rapidez ante una nueva agresión por el mismo antígeno. Según que la defensa se haga por acción directa de linfocitos, o indirecta por la moléculas producidas por las células plasmáticas, inmunoglobulinas o anticuerpos, el mecanismo se denominará Inmunidad Celular ó Inmunidad Humoral.

Sistemas complementarios o amplificadores. En el plasma se encuentra un conjunto de factores proteicos que constituyen en conjunto el llamado sistema de complemento, que entra en actividad por la presencia de un germen, por factores producidos por la fagocitosis o por la acción del sistema de inmunidad humoral. Al activarse, refuerza la fagocitosis, incrementa la inflamación y complementa la actividad que contra el antígeno --

que tengan los anticuerpos. La properdina es un sistema que --
actúa la segunda parte del sistema del complemento por vía dí
ferente a la regular. El interferón es una sustancia producida
por diferentes células del organismo al ser invadidas por un--
virus, y que actúan en defensa del organismo impidiendo la re-
plicación de partículas virales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Modificar el medio de cultivo del Bacillus thuringiensis-MG - I de acuerdo a las materias primas disponibles en el país para la producción del complejo espora-cristal y valorar algunos trastornos inmunológicos causados por la administración del B. thuringiensis MG- I a ratas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

i) Utilizar materias primas nacionales para la elaboración de un medio de cultivo para la producción del complejo espora-cristal del Bacillus thuringiensis MG-1.

ii) Valoración de algunos aspectos inmunológicos en ratas a las cuales se les administrará el complejo espora-cristal.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Al utilizar materias primas del país se reducirá el costo de producción del complejo espora-cristal del Bacillus thuringiensis MG-1. Se espera encontrar alteraciones inmunológicas - causadas por el complejo espora cristal en ratas a las cuales se les administró el bioinsecticida.

REACTIVOS

REACTIVOS

Acido tricloroacético
Acido peryódico
Meta bisulfato de sodio
Agar nutritivo
Cristal violeta
Aceite de inmersión
Acido fosfórico
Hidróxido de sodio
Agua destilada
Sulfato de magnesio
Sulfato de hierro
Sulfato de zinc
Sulfato de cobre
Carbonato de calcio
Harina de soya (pasta cruda)
Dextrosa
Peptona
Licor de malz
Lactosa
Acetona
Sulfato de amonio
Fosfato dibásico de potasio
Cloruro de calcio
Sulfato de manganeso
Hidróxido de amonio
Carbonato de sodio
Cloruro de mercurio
Cloruro de potasio
Cloruro de sodio
Bicarbonato de sodio
Acido acético glacial
Azul de Evans
Medio MEM
Suero de cobayo
Ratas Wistar
Glóbulos rojos de carnero
Cobayos albinos

MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL Y EQUIPO.

Cronómetros
Mecheros
Pipetas Pauster,
Gradillas
Cajas de Petri
Tubos de rosca con tapon de baquelita
Tubos de ensaye 13 x 100 mm.
Portaobjetos
Tubos de ensaye 16 x 150 mm
Asa y porta asa bacteriologica
Matraces erlenmeyer 250 ml, 500 ml y 1000 ml
Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml, 10 ml
Vasos de precipitado de 100 ml, 250 ml y 500 ml
Probetas de 500 ml, 250 ml y 1000 ml
Gradillas
Papel filtro
Papel de aluminio
Parafilm
Algodón
Gasa
Camara de Neubauer
Agitador de pipetas de Thoma
Coladeras de acero
Cubrehematímetros
Estuche de disección
Jaulas para ratas
Jeringas de 1 ml, 5 ml y 10 ml
Micropipetas de 50 microlitros
Pipetas de Thoma dil. 1:20
Sondas gástricas
Autoclave
Potenciómetro Modelo PBL
Baño maría
Balanza analítica METTLER
Balanza granataria OHAUS
Espectrofotómetro ZEISS Mod ECO PM 2 DL
Refrigerador
Equipo para filtrar al vacío
Equipo de microdilutor
Centrífuga con refrigeración
Centrífuga clínica
Microscopios
Placa de agitación
Horno
Estufa de cultivo
Agitador con control de temperatura
Fermentador para medios líquidos con capacidad de 2 l

Catalasa positivo

Fermenta arabinosa

Fermenta xilosa

Fermenta manitol

Hidrolisa almidón

No desamina la fenilalanina

No descompone la tirosina.

M E T O D O S

MÉTODOS DE CULTIVO

1) Origen de la cepa.

La cepa de Bacillus thuringiensis MG-I usada fue aislada por el personal del Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la cual fue donada para el estudio de su crecimiento en diferentes medios de cultivo y la valoración de aspectos inmunológicos en la Escuela de Estudios Profesionales "Zaragoza", Sección Microbiología.

2) Conservación de la cepa.

El B. thuringiensis MG-I fue mantenido por medio de resembras periódicas realizadas cada mes en tubos inclinados -- conteniendo agar soya tripticasa a 37°C y posteriormente conservados en refrigeración, presentando buenas características de desarrollo.

3) Medios de Cultivo.

Se probaron seis medios de cultivo, en tres de los cuales se modificó el medio base (harina de semilla de algodón desengrasado) para utilizar materias más económicas y de producción nacional.

Medio Base

Harina de semilla de algodón	10.0 g
Peptona	2.0 g
Dextrosa	15.0 g

Extracto de levadura	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,3 g
Sulfato de hierro	0,02 g
Sulfato de zinc	0,02 g
Carbonato de calcio	1,0 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH final	7,0 ± 0,1

Medios de Ensayo

Medio de cultivo A

Harina de soya (pasta cruda)	20,00 g
Dextrosa	15,00 g
Peptona	2,00 g
Licor de maíz	10,00 g
Sulfato de magnesio	0,30 g
Sulfato de hierro.....	0,02 g
Sulfato de zinc.....	0,02 g
Carbonato de calcio	1,00 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH final	7,0 ± 0,1

Medio de cultivo B

*Harina de soya (pasta cruda)	20.00 g
Licor de malz	10.00 g
Dextrosa	15.00 g
Peptona	2.00 g
Sulfato de magnesio	0.30 g
Sulfato de hierro	0.02 g
Sulfato de zinc	0.02 g
Carbonato de calcio	1.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH final	7.0 ± 0.1

* En este medio la harina de soya se dejó reposar durante 24 hrs. en agua destilada y refrigeración, utilizando solo el agua de remojo y disolviendo en ella las sales, ajustando el volumen con agua destilada.

Medio de cultivo C

Licor de malz	10.00 g
Dextrosa	15.00 g
Peptona	2.00 g
Sulfato de magnesio	0.30 g
Sulfato de hierro	0.02 g
Sulfato de zinc	0.02 g
Carbonato de calcio	1.00 g

Agua destilada c. b.p.	1000 ml
pH final	7.0 \pm 0.1

Medio de cultivo D

Peptona	2.00 g
Dextrosa	2.00 g
Cloruro de calcio	0.018g
Sulfato de cobre	0.0075g
Sulfato de zinc	0.0075g
Sulfato de hierro	0.00075g
Sulfato de magnesio	0.030
Sulfato de manganeso	0.040g
Fosfato ácido de potasio	17.40g
Sulfato de amonio	3.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH final	7.0 \pm 0.1

Medio de cultivo E

Peptona de soya	2.0 g
Licor de maíz	3.0 g
Sulfato de magnesio	1.0 g
Sulfato de zinc	0.0075g
Sulfato de cobre	0.0075g
Sulfato de hierro	0.00075g
Sulfato de manganeso	0.040 g

Dextrosa	5.0 g
Sulfato de amonio	3.0 g
Fosfato ácido de potasio	10.0 g
Cloruro de calcio	0.018 g
Agua destilada c.b.p.	1000ml
pH final	7.0 ± 0.1

Medio de cultivo F

Sulfato de amonio	3.0 g
Acido fosfórico	7.0 g
Sulfato de magnesio	2.0 g
Dextrosa	15.0 g
Cloruro de calcio	0.036 g
Sulfato de hierro	0.0015 g
Sulfato de cobre	0.0075 g
Sulfato de zinc	0.0075 g
Sulfato de manganeso	0.040 g
Licor de maíz	5.0 g
Peptona de soya	2.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH final	7.0 ± 0.1

El pH final se ajusto con hidróxido de sodio al 1 N usando para ello un potenciómetro.

4) Condiciones Experimentales de Fermentación.

a) Experimentos realizados en matraz. Se efectuaron los experimentos en matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 ml - conteniendo 150 ml del medio de cultivo, incubando en una estufa con agitación mecánica a 280 rpm durante 75 hrs, a 32°C.

La preparación del inóculo fue hecha de la siguiente manera; se hizo una suspensión del B. thuringiensis en solución salina estéril al 0.85 % a partir de un cultivo de 24 hrs. de crecimiento sobre agar soya tripticasa, agregando 4.5 ml de la suspensión a cada matraz para lograr poner un inóculo al 3 % (v/v), con una densidad óptica de 0.60, medida en un espectrofotómetro [Spectronic 20 Bosh & Lomb] a 660 nm, con celdas de 1 cm de longitud y 5.0 ml de capacidad.

De igual manera se midió el crecimiento, espectrofotométricamente a 660 nm,

b) Experimentos realizados en el Fermentador. Se utilizó un fermentador marca Wrigley 5 ST con capacidad de 2 l y un volumen de trabajo de 1 litro, bajo las siguientes condiciones de fermentación; temperatura de 32°C, agitación de 340 rpm y aereación de 1 vvm,

Se ensayaron los medios de cultivo B y C debido a que a nivel de matraz fue donde se obtuvo mayor producción del complejo spora-cristal.

Los experimentos realizados a este nivel duraron 68 hrs de fermentación.

La preparación del inóculo fue hecha de la siguiente ma-

nera; se tomaron 15 ml de un cultivo de 48 hrs. de crecimiento y se agregaron a un litro de medio de cultivo estéril para lograr obtener un inóculo de 1.5 % (v/v). Se siguió el crecimiento espectrofotométricamente a una longitud de onda de 660 nm.

5) Cinética de Crecimiento.

a) Densidad óptica. A diversos intervalos de tiempo, las primeras diez horas se tomaron 5 ml. del cultivo a intervalos de una hora, pasadas las primeras 24 horas, los intervalos de tiempo aumentaron a cada tres horas. Poniéndose en celdas Bosh & Lomb de 1 cm de longitud y midiéndose la extinción a 660 nm usando como blanco el medio de cultivo sin inóculo, las determinaciones de extinción (absorbancia) se realizaron inmediatamente después de tomar la muestra y las lecturas se graficaron en papel milimétrico.

b) Cuenta viable en placa. Las cuentas viables en placa se realizaron en una serie de diluciones por el método de vaciado en placa, utilizando agar nutritivo. Los tubos de las muestras de 68 horas fueron calentadas a 65°C durante 10 min. para después efectuar diluciones hasta 10^{-10} con solución salina al 0.85 %, siendo después vaciada una alícuota de 1 ml en una caja Petri estéril, para después vaciar 10 ml de agar nutritivo, incubando 24 horas a 32°C, para determinar el número de microorganismos termorresistentes formadores de colonias (esporas).

6) Recuperación del Complejo Espora-Cristal del Bacillus Thuringiensis del Medio de Cultivo por Co-Precipitación con Lactosa.

El pH total del caldo se ajusta a un pH de 7.0 ± 0.1 con HCl 1 N con un potenciómetro, se centrifuga a 10^3 rpm durante 15 min. en una centrifuga refrigerada, decantando el sobrenadante, resuspender en un volumen de lactosa al 5%, añadiendo 4 volúmenes de acetona se filtra al vacío y se seca.

7) Tipificación del Bacillus thuringiensis.

a) Temperatura de crecimiento. El rango de temperatura de crecimiento del bacilo se encuentra entre 30 y 35°C considerando la temperatura óptima a 32°C.

b) Producción de cristal protelco. Esta especie se distingue de otras por la producción de un cuerpo cristalino protelco intracelular; rara vez se encuentra más de uno, el cual es formado en la célula fase de esporulación.

c) Morfología colonial:

Colonias blancas

Consistencia cremosa

Bordes redondos

Forma de "yema de huevo"

Tamaño 2mm de diámetro aprox.

Opacas

d) Tinciones. Bacilos grandes que por el método de Gram se presentan positivos en etapas tempranas de crecimiento.

e) Pruebas bioquímicas.

METODOS INMUNOLOGICOS

1) Procedimiento para la Administración del Complejo Espora--
-Cristal a las Ratas.

Se utilizó para la valoración inmunológica ratas tipo Wistar, cuyo peso inicial fluctuaba entre 105 y 167 gms. Se les --
administró por vía oral por medio de una sonda gástrica una sus-
pensión del complejo espora-cristal equivalente a 10mg del com-
plejo por kilogramo de peso corporal, durante un periodo de 40
días con intervalos de administración de tres y cuatro días. An-
tes de cada administración se pesaron los animales para fijar -
la dosis y evaluar su peso.

Junto con los animales tratados se utilizaron un número --
igual de animales control a los que se les administró solución-
salina al 0.85% en lugar del complejo.

Al finalizar el tratamiento se pesaron los animales se les
extrajo la sangre por la vena axilar derecha, y se efectuó una
disección de bazo e hígado para evaluar su peso con respecto a-
los obtenidos de los animales control.

Con las muestras de sangre se procedió a efectuar las valo-
raciones inmunológicas siguientes; cuenta de leucocitos, céllu-
las formadoras de anticuerpos, anafilaxia pasiva cutánea, Uni-
dades 50% hemolíticas y microhemaglutinación.

2) Determinación de Células Formadoras de Anticuerpos por el Método de Jerne.

a) Se toman ratas inmunizadas 3 o 4 días antes y se sacrifican por dislocación cervical.

b) Se extrajo el bazo y se colocó en la tapa de una caja Petri que contenía 3 ml de medio MEM, todo esto en baño de hielo.

c) Se lavó el bazo con solución de MEM.

d) Se pasa el bazo lavado a la caja de Petri se añaden 2ml de solución de MEM, se le hizo otro corte por un extremo y con varillas de vidrio se oprimió el bazo contra el fondo de la caja.

e) una vez que se extrajo la mayor cantidad de células posibles se desechó la cápsula del bazo.

f) Se recogió la suspensión con una jeringa estéril de 5ml y se pasa a un tubo de ensaye de 13x100, y los gránulos más grandes se dejan sedimentar de 3 a 5 min.

g) Se decantó la suspensión con ayuda de la jeringa.

h) Se diluyeron las células 1:30 con solución de MEM.

i) En un tubo de ensaye se mezcló 0.1 ml de suspensión de células y 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos al 20%. Se le añadió 2ml de agarosa al 0.8% a 45°C y se homogeniza la suspensión usando un agitador vortex, la suspensión se vació rápidamente a una caja de Petri de 10 cms de diámetro y se distribuyó la agarosa por toda la caja con movimientos rotatorios.

j) Se dejó reposar en una superficie plana hasta que soli-

dificó el agar. Se sembró dos placas por cada suspensión.

k) Se incubaron las placas a 37°C durante 45 min.

l) Se agregó a cada caja 1,5 ml de complemento de cobayodiluido 1:10, se distribuyó en toda la superficie de la caja y se incubó 30 min a 37°C.

m) Después de incubar las cajas se cuentan las placas hemolíticas que aparezcan en cada caja.

n) Se tomó 0.1 ml de solución de células que se sembraron y se agregó 1.5 ml de solución de cristal de violeta, se hizo la cuenta en la cámara de Neubauer.

3) Anafilaxia Pasiva Cutánea (PCA),

a) Se tomó un cobayo rasurado y el área libre de pelo se dividió en cuatro regiones iguales.

b) En tres de esas regiones se inyectaron 0.1 ml de cada una de las diluciones del suero hiperinmune, por vía intradérmica.

c) En la cuarta región se inyectó por la misma vía 0.1 ml de solución salina isotónica (testigo negativo).

d) Se dejaron los animales reposar durante tres horas.

e) Se inyectaron por vía intracardíaca, 1 ml de la solución de antígeno con azul de Evans.

f) Se localizaron las zonas de manchas azules en las regiones donde se inyectaron las diluciones del suero y la solución salina.

4) Determinación Cuantitativa de Complemento en Unidades 50% Hemolíticas.

a) Se lavaron tres veces en la centrífuga a 1500 rpm durante 5 min los glóbulos rojos de carnero en TBS y se preparó una dilución al 2% en TBS (10 ml).

b) Se ajustó la suspensión en una celda de 1 cm de diámetro, de la siguiente manera se mezcló 0.6 ml de la suspensión de eritrocitos al 2% y 3.4 ml de agua destilada. Se leyó la densidad óptica a 550 nm contra blanco de agua destilada. El 100% de hemólisis dio 0.5.

c) A 10 ml de la suspensión anterior se le adicionó un volumen igual de hemolisina previamente titulada (2 U 50% H) en TBS. Se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 30 min con agitación frecuente. Transcurrido este tiempo se sacó el matraz del baño y de esta manera tenemos los eritrocitos sensibilizados a una suspensión al 1%.

d) Se hicieron tres diluciones en TBS de manera siguiente:

- i) 0.4 ml de suero + 9.6 ml de TBS = 1:25
- ii) 5.0 ml de i) + 5.0 ml de TBS = 1:50
- iii) 5.0 ml de ii) + 5.0 ml de TBS = 1:100

Se colocaron en el baño de hielo 14 tubos (16x100) usando 4 tubos para cada dilución del suero (12 tubos en total) y dos tubos para los testigos de la prueba.

e) Se distribuyó en los tubos las siguientes cantidades de las diluciones, de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y TBS.

TUBO	DILUCION DE SUERO (X)	ERITROCITOS SENSIBILIZADOS	TBS
1	1.0 ml	1.2 ml	0.8 ml
2	0.7 ml	1.2 ml	1.1 ml
3	0.5 ml	1.2 ml	1.3 ml
4	0.3 ml	1.2 ml	1.5 ml
T positivo	0.0 ml	1.2 ml	0.0 ml
T negativo	0.0 ml	1.2 ml	0.0 ml

f) Se mezclaron los tubos y se incubaron a 37°C durante 30 min. con agitación frecuente.

g) Sacando los tubos se les adicionó a todos 1.0 ml de TBS frío, excepto al testigo positivo al cual se le adicionó 2.8 ml de agua destilada, agitando los 14 tubos.

h) Centrifugando los tubos a 1500 rpm durante 5 min.

i) Se leen los sobrenedantes a 550 nm usando como blanco el tubo testigo negativo.

j) Se calculó para cada tubo el porcentaje de hemólisis en relación con el testigo positivo (D.O. = 0.5 para 100%).

5) *Microhemaglutinación.*

a) *Obteniendo de 3 a 5 ml de sangre de ratones previamente inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC).*

b) *Se dejó coagular la sangre y se separó del suero por -- centrifugación.*

c) *En una placa para microtitulación se le adicionó con -- la ayuda de una micropipeta de 50 microlitros PBS .*

d) *Al pozo # 1 se le adicionó 50 microlitros de suero, y se efectuaron diluciones con la ayuda de un microdilutor de 50 microlitros.*

e) *Se le agregaron 50 microlitros de GRC al 1% a cada pozo y se agitó durante 5 minutos en la placa de agitación.*

f) *Se incubaron a 37°C durante una hora tapadas y etiquetadas adecuadamente.*

g) *Después de transcurrido este tiempo se pusieron las -- placas en el refrigerador.*

h) *Los resultados se obtuvieron observando hasta que pozo se inhibió la hemaglutinación.*

RESULTADOS

RESULTADOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO,

Tabla No. 1

Resultados del crecimiento del Bacillus thuringiensis en el medio de cultivo B, realizado en matraz Erlenmeyer de 500 - ml con un volumen de trabajo de 150 ml, agitación de 280 rpm, temperatura de 32°C y un inóculo de 3% (v/v).

TIEMPO (hrs)	DENSIDAD OPTICA (Absorbancia)
0	0
1	0.06
2	0.10
4	0.30
6	0.82
10	1.02
24	1.60
25	1.65
26	1.65
27	1.65
28	1.65
29	1.65
30	1.65
52	1.65
58	1.65
59	1.65
60	1.60
61	1.55
62	1.58
70	1.30
72	1.28

CURVA DE CRECIMIENTO DEL *Bacillus thuringiensis* M-G-1
EN EL MEDIO DE CULTIVO B

GRAFICA N. 1

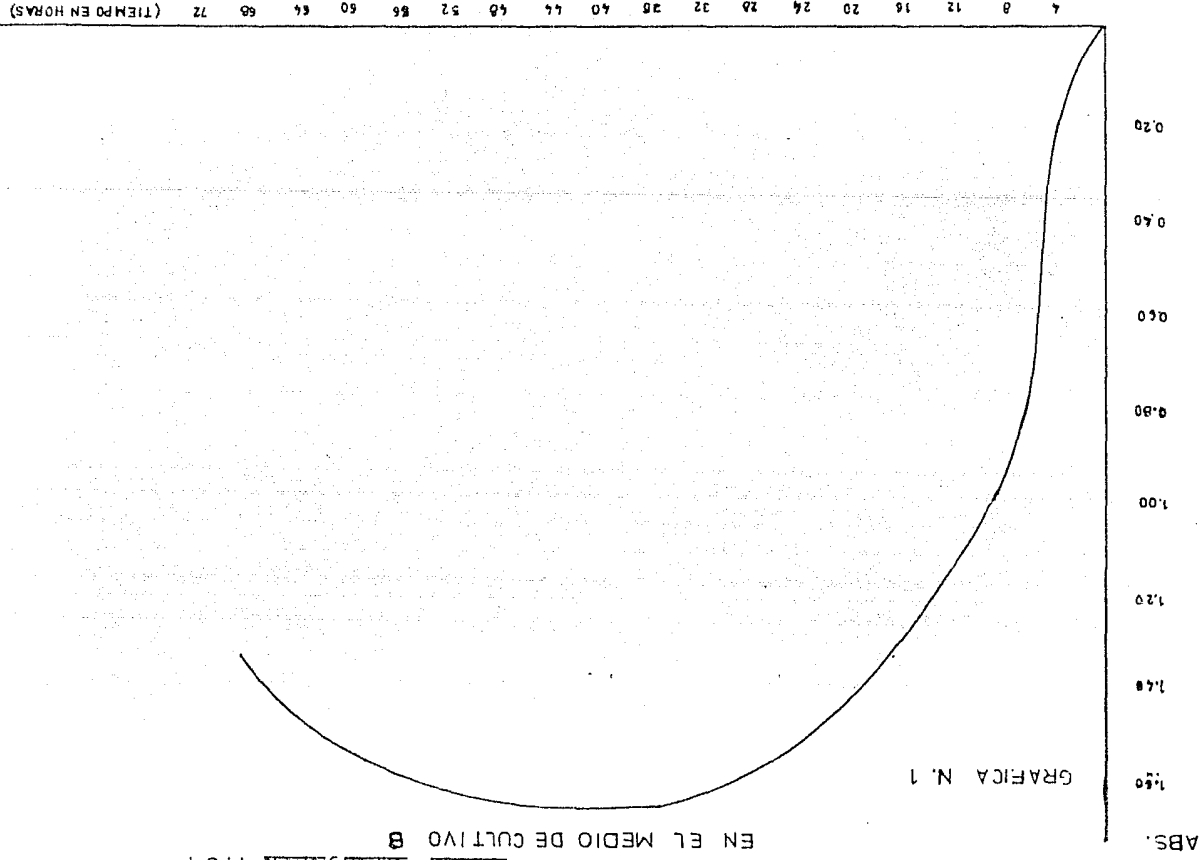


Tabla No. 2

Resultados del crecimiento del Bacillus thuringiensis en el medio de cultivo C, realizado en matraz Erlenmeyer de 500 - ml con un volumen de trabajo de 150 ml, agitación de 280 rpm, - temperatura de 32°C y un inóculo de 3% (v/v).

TIEMPO (hrs)	DENSIDAD OPTICA (Absorbancia)
0	0.01
1	0.05
2	0.08
4	0.26
6	0.72
8	0.85
10	0.90
26	1.45
27	1.45
28	1.45
31	1.45
56	1.50
57	1.45
58	1.45
60	1.35
63	1.32
68	1.02

ABS.

1.60

1.40

1.20

1.00

0.80

0.60

0.40

0.20

CURVA DE CRECIMIENTO DEL *Bacillus thuringiensis* MG-1
EN EL MEDIO DE CULTIVO C

GRAFICA N.2

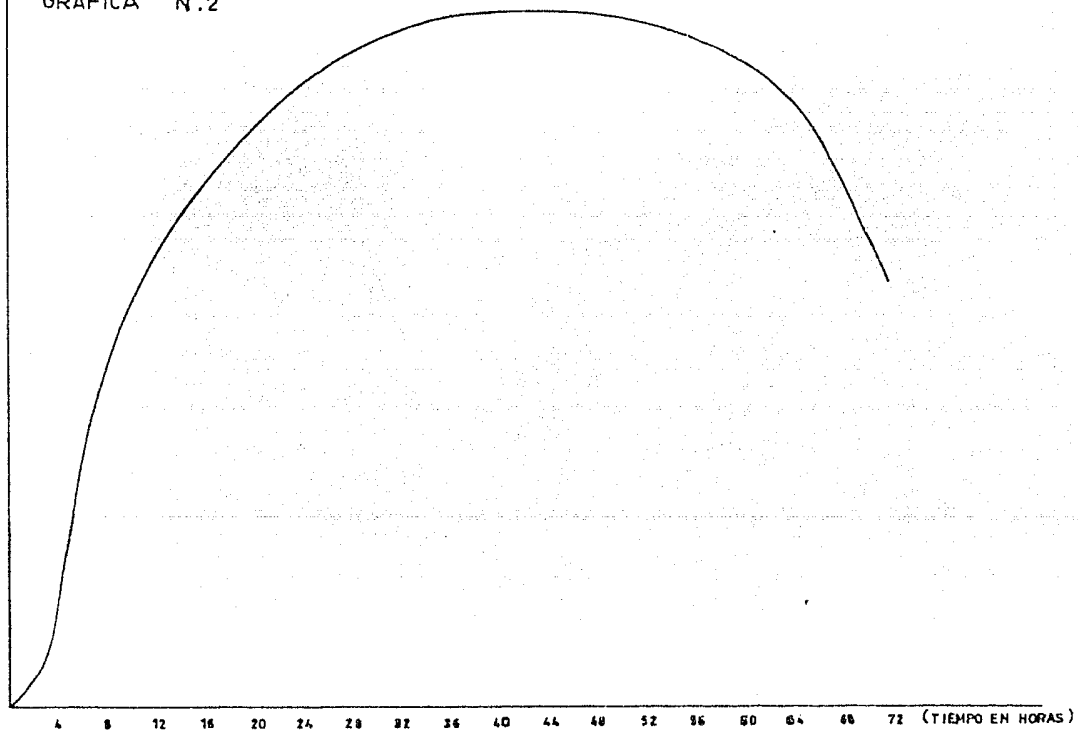


Tabla No. 3

Resultados del crecimiento del Bacillus thuringiensis en el medio de cultivo D, realizado en matraz Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de trabajo de 150 ml, agitación de 280 rpm, temperatura de 32°C y un inóculo de 3% (v/v).

TIEMPO (hrs)	DENSIDAD OPTICA (Absorbancia)
0	0.05
2	0.07
4	0.33
10	0.82
28	1.20
30	1.20
31	1.23
32	1.20
34	1.20
36	1.20
49	1.20
50	1.17
51	1.17
52	1.10
53	1.08
72	0.80
75	0.79

ABS

CURVA DE CRECIMIENTO DEL *Bacillus thuringiensis* MG-1
EN EL MEDIO DE CULTIVO -D

GRAFICA N.3

1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20

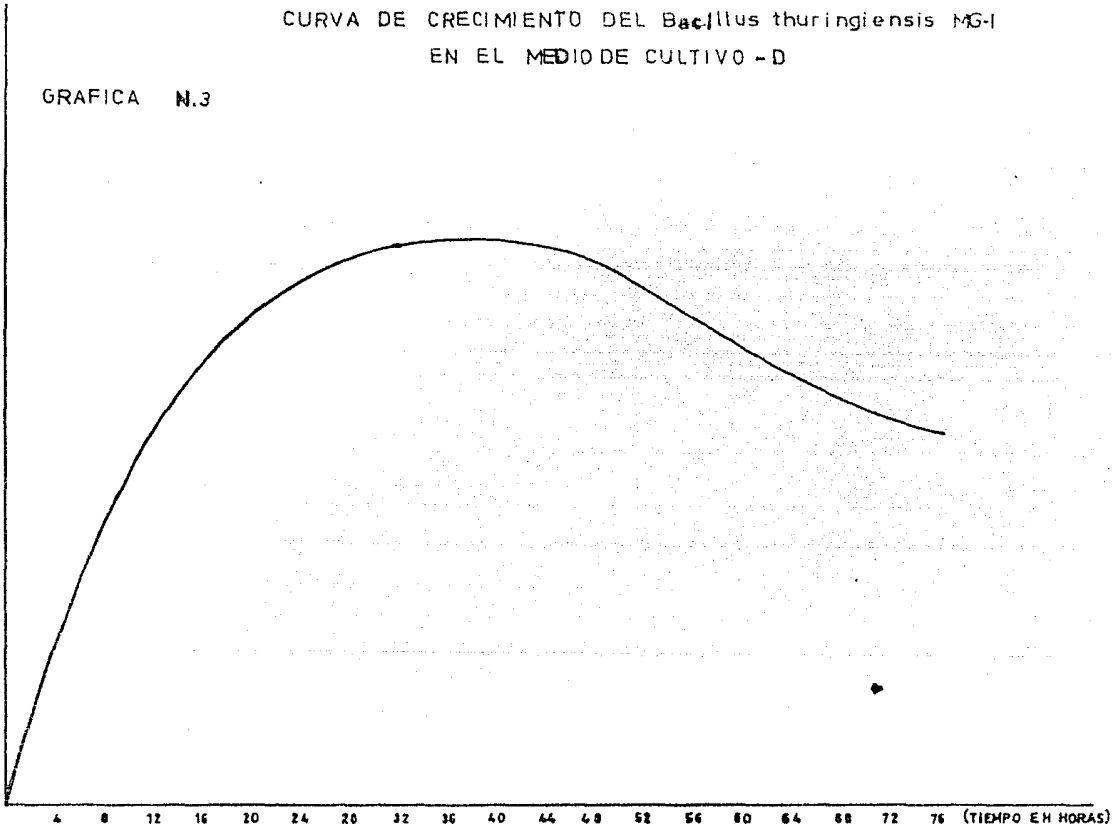


Tabla No. 4

Resúltados del crecimiento del Bacillus thuringiensis en el medio de cultivo E, realizado en matraz Erlenmeyer de 500 - ml con un volumen de trabajo de 150 ml, agitación de 280 rpm, - temperatura de 32°C y un inóculo de 3% (v/v).

TIEMPO (hrs)	DENSIDAD OPTICA (Absorbancia)
0	0.03
2	0.10
5	0.19
8	0.70
10	1.19
28	1.35
29	1.35
30	1.35
31	1.35
32	1.38
33	1.35
50	1.18
54	1.09
72	1.02
74	1.01

ABS

CURVA DE CRECIMIENTO DEL Bacillus thuringiensis MG-1
EN EL MEDIO DE CULTIVO -E

GRAFICA N.4

1.60

1.40

1.20

1.00

0.80

0.60

0.40

0.20

4

8

12

16

20

24

28

32

36

40

44

48

52

56

60

64

68

72

(TIEMPO EN HORAS)

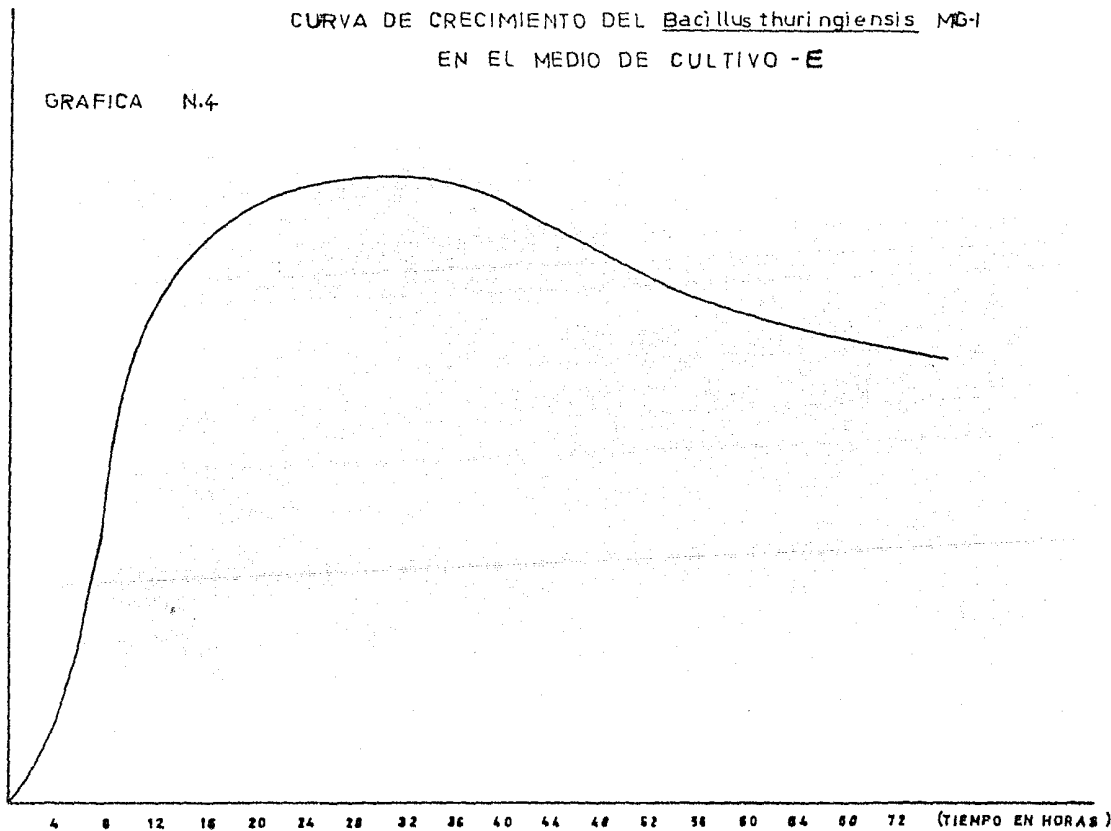


Tabla No. 5

Resultados del crecimiento del Bacillus thuringiensis en el medio de cultivo F, realizado en matraz Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de trabajo de 150 ml, agitación de 280 rpm, temperatura de 32°C y un inóculo de 3% (v/v).

TIEMPO (hrs)	DENSIDAD OPTICA (Absorbancia)
0	0.01
2	0.05
3	0.08
5	0.10
7	0.25
9	0.35
10	0.40
26	0.60
27	0.65
28	0.60
29	0.60
30	0.63
31	0.63
32	0.60
33	0.57
50	0.50
51	0.45
52	0.40

CURVA DE CRECIMIENTO DEL Bacillus turingiensis MG-1
EN EL MEDIO DE CULTIVO - F

ABS.

1.60

1.40

1.20

1.00

0.80

0.60

0.40

0.20

GRAFICA N.5

4 6 12 16 20 24 26 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72 (TIEMPO EN HORAS)

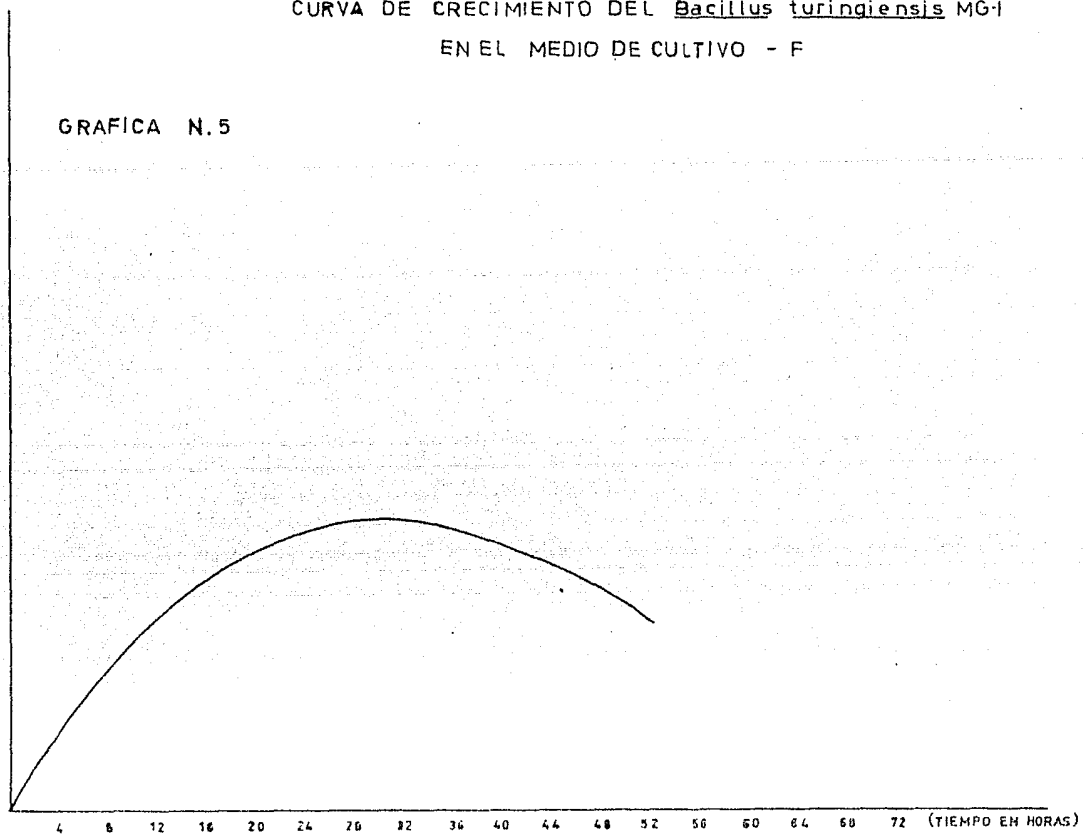


Tabla No. 6

Resultados del crecimiento del Bacillus thuringiensis en el medio de cultivo C, realizado en fermentador marca Wrigley 5 ST de 2 l de capacidad y un volumen de trabajo de un litro, agitación de 340 rpm, aereación 1 vvm, temperatura de 32°C y un inóculo de 1.5% (v/v).

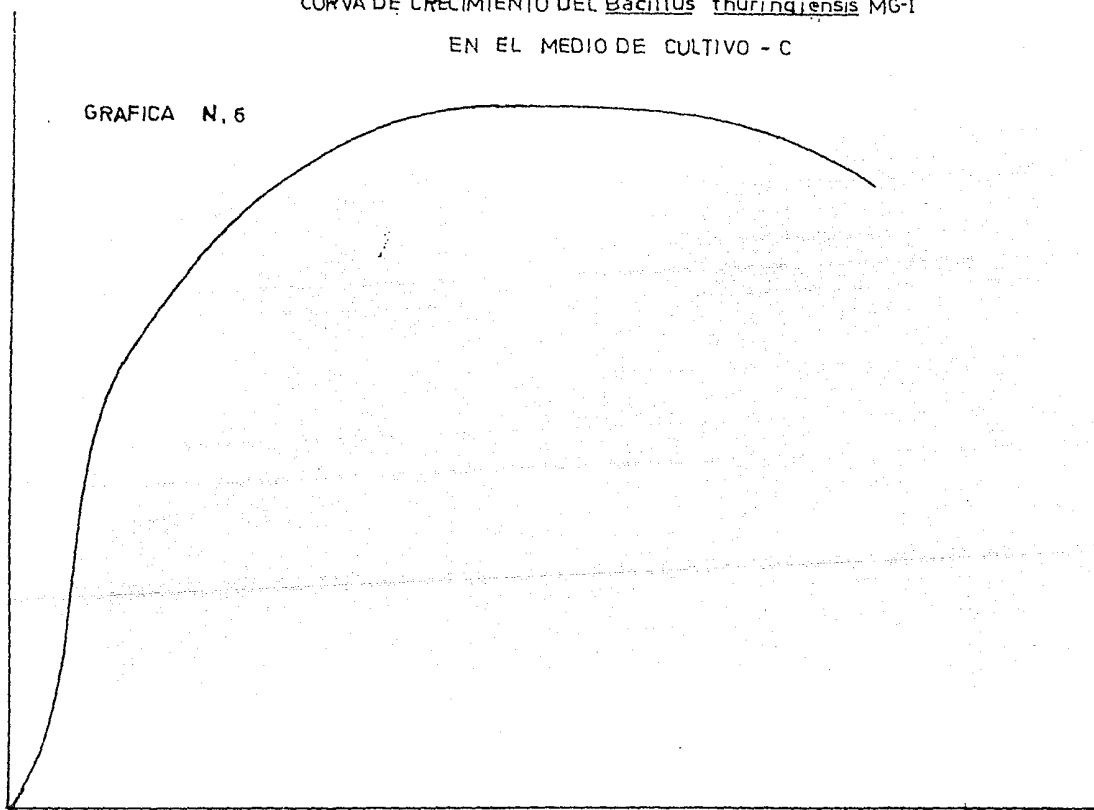
TIEMPO (hrs)	DENSIDAD OPTICA (Absorbancia)
0	0.0
1	0.07
2	0.10
4	0.28
5	0.30
6	0.75
8	0.89
10	0.95
24	1.50
25	1.50
26	1.50
28	1.50
30	1.50
60	1.50
62	1.45
66	1.42
68	1.30

ABS

CURVA DE CRECIMIENTO DEL *Bacillus thuringiensis* MG-I
EN EL MEDIO DE CULTIVO - C

GRAFICA N. 6

1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20



4 6 12 18 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72 (TIEMPO EN HORAS)

Tabla No. 7

Resultados de cuenta viable en placa del Bacillus thuringiensis en los diferentes medios de cultivo, con un tiempo de incubación de 24 horas y una temperatura de 32 °C.

MEDIOS DE CULTIVO	CUENTA BACTERIANA POR ml DE MEDIO	No. DE EXPERI- MENTOS
B	1.69×10^7	6
C	1.03×10^6	6
D	2.82×10^5	6
E	3.25×10^5	6
F	1.00×10^5	6

NOTA.

Debido a que no fué posible estabilizar el espectrofotómetro para realizar la curva de crecimiento del medio de cultivo A, ya que este contenía un gran número de partículas suspendidas (finos), se excluyó tal experimento del proyecto.

RESULTADOS DE LAS VALORACIONES INMUNOLOGICAS

Tabla No. 8

Resultados de la evaluación comparativa del porcentaje del bazo en relación al peso corporal de las ratas tratadas con el complejo espora-cristal con las ratas control.

RATAS TRATADAS		RATAS CONTROL	
No	BAZO % EN PESO	No	BAZO % EN PESO
1	0.36	1	0.49
2	0.27	2	0.37
3	0.32	3	0.40
4	0.41	4	0.70
5	0.29	5	0.33
6	0.46	6	0.48
7	0.37		
8	0.40		

Las ratas tratadas presentan:

$$\bar{X} = 0.36$$

$$S = 0.1322$$

Las ratas control presentan:

$$\bar{X} = 0.46$$

$$S = 0.064$$

$P > 0.05$ no significativo (Mann Whitney)

Tabla No. 9

Resultados de la evaluación comparativa del porcentaje del hígado en relación al peso corporal de las ratas tratadas con el complejo espasa-cristal con las ratas control.

RATAS TRATADAS		RATAS CONTROL	
No	HIGADO % EN PESO	No	HIGADO % EN PESO
1	3.9	1	3.0
2	3.9	2	4.1
3	3.6	3	3.8
4	3.8	4	4.1
5	3.8	5	4.1
6	3.8	6	3.8
7	4.0	7	3.6
8	3.5	8	3.5
9	3.2	9	3.7
10	3.4	10	3.9
11	3.2		
12	3.2		
13	3.2		
14	3.4		
15	2.9		

Las ratas tratadas presentan:

$$\bar{X} = 3.52$$

$$S = 0.3363$$

Las ratas control presentan:

$$\bar{X} = 3.8$$

$$S = 0.3247$$

$P > 0.05$ no significativo (Mann Whitney).

Tabla No. 10

Resultados de la evaluación comparativa del número de leucocitos por milímetro cúbico de las ratas tratadas con el complejo espora-cristal con las ratas control.

RATAS TRATADAS		RATAS CONTROL	
No.	No. DE LEUCOCITOS	No.	No. DE LEUCOCITOS
1	4000	1	8600
2	6500	2	6700
3	5300	3	6500
4	4000	4	7300
5	3500	5	7900
6	2500	6	5400
7	4300	7	5700

Las ratas tratadas presentan:

$$\bar{X} = 4300 \quad S = 1.284$$

Las ratas control presentan:

$$\bar{X} = 6870 \quad S = 1.1499$$

$P < 0.05$ si es significativo (Mann Whitney)

Tabla No. 11

Resultados de la evaluación comparativa del número de células formadoras de anticuerpos de las ratas tratadas con el complejo espora-cristal con las ratas control.

RATAS TRATADAS		RATAS CONTROL	
No.	No. DE CEL. FORMADORAS DE ANTICUERPOS	No.	No. DE CEL. FORMADORAS DE ANTICUERPOS
1	90	1	390
2	300	2	360
3	90	3	420
4	120	4	270
5	60	5	420
6	60	6	420
7	30	7	180

Las ratas tratadas presentan:

$$\bar{X} = 107.14$$

$$S = 2.99$$

Las ratas control presentan:

$$\bar{X} = 351.3$$

$$S = 3.09$$

$P < 0.05$ si es significativo

(Mann Whitney)

Tabla No. 12

Resultados de la evaluación comparativa del título de la microhemaglutinación de las ratas tratadas con el complejo espora-cristal con las ratas control.

RATAS TRATADAS		RATAS CONTROL	
No.	TITULO DE LA MICRO-HEMAGLUTINACION	No.	TITULO DE LA MICRO-HEMAGLUTINACION
1	1:2	1	1:8
2	1:4	2	1:4
3	1:2	3	1:8
4	1:4	4	1:8
5	1:4	5	1:2
6	1:2	6	1:4

Las ratas tratadas presenta:

$$\bar{X} = 3$$

$$S = 1.0954$$

Las ratas control presentan:

$$\bar{X} = 5.6$$

$$S = 2.3868$$

$P > 0.05$ no es significativo

(Mann Whitney)

Tabla No. 13

Resultados de la evaluación comparativa de las unidades - 50% hemolíticas de las ratas tratadas con el complejo esporo-- cristal con las ratas control.

RATAS TRATADAS		RATAS CONTROL	
No.	UNIDADES 50% HEMOLITICAS.	No.	UNIDADES 50% HEMOLITICAS.
1	42,85	1	85.71
2	75.00	2	73.17
3	37.50	3	61.22
4	49.95	4	75.00
5	81.08	5	76.92
6	85.71		
7	17.04		
8	26.78		

Las ratas tratadas presentan:

$$\bar{X} = 52.0 \quad S = 25.8$$

Las ratas control presentan:

$$\bar{X} = 74.39 \quad S = 8.8$$

$P > 0.05$ no es significativo (Mann Whitney)

Resultados de Anafilaxia Pasiva Cutánea.

a) El suero de las ratas tratadas con el complejo espora-cristal mostraron actividad de anticuerpos heterocitotrópico cuando se administró por vía subcutánea a cobayos sanos. El título obtenido fue de 10. El suero de las ratas control no -- mostró esa actividad.

b) El suero de las ratas tratadas con el complejo espora-cristal mostraron una actividad homocitotrópica, cuando se administró por vía subcutánea a ratas sanas. El título obtenido fue de 10 . El suero de las ratas control no mostró esta actividad.

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

a) La cuenta viable del Bacillus thuringiensis MG-1 en los medios de cultivo D, E y F mostraron una cuenta viable muy similar (ver Tabla No. 7), en tanto que los medios de cultivo B y C ofrecen un mayor rendimiento del complejo espora-cristal. El medio de cultivo B da un mayor índice de producción (1.69×10^7 bacterias / ml), sin embargo la creciente demanda de la harina de soya, componente intrínseco de este medio, ha elevado en forma considerable el costo de este medio de cultivo, por lo cual y en vista de los resultados obtenidos en el medio de cultivo C (ver Tabla No. 7), éste mostró ser el más adecuado para la explotación del complejo espora-cristal, tanto por su bajo costo, como por su alto rendimiento.

b) El comportamiento inmunológico del complejo espora-cristal en las ratas tratadas con una dosis de 10 mg/kg de peso corporal mostró que; al final del tratamiento (40 días), las ratas tratadas no mostraron con respecto a las ratas control hepatomegalia ni esplenomegalia (ver Tablas 8 y 9). La cuenta de leucocitos en el bazo mostró una diferencia significativa -- con respecto a las ratas control (ver Tabla No. 10). El conteo de células formadoras de anticuerpos (método Jerne) mostró una diferencia significativa entre ambos grupos de ratas (ver Tabla No. 11). La cuantificación del título de unidades 50% hemolíticas no mostró una diferencia estadística entre ambos grupos (ver Tabla No. 13). En la producción de anticuerpos medidos por

micro hemaglutinación, no se observó una diferencia estadística entre ambos grupos de ratas. (ver Tabla No. 12). El suero de las ratas tratadas mostraron reacción de hipersesibilidad en ratas de la misma especie como también en cobayos albinos hasta en un título de 10.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

a) El medio de cultivo B, en el que se utilizó la harina de soya, permite producir cantidades importantes del complejo espora-cristal, sin embargo el costo de esta materia prima hace de este medio no costeable.

b) También el medio de cultivo C rinde cantidades importantes del complejo espora-cristal, pero con un costo menor al medio de cultivo B, ya que no incluye a la harina de soya entre sus componentes.

c) Las materias primas nacionales permiten obtener buenos rendimientos del complejo espora-cristal, reduciendo apreciablemente sus costos de producción.

d) Las ratas tratadas con el complejo espora-cristal bajo las condiciones establecidas previamente, no presentan al final del periodo de tratamiento ni hepatomegalia ni esplenomegalia.

e) El complejo espora-cristal mostró que podía disminuir el número de leucocitos contenidos en el bazo de las ratas tratadas.

f) El bioinsectisida no mostró tener en el tiempo señalado influencia sobre la concentración del complemento medido en unidades 50% hemolíticas.

g) En las ratas tratadas no se observó una disminución en la producción de anticuerpos medidos por microhemaglutinación.

h) Los anticuerpos generados por las ratas tratadas mos-

traron contener los tipos Ig E homocitotrópicos e Ig G heterocitotrópicos, con título de 10.

i) El complejo espora-cristal reduce el número de células formadoras de anticuerpos medido por el método de Jerne.

APENDICE

APENDICE

Probabilidad de Mann Whitney

1) Se tienen dos grupos, uno de ratas control y otras de ratas tratadas.

2) Cada grupo esta determinado por cierto número de elementos, que se numeran n_1 y n_2 respectivamente.

3) A cada elemento de ambos grupos se le enumerará en orden progresivo, de acuerdo a los valores que presentan, asignandose una numeración como la siguiente; 1, 2, 3, ..etc.

4) En el caso de que dos o más elementos sean iguales, los números correspondientes al orden progresivo, se suman entre si y se dividen entre el número de elementos, es decir, si el número que les correspondían era 4, 5 y se suman estos y se dividen entre el número de elementos, en este caso es tres, y a éstos se les asigna el valor obtenido, el siguiente elemento del orden progresivo se le pone el número siguiente, en este caso es el número 7 y así sucesivamente.

5) Obtenido el orden creciente de ambos grupos, se procede a sumar los números de orden creciente de cada grupo por separado.

6) A la suma de cada grupo se le asigna la letra R ; R_1 -- corresponde al grupo de los control y R_2 al de las tratadas.

7) Se aplica la siguiente relación para encontrar U_1 y U_2

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 (n_2 + 1) - R_2$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 (n_1 + 1) - R_1$$

Tabla de Mann Whithney.

	n_2																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2												1	1	1	1	1	2	2	2	2
3						1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4					1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13
5				1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6			1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27
7			1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
8			2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41
9			2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48
10			3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55
11			3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62
12		1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69
13		1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76
14		1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	67	74	78	83
15		1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90
16		1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98
17		2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	67	75	81	87	93	99	105
18		2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112
19		2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119
20		2	8	13	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fudenberg, H.H. et al , "Inmunología Clínica" Ed El Manual Moderno 2a. ed México 1980.
- 2) Hudson, L. Hay F.C. "Practical Immunology" Ed Blackwell Scientific Publication Osney mead, 2a ed Oxford Inglaterra, 1976.
- 3) Rozan C. "Hematología" Ed. Salvat 3a ed México 1981.
- 4) Coulch, T.L., Rose, D.A.; Production and Utilization-- of Bacillus thuringiensis. Biotechnology and Bioengineering, -- Vol . XXII. 1297-1304, 1980.
- 5) Dulmage, H.T.; Correa, J.A.; Martínez, A.J.: Coprecipitation whit lactosa as a Means of Recovering the Spore-Crystal Complex of Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology. Vol XV; 15-20, 1970.
- 6) Globerg I., Sneh B., Battat E., and Klein D. Optimization of a Medium for High Yield of Spore-Crystal Preparation of Bacillus thuringiensis Effective Again The Egyptian cotton - leaf worm Spodoptera littoralis bois. Biotechnology Letters- Vol II ; 419-426, 1980.
- 7) Norris J.R.; Microbial Control of Pest Insec . Comparison to Microbiology. Selected Topics for Futher Study Longman New 1a ed, 459-470 1978.
- 8) Prasad, S.S.S. V. and Shethna Y.L.; Biochemistry & Biological Activities of Proteinaceous Crystal of Bacillus thuringiensis. J.Scient. Ind. Res. Vol XXXV, 626-632 1976.
- 9) Wang, D.L.C.; Cooney, C.L.; Demain, A.L.; Dunill, P.; -- Humphey, A.E.; Lilly M.D.; Fermentations & Enzyme Technology Willey Interscience Ed., 2a ; 194-211, 1979.