

3  
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

*PRODUCCION Y ENSAYO DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL  
CONTROL DE INSECTOS PLAGA Y GRANOS  
DE ALMACENAMIENTO*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A:

**BIRMANIA HEREDIA RIVERA**

*DIRECTOR DE TESIS:*

*DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN*

*México, D. F.*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1994



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 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.

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. bajo la dirección del Dr. José Edgardo Escamilla Marván.

U N A M

México, D. F. 1994

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	3
1.- Antecedentes históricos.....	3
2.- Generalidades de <i>B. thuringiensis</i> .....	4
3.- Toxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
4.- Proceso infeccioso.....	8
5.- Especificidad de las $\delta$ -endotoxinas.....	9
6.- Mecanismo de acción de las $\delta$ -endotoxinas.....	13
7.- Daños ocasionados por insectos-plaga.....	17
8.- Caracterización de <i>Ephestia cautella</i> (Walker).....	18
9.- Caracterización de <i>Sitotroga cerealella</i> .....	20
II. OBJETIVOS.....	22
III. MATERIAL Y METODOS.....	23
1.- Material biológico.....	23
2.- Reactivos químicos.....	23
3.- Producción a escala de laboratorio de <i>B. thuringiensis</i> . 23	
4.- Selección del medio de cultivo.....	24
5.- Preparación del inóculo.....	26
6.- Recuperación del complejo espóra-cristal.....	27
7.- Determinación de colonias por conteo en placa.....	28
8.- Establecimiento del insectario.....	28
9.- Formulaciones bacterianas.....	30
10.- Pruebas de toxicidad.....	30
IV. RESULTADOS.....	32
1.- Selección de un medio de cultivo para el crecimiento	

	de <i>B. thuringiensis</i> .....	32
2.-	Efecto del amortiguamiento por CaCO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> sobre la esporulación de <i>B. thuringiensis</i> .....	34
3.-	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y esporulación de <i>B. thuringiensis</i> .....	36
4.-	Escalamiento del bioinsecticida a nivel de fermentador (25 l).....	38
5.-	Recuperación del complejo espora cristal.....	40
6.-	Termo-resistencia de las preparaciones de esporas de <i>B. thuringiensis</i> Obtenidas en el medio.....	41
7.-	Crecimiento de las 4 variedades de <i>B. thuringiensis</i> .....	42
8.-	Desarrollo de <i>Ephestia cautella</i> y <i>Sitotroga cerealella</i> en el insectario.....	44
9.-	Pruebas de toxicidad de las diferentes variedades de <i>B. thuringiensis</i> sobre <i>Ephestia cautella</i> .....	46
10.-	Pruebas de toxicidad de las diferentes variedades de <i>B. thuringiensis</i> sobre <i>Sitotroga cerealella</i> .....	48
V	DISCUSION.....	52
VI	CONCLUSIONES.....	61
VII	PERSPECTIVAS.....	63
VIII	BIBLIOGRAFIA.....	65

**RESUMEN.**

*Bacillus thuringiensis* se usa como insecticida para el control de insectos-plaga. Su actividad radica en un cristal proteínico formado durante la esporulación. Este cristal es tóxico únicamente después de que ha sido ingerido y activado por la larva dañando principalmente el intestino medio de los insectos sensibles. Los objetivos planteados en este trabajo fueron: a) la selección de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *B. thuringiensis*, elaborado a base de fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo; b) Estudiar la capacidad de crecimiento y esporulación en medios de diferente composición (como fuentes de carbono y nitrógeno), para lo cual también se estudio el crecimiento de la bacteria a temperaturas de 30, 35 y 40 °C, así como la pasteurización de las esporas; c) El establecimiento de un insectiario para el estudio de la toxicidad de la preparación del complejo espора-cristal, y d) Determinar la toxicidad del complejo espора cristal en plagas de granos de almacenamiento (*Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*).

Se estudiaron medios elaborados a base de harina de arroz, harina integral de trigo, harina integral de centeno, harina de cebada, harina de soya y melaza, así como sus combinaciones. El rendimiento se midió como el número de esporas viables (por el método de conteo en placa de agar). Se encontró que el medio compuesto por harina de soya, melaza y bifosfato de potasio fue un medio adecuado para el crecimiento de *B. thuringiensis* ya que produjo un rendimiento de  $4.3 \times 10^{10}$  esporas/ml. El complejo espора-

crystal fue separado por un proceso de centrifugación y floculación obteniendo una recuperación total por ambos métodos. En las curvas de crecimiento hechas a diferentes temperaturas se encontró que las temperaturas de 30-35°C fueron las más adecuadas para el crecimiento de la bacteria. El fenómeno de pasteurización no alteró significativamente la viabilidad de las esporas (77.8 %). Las pruebas de toxicidad realizadas sobre las especies plaga *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*, demostraron que el bioinsecticida tiene capacidad virulenta para destruir a dichas plagas de granos en almacenamiento.

Se concluye que el medio seleccionado produjo un alto rendimiento de esporas viables, y que su producción puede ser factible a una escala mayor para su uso en la agricultura.

## INTRODUCCION.

### 1.- Antecedentes históricos.

Uno de los problemas más importantes al que se enfrentan actualmente las naciones del mundo, es la producción de granos y otros alimentos. Para solucionar este problema, el hombre ha desarrollado afanosamente varias estrategias; por ejemplo, ha modernizado las técnicas de cultivo y ha trabajado en la producción de semillas mejoradas. Sin embargo, estos esfuerzos se han visto anulados por la existencia en el medio ambiente de varias especies de insectos poderosamente nocivos, que actúan como parásitos o como plagas atacando constantemente no solo a los campos de cultivo, sino también a los depósitos de granos almacenados.

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 en su aplicación, causan problemas de contaminación en los alimentos, agua y medio ambiente. Además el espectro de acción de estos plaguicidas es muy amplio, ya que no solo afectan a los insectos dañinos, sino también a los que no lo son, incluyendo la flora y la fauna silvestre benéfica de las cosechas (Aranda, 1987). 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.

Los padecimientos por enfermedades infecciosas en poblaciones de insectos, se conocen desde tiempos remotos, no es aventurado



afirmar que el registro histórico de tales enfermedades se inició con Aristóteles, quien en su *Historia Animalium* hizo la descripción de varios padecimientos de la abeja de la miel (Huffaker y Messenger 1976).

Sin embargo, fue hasta 1835, que Agostino Bassi inició la entomopatología como ciencia experimental. Durante sus estudios se percató de que el hongo *Beauveria bassiana* era el causante de la infección en el gusano de la seda (*Bombix mori*); y es en sus escritos donde se encuentra la primera sugerencia de que los microorganismos podrían ser usados para el control de insectos-plaga (Huffaker y Messenger 1976). No obstante, es hasta hace pocos años que los métodos en esta práctica comenzaron a jugar un papel importante. La toma de conciencia sobre el desastroso impacto que están causando los pesticidas químicos al ecosistema, es una de las causas del gran interés que está cobrando el estudio y la industrialización de insecticidas microbianos (Aranda 1987, Feitelson et al. 1992).

## 2.- Generalidades de *B. thuringiensis*.

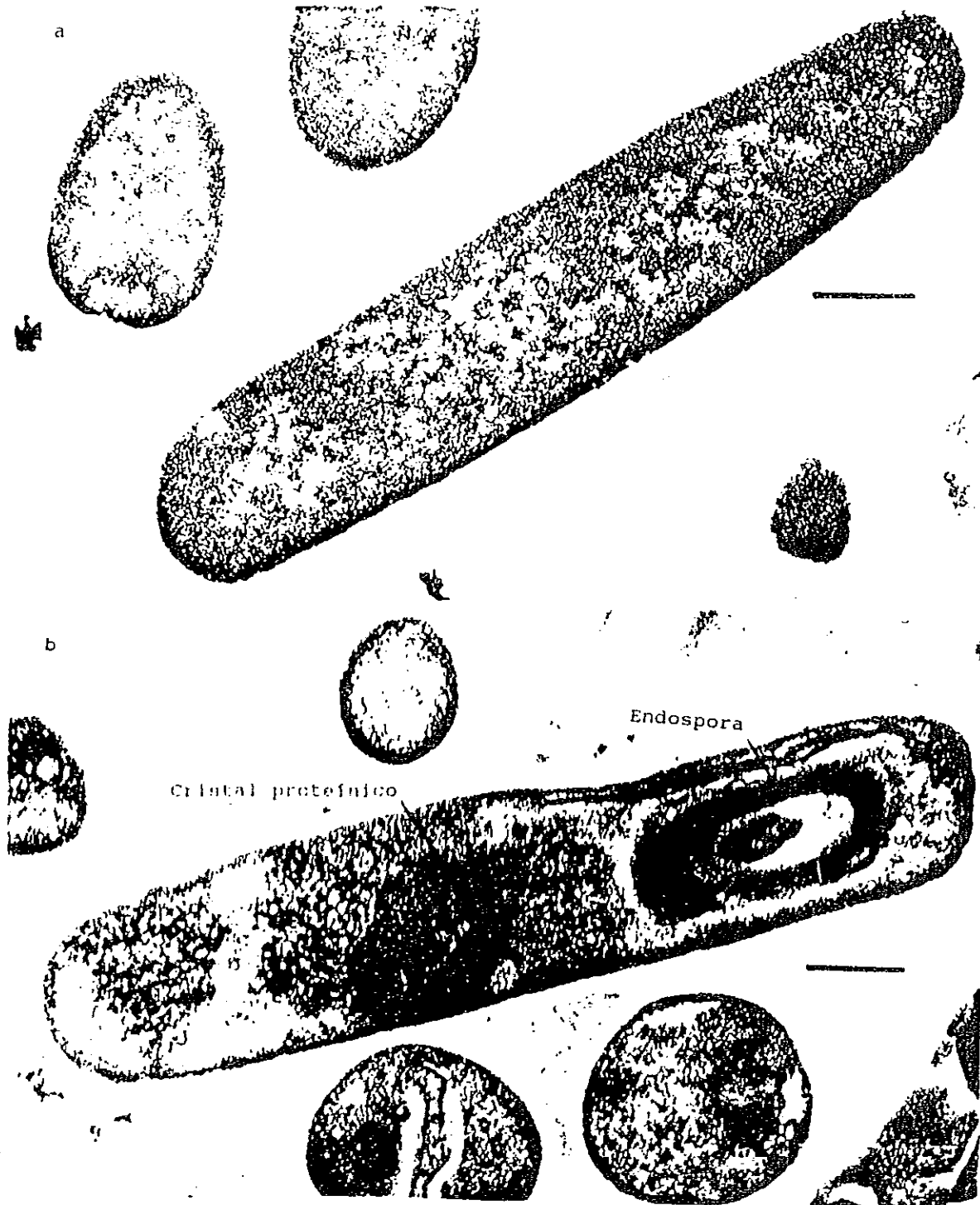
El uso de bacterias entomopatógenas, es uno de los métodos biológicos más atractivos debido a sus grandes posibilidades de desarrollo y aplicación. Aunque a la fecha, se conocen más de 100 especies bacterianas que han sido usadas como agentes patógenos de insectos, solamente unas pocas se han utilizado comercialmente como insecticidas. En su mayoría pertenecen al género *Bacillus*; Como son *B. popilliae* y *B. lentimorbus*, responsables de los tipos

A y B de la enfermedad lechosa del escarabajo japonés (*Popillia japonica*) y las diversas cepas de *B. thuringiensis*, que afectan un gran número de insectos lepidópteros, hemípteros, dípteros y coleópteros (Escamilla 1979, Feitelson et al. 1992). Para que un insecticida bacteriano sea eficaz, debe ser estable durante el almacenamiento y su dispersión en el campo de cultivo. Por ello, se ha puesto especial atención en las bacterias que producen formas latentes o esporas, capaces de sobrevivir fuera del huésped por períodos indefinidos y bajo condiciones ambientales extremas, como es el caso de *B. thuringiensis*.

La formación de esporas en *B. thuringiensis*, normalmente se lleva a cabo al final de la fase de crecimiento logarítmica (figura 1a), este crecimiento cesa por el agotamiento de nutrientes, entonces en vez de dividirse, cada célula produce una spora intracelular llamada endospora, figura 1b (Huffaker y Messenger 1976). Durante este proceso, la bacteria produce una inclusión proteínica paraesporal, la cual, es el cristal ó protoxina que constituye aproximadamente el 30 % del peso seco de la spora y consiste de varias proteínas de 130-160 kDa (Barton et al. 1987, Whiteley y Schnepf 1986).

Una vez que finaliza la formación del complejo spora-cristal, la célula madre se lisa para liberar una mezcla de esporas y cristales que juntos constituyen el insecticida microbiano (Pao-intara et al. 1988).

Figura 1. Micrografía electrónica de la célula bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, a) en la fase logarítmica y b) en la fase esporulativa, donde se puede apreciar el complejo espora-cristal. La barra es igual a 1.0  $\mu\text{m}$ .

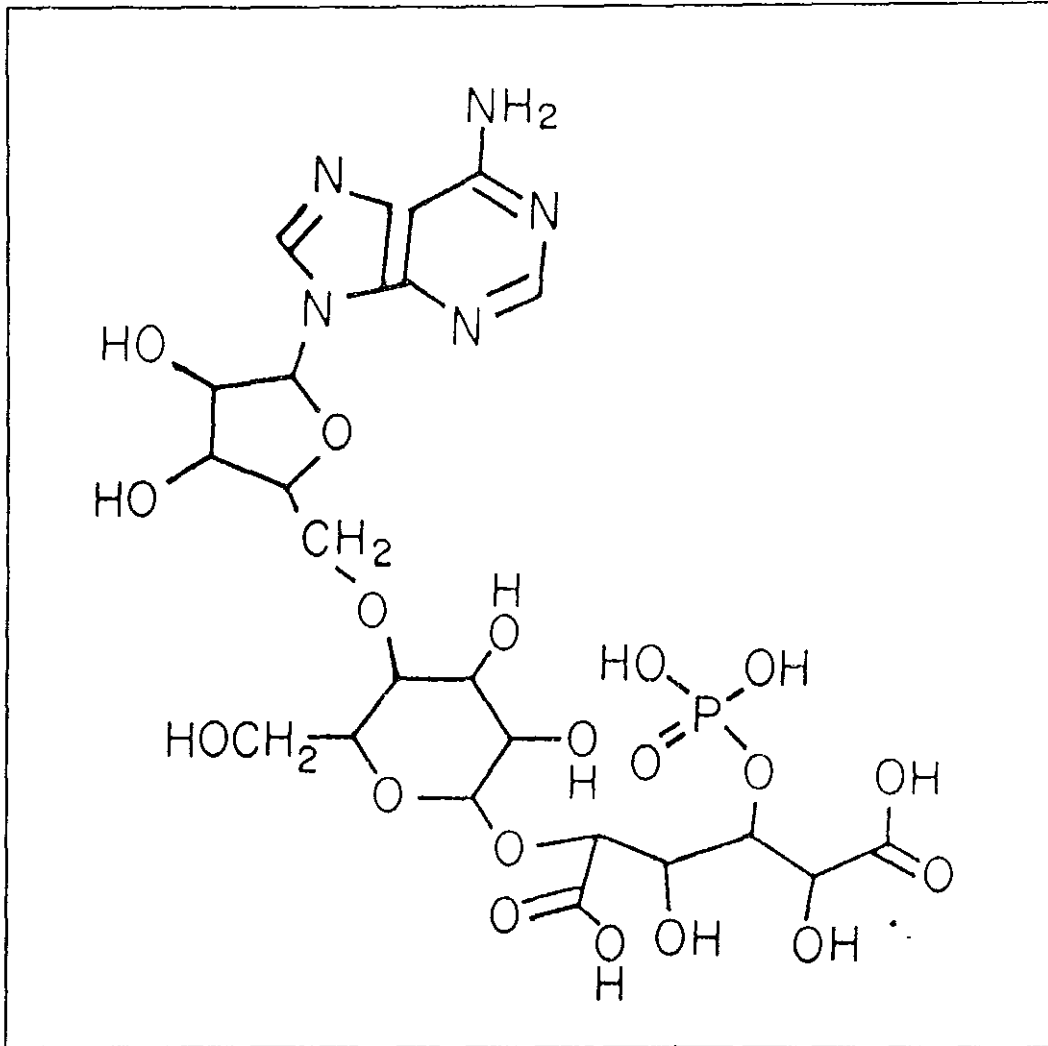


### 3.- TOXINAS PRODUCIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.

*B. thuringiensis*, produce cuatro tipos de toxinas: la  $\alpha$ -exotoxina, la  $\tau$ -exotoxina, la  $\beta$ -exotoxina y la  $\delta$ -endotoxina (Himeno 1987, Whiteley y Schnepf 1986).

La  $\alpha$ -exotoxina, es una lecitinasa o fosfolipasa C, lábil al calor; la  $\tau$ -exotoxina, se piensa que podría ser una lecitinasa, quitinasa ó proteasa (Himeno 1987, Whiteley y Schnepf 1986); la  $\beta$ -exotoxina, es un derivado de un nucleótido de adenina, compuesta por una molécula de adenosina, una glucosa y un ácido alárico, ( figura 2) , dicha composición la hace estable al calor (Mahillon et al. 1989, Sourtty et al. 1987). Esta toxina, inhibe las etapas terminales de la biosíntesis del RNA. Su actividad, al igual que las otras toxinas, se ha registrado principalmente en las etapas tempranas del desarrollo larvario de lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, isópteros y ortópteros (Herbert y Harper 1987, Hoy y Ouyang 1987); y la  $\delta$ - endotoxina, es un cristal de naturaleza glicoproteínica (Aronson et al. 1986); es la proteína que más atención ha recibido en los últimos años debido a sus grandes posibilidades de industrialización (Feitelson et. al. 1992).

Figura 2. Estructura de la  $\beta$ -toxina de *Bacillus thuringiensis*. Está compuesta por una molécula de adenosina, una glucosa y un ácido alárico.



#### 4.- PROCESO INFECCIOSO.

Las especies de insectos susceptibles a las diferentes variedades de *B.thuringiensis* lo son sólo durante los estadios tempranos de la fase larvaria, siendo la vía oral el camino habitual para la infección, y el complejo espora-cristal el agente infeccioso (Escamilla 1979, Hoy y Ouyang 1987).

El proceso infeccioso es relativamente simple; después de que el complejo es ingerido por las larvas, la toxina causa severos daños a las células de la pared intestinal, que dan lugar a que los contenidos del tubo digestivo y el hemocele se mezclen, haciendo que el pH del jugo gástrico disminuya. Con ello se dan las condiciones óptimas para que las esporas germinen y formen las células vegetativas primarias, que invaden el debilitado cuerpo del hospedero. Estas células se multiplican vigorosamente hasta causar al huésped una septicemia que termina matándolo. En la mitad del proceso, la bacteria comienza a esporular y al morir la larva, se encuentra empacada con millones de esporas capaces de continuar la propagación de la enfermedad.

##### 5.- ESPECIFICIDAD DE LAS $\delta$ -ENDOTOXINAS.

De acuerdo con la propiedad antígeno flagelar (antígeno-H), contiene 28 variedades agrupadas en 19 serotipos distintos (Himeno 1987, Bay y Degheele 1988), (tabla I). Cada variedad se caracteriza por ser específica de determinadas especies de insectos; sin embargo, con base en el tipo de  $\delta$ -endotoxina producida se han clasificado en 4 grupos, (tabla II) : 1) específicas de lepidópteros, 2) específicas de lepidópteros y dípteros, específicas de coleópteros y, 4) específicas de dípteros (Nakamura et al. 1990, Feitelson et al. 1992) . La tabla III proporciona información referente a los insectos plaga del grupo de los lepidópteros sensibles al bioinsecticida, así como los nombres comunes de dichos insectos-plaga. Esta tabla es importante debido

a que el agricultor conoce dichas plagas más frecuentemente por los nombres comunes.

Tabla I. Serotipos y variedades de *Bacillus thuringiensis*.  
Agrupación de 28 variedades en 19 serotipos.

SEROTIPOS	CEPAS
1	<i>thuringiensis</i>
2	<i>finitimus</i>
3a	<i>alesti</i>
3a, 3b	<i>kurstaki</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>
4a, 4b	<i>kenyae</i>
5a, 5b	<i>galleriare</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>
6	<i>subtoxicus</i>
6	<i>entomocidus</i>
7	<i>aizawai</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>
8b, 8d	<i>nigeriae</i>
9	<i>tolworthi</i>
10	<i>darmstadiensis</i>
11a, 11b	<i>toummanoffi</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>
12	<i>thompsoni</i>
13	<i>pakistani</i>
14	<i>israelensis</i>
15	<i>indianae</i>
16	<i>tohokuensis</i>
17	<i>kumamotoensis</i>
18	<i>tochigiensis</i>
19	<i>yunnanensis</i> ( <i>wuhanensis</i> )

Frecuentemente se ha dicho, que la especificidad es el resultado de las diferencias cuantitativas, en la producción de las  $\delta$ -endotoxinas entre las distintas variedades. No obstante, en ciertos casos se asocia con la composición proteínica del cristal nativo. Como es el caso de los cristales que contienen proteínas

con actividad dual (tóxicas para lepidópteros y dípteros), ó el de la variedad *israelensis*, con proteínas de diversa especificidad tóxica (Chungjatupornchai et al. 1988, Nakamura et al. 1990, Delècluse et al. 1991) . Por otra parte, se sugiere, que esta especificidad se debe a la composición bioquímica del intestino medio larvario de los insectos. En particular, al papel que desempeñan el pH y las proteasas sobre el desdoblamiento y solubilización de las  $\delta$ -endotoxinas (Haider y Ellar 1987). Haider y Ellar en 1988, demostraron que la especificidad no solamente se debía a una proteólisis diferencial de la proteína; sino también a la presencia de receptores específicos en las células epiteliales del intestino de los insectos. Ensayos realizados con vesículas del epitelio intestinal de la larva *Pieris brassicae* y toxinas marcadas radiactivamente, apoyan una vez más la existencia de receptores que se unen con cinética de saturación y alta afinidad, a determinadas  $\delta$ -endotoxinas (Hofmann et al. 1988a, Vanrie et al. 1989, Delècluse et al. 1991).



Tabla II. Agrupación de las diferentes variedades de *B. thuringiensis* con base en el tipo de  $\delta$ -endotoxina producida.

GRUPOS	1	2	3	4
VARIEDADES	mayoría	<i>kurstaki</i> <i>kenya</i> <i>tolworthi</i> <i>aizawai</i>	<i>tenebrionis</i> <i>san diego</i> EG2158	<i>israelensis</i> <i>kyushuensis</i> <i>morrisoni</i> <i>sotto</i>
FORMA	bipiramidal	cuboidea	romboidea	variada
SUBUNIDADES	1 a 3	1	1	4
PM (Kda)	50 a 160	130 y 65	64	27 a 140
ESPECTRO TOXICO	lepidópteros	lepidópteros y dípteros	coleopteros	dípteros

Tabla III. Insectos-plaga sensibles a la proteína cristal de las variedades de *B. thuringiensis* que pertenecen al grupo 1.

INSECTOS LAEPIDOPTEROS	
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN
<i>Alabama arguillacea</i>	Gusano Medidor
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Gusano Terciopelo
<i>Colias eurytheme</i>	Gusano de la Alfalfa
<i>Diatraea sacchralis</i>	Gusano Barrenador del Tallo
<i>Estigmene acraea</i>	Gusano Peludo
<i>Harrisina americana</i>	Descarnador de la Vid
<i>Heliotis zea</i>	Gusano Bellotero
<i>Heliotis virescens</i>	Gusano tabaquero
<i>Manduca sexta</i>	Gusano del Cuerno
<i>Manduca quinquemaculata</i>	Gusano del cuerno
<i>Papilio cresphontes</i>	Gusano Perro del Naranja
<i>Peridoma saucia</i>	Gusano Trozador
<i>Pieris brassicae</i>	Mariposita Blanca
<i>Pieris rapae</i>	Mariposita Blanca
<i>Plutella xylostella</i>	Palomilla Dorso de Diamante
<i>Plutella maculipennis</i>	Palomilla Dorso de Diamante
<i>Prodenia spp</i>	Gusano Trozador
<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Gusano Soldado
<i>Psedoplusia includens</i>	Gusano Terciopelo/ G. Falso Medidor
<i>Spodoptera exigua</i>	Gusano Soldado
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Gusano Cogollero
<i>Trichoplusia ni</i>	Gusano Falso medidor

#### 6.- MECANISMO DE ACCION DE LAS $\delta$ -ENDOTOXINAS.

El mecanismo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas ha sido, por mucho tiempo, objeto de controversia. Inicialmente, se sugería que se comportaban de manera similar a la valinomicina, debido a que causaba un incremento en la concentración de  $K^+$  y del pH en la hemolinfa y una reducción en el pH de jugo gástrico del intestino

medio del insecto (Himeno 1987). También se pensó que actuaban como desacoplantes de la fosforilación oxidativa, apoyados en la observación de que la captación de oxígeno y la producción de ATP en la mitocondria eran inhibidas por las  $\delta$ -endotoxinas (Himeno 1987). Sin embargo, todo parece indicar que la toxina no causa ninguno de los efectos antes mencionados; más bien, ésta actúa a nivel de la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino medio larvario, ocasionándole serios daños. Ensayos histopatológicos realizados en larvas después del tratamiento con toxinas, muestran que éstas se adhieren a las microvellosidades del intestino del insecto (Reisner et al. 1989). Se presume, que para que la toxina ejecute su acción, debe interactuar con un receptor específico de la membrana (Hofmann 1986a,b). Al respecto, se encontró que el receptor es sensible al tratamiento con proteasas ó glicosidasas, sugiriendo que es una glicoproteína (Haider y Ellan 1988, Knowles et al. 1984). Todavía no existe un acuerdo, en cuanto a los eventos que ocurren inmediatamente después de que la toxina se une al receptor. Se piensa, que cuando la toxina se une con el receptor, se inserta la porción amino-terminal de la proteína tóxica en la bicapa lipídica de las membranas para formar un poro transmembranal (Wolfersberger 1989a). Knowles B. H. y D.J. Ellar (1987), propusieron que la formación de poros en la membrana, rompen el equilibrio osmótico coloidal de la célula, es decir, se pierde el control de la permeabilidad membranal: se equilibran la concentraciones de iones y de pequeñas moléculas através de la membrana, en seguida se

lleva a cabo un influjo osmótico de agua y como consecuencia, la célula se hincha y sufre lisis. Para proponer ésta hipótesis, se basaron en las siguientes observaciones: las moléculas pequeñas se escapan antes que las grandes, los protectores osmóticos (carbohidratos) retardan o inhiben la citólisis, el hinchamiento precede a la lisis y finalmente, el poro inducido por la toxina (de un diámetro de aproximadamente 0.5-1.0 nm) permite el equilibrio de iones, pero no el escape de macromoléculas citoplasmáticas (proteínas y ácidos nucleicos).

Las evidencias bioquímicas, indican que éste mecanismo parece ser general, ya que se ha observado que diferentes toxinas de *B. thuringiensis* actúan por el mismo mecanismo de acción (Sacchi et al. 1986, Crawford y Harvey 1988, Knowles et al. 1989, Wolfersberger 1989b).

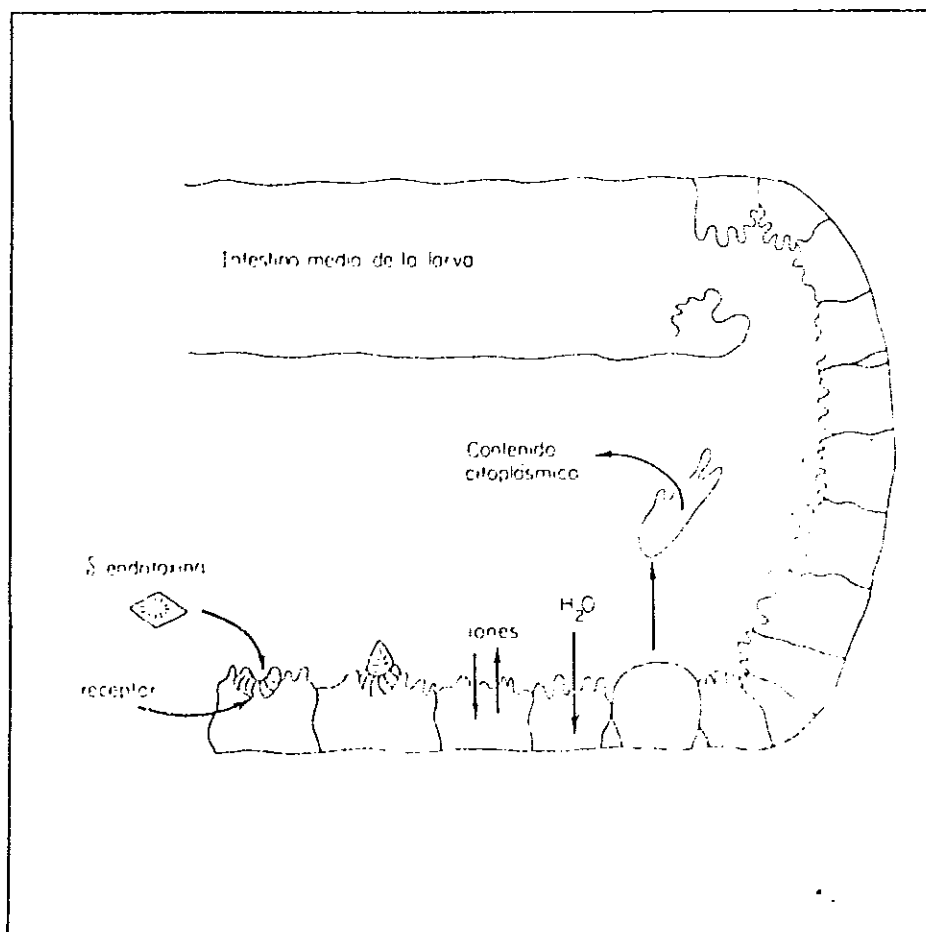
Maddrell et al. (1988) llevó a cabo estudios cinéticos con la toxina de 27 Kda de *B. thuringiensis* variedad *israelensis*, en los túbulos de Malpigi del insecto *Rhodnius prolixus*, sus resultados demostraron que durante las primeras etapas de interacción, las moléculas se unen progresiva e irreversiblemente a las membranas. Esto conduce a la formación de complejos ó agregados en un sólo sitio, de tal forma que ésta aglomeración logra desestabilizar a los lípidos de la membrana para insertarse y formar un poro, el cual causa la pérdida de la integridad membranal (Pearson y Ward 1987, Maddrell et al. 1988, Maddrell et al. 1989).

Finalmente, por medio de estudios ultraestructurales, se ha observado que 1 hora después del tratamiento, las células

epiteliales se expanden hacia el lumen del intestino y se vacuolizan. Los núcleos se colocan en posición apical, y las mitocondrias y el retículo endoplásmico rugoso se hinchan al igual que la célula. Finalmente la célula se desprende de la membrana basal y se lisa liberando su contenido citoplásmico en el lumen del tubo digestivo (Pearson y Ward 1987, Reisner et al. 1989).

Con base en la información referida anteriormente, el mecanismo de acción de las diferentes  $\delta$ -endotoxinas comprende las siguientes etapas (figura 3 ): a) la toxina activa se une a un receptor específico de membrana plasmática, evento que se considera indispensable para que la toxina produzca el daño; b) En esta etapa la toxina inserta su porción amino-terminal para formar un poro ó canal, el cual es responsable del rompimiento de las barreras de permeabilidad, como consecuencia se equilibran las concentraciones de iones; c) las células epiteliales se expanden hacia el lumen del intestino, y se desprenden de la membrana basal, d) Las células se rompen liberando su contenido hacia el tubo digestivo.

Figura 3. Mecanismo de acción de la  $\delta$ -endotoxina sobre los insectos plaga susceptibles a la toxina. Para detalles de la figura referirse al texto.



#### 7.- DAÑOS OCASIONADOS POR INSECTOS-PLAGA.

Por el daño que producen los insectos, las plagas se clasifican en primarias, secundarias y terciarias. Las primarias son aquellas capaces de romper la cubierta externa del grano y dañarlo. Un ejemplo típico es la palomilla de la fruta seca, *Ephestia cautella*. Las secundarias son las especies de insectos que se desarrollan una

vez que el grano ha sido dañado por las plagas primarias. Un ejemplo es *Tribolium casteneum*. Las terciarias, son las plagas que se desarrollan una vez que el grano ha sido dañado por las primarias y las secundarias. Generalmente se alimentan de impurezas o de residuos dejados por otros insectos (granos quebrados y perforados). El ejemplo lo constituyen las especies del género de *Criptolestes* (Ramírez, 1981).

Los insectos dañan a los granos en forma directa o indirecta. La forma directa consiste en la destrucción del grano por el insecto con fines alimenticios, por oviposición y por el depósito de excrementos. La forma indirecta se caracteriza por el calentamiento del grano originado por el metabolismo de los insectos, debido a lo cual, las condiciones del medio se tornan propicias para el desarrollo de bacterias. Estas generan malos olores en los granos convirtiéndolos en inaceptables para el consumo alimenticio o industrial (Ramírez, 1981).

Se sabe que el origen de las pérdidas cuantiosas de los granos almacenados, se debe principalmente a insectos-plaga pertenecientes a los ordenes Coleoptera y Lepidoptera. Dentro del orden Lepidoptera, se encuentran varias especies de palomillas como por ejemplo, *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*, ambas son plagas de cereales y harinas almacenadas (Cotton, 1963).

## 8.- CARACTERIZACION DE *Ephestia cautella*.

Se conoce comúnmente como palomilla tropical de los almacenes o

palomilla de la fruta seca y su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: Insecta  
Orden: Lepidoptera  
Familia: Pyralidae  
Género: *Ephestia*  
Especie: *cautella*

La palomilla adulta es de color gris pálido y mide de 0.6 a 1.25 cm de largo. Cuando el insecto está en reposo, la cabeza y la cola están ligeramente elevadas. Las alas se encuentran marcadas con dos líneas negras en zig zag. Las alas anteriores son angostas, especialmente en la base; las posteriores son de color café claro con un tinte amarillento y presentan escamas grandes y gruesas fácilmente desprendibles.

Esta especie es una plaga primaria, deposita sus huevos en acumulaciones de harina o sobre los granos y dependiendo de la temperatura, estos incuban de 3 a 6 días. Las larvas al emerger, empiezan inmediatamente a tejer hilos de seda y forman lo que se conoce como el empelmazamiento del grano. Las larvas bien desarrolladas miden 1.5 cm de longitud, su color es entre blanco y rosado. Las palomillas adultas que no se alimentan viven, menos de 14 días y los huevecillos (300 por hembra), normalmente son depositados en los siguientes 3 ó 4 días después de haber emergido del capullo. La larva se desplaza libremente entre el producto almacenado y lo contamina con su seda y sus deyecciones. También



perfora el grano y lo destruye, alimentándose del interior hasta que alcanza su madurez. En condiciones óptimas, los huevecillos eclosionan en tres días y el desarrollo de la fase de huevo a la del adulto tarda 25 días aproximadamente.

Condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa para el desarrollo de *Ephestia cautella* (Hinton y col., 1972):

Temperatura (°C)	% Humedad relativa
Máxima_____38	100
Mínima_____15	45
Optima_____28	70

#### 9.- CARACTERIZACION DE *Sitotroga cerealella*.

Se le conoce comúnmente como palomilla de los cereales o palomilla dorada de los cereales, su ubicación taxonómica es la siguiente:

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Gelechiidae

Género: *Sitotroga*

Especie: *cerealella*

Son palomillas pequeñas, su color es pardo y amarillento pálido. Las alas anteriores poseen dos pequeños puntos negros, las posteriores poseen una orla de sedas largas y un ápice puntiagudo.

Presenta palpos labiales curvos.

Esta especie ataca granos de maíz, arroz, sorgo, cebada y trigo. Se considera como plaga primaria de productos almacenados, en los cuales abunda en las capas superficiales. La hembra deposita los huevos en la superficie de los granos y cuando las larvas nacen, taladran el grano y penetran en él. Ahí permanecen hasta que terminan su crecimiento, luego se forman las pupas. En la etapa adulta, estas abandonan el grano dejando un capullo característico. Las larvas se alimentan únicamente de productos almacenados, ya que los adultos tienen vida corta. El periodo de desarrollo de la fase de huevo a la de adulto es de 30 días a 30 °C aproximadamente. Las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa para su desarrollo de acuerdo a Hinton y col. (1972) son:

Temperatura ( °C)	% humedad relativa
Máxima_____35	80
Mínima_____16	25
Optima_____32	75

## II OBJETIVOS.

Con base en los antecedentes anteriores y en virtud de que se han realizado muy pocos estudios dirigidos a la obtención de un buen rendimiento óptimo del bioinsecticida, este proyecto tuvo como objetivos fundamentales los siguientes:

- 1.- Establecer un medio de cultivo para *Bacillus thuringiensis*, que permita su rápido crecimiento y abundante esporulación.  
La elaboración del medio comprendió la selección de fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo y fácil obtención.
- 2.- Determinar el rendimiento de esporas viables.
- 3.- Demostrar que el bioinsecticida producido por *Bacillus thuringiensis* es realmente tóxico contra los insectos-plaga, para lo cual se realizaron pruebas de toxicidad sobre las dos especies-plaga: *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*.

### III. MATERIALES Y METODOS.

#### 1.- Material biológico.

Cepas de *B. thuringiensis*

- a) variedad *thuringiensis*
- b) variedad *tolworthi*
- c) variedad *darmastadiensis*
- d) variedad *kustaki*

Las variedades a, b y c fueron donadas por los Doctores Holmberg, A. y Carlber, G. del Departamento de Microbiología de la Universidad de Helsinki, Finlandia. La variedad d, se aisló a partir de una formulación comercial llamada DIPEL (Abbott Laboratories North Chicago).

- \* Las harinas integrales, gnetina y melaza, se compraron en mercados comerciales de la ciudad.

#### 2.- Reactivos químicos.

Las sales minerales que fueron usadas para los medios de cultivo se obtuvieron de MERCK México, S.A. El antiespumante de silicon de A. Sigma Chemical Ltd.

#### 3.- PRODUCCION A ESCALA DE LABORATORIO DE *B. thuringiensis*.

La literatura reporta diversos medios de cultivo, de diferente composición para el crecimiento y esporulación de *B. thuringiensis*, en su mayoría elaborados con materias primas relativamente costosas.

Dado que uno de los objetivos es establecer condiciones de cultivo aplicables y rentables a nivel industrial, se decidió establecer y definir un medio de cultivo en cuya composición se utilizaran materias primas baratas y producidas en nuestro país. Además, para incrementar el rendimiento del complejo espora-cristal, fue necesario optimizar el proceso fermentativo de la bacteria. Esto se logró mediante la manipulación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y con el control de la temperatura, el pH y la composición salina.

#### 4.- SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO.

En la selección de un medio de cultivo se trabajó con *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis*. El crecimiento de la bacteria y la producción del complejo espora-cristal, se estudiaron manteniendo constantes todas las condiciones apropiadas de fermentación, cambiando únicamente la variable de interés.

Los primeros experimentos se realizaron en matraces con capacidad para 2000 ml. Las materias primas que se utilizaron como fuentes de carbono y nitrógeno en cada cultivo, además de las combinaciones, enlistadas en la tabla IV. Cada matraz se preparó con 300 ml de medio y se esterilizaron en una autoclave a 120 libras de presión durante 20 min . Después de la esterilización, se inocularon a partir de medio sólido y se incubaron a una temperatura de 30 °C, a 250 r.p.m., durante 48 horas. Al final de éste período, se realizaron observaciones al microscopio para controlar la pureza del cultivo, así como, para seleccionar el cultivo de mayor

rendimiento, en cuanto a células bacterianas y esporas.

Tabla IV. Materias primas y sus combinaciones utilizadas en cada cultivo como fuentes de nitrógeno y carbono.

nitrógeno	carbono
Harina de arroz	+ Melaza
Harina integral de trigo	+ Melaza
Harina integral de centeno	+ Melaza
Harina de cebada	+ Melaza
Harina de soya	+ Melaza

La proporción de las harinas fue de 5g/l y de melaza 5g/l.

Para mejorar el rendimiento, se manejaron algunos parámetros físicos como el pH y la temperatura. En este caso, la bacteria se cultivó en el medio de cultivo seleccionado por los experimentos descritos anteriormente ( composición: harina de soya y melaza), pero en lugar de utilizar matraces de 2000 ml se usó un fermentador con capacidad para 1 litro (Applikon). Para determinar el efecto del pH sobre el crecimiento de la bacteria, se ajustaron los medios de cultivo a un pH inicial de 7.2, a partir del cual, se realizaron mediciones de pH cada hora.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la bacteria,

se estudió midiendo el crecimiento de *B. thuringiensis* en el medio de cultivo correspondiente a la combinación: harina de soya y melaza, a las temperaturas siguientes 30, 35, 40 y 45°C. Los cultivos se desarrollaron en un fermentador con capacidad para 1 litro (Applikon) con agitación a 250 r.p.m y a un pH = 7.2 .

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 espora-cristal.

#### 5.- PREPARACION DEL INOCULO.

Apartir de un vial con agar nutritivo y con la ayuda de una asa de siembra calibrada, se tomó una muestra de *B. thuringiensis* para transferirla a un matraz de 250 ml, con 50 ml de medio. El matraz con la muestra, se incubó en un cuarto a una temperatura constante 30°C y con una agitación de 250 r.p.m. durante 4 horas. De este matraz, se tomaron 5 ml del cultivo y se transfirieron a otro de 2000 ml con 500 ml de medio de cultivo, el cual se sometió a las mismas condiciones de cultivo que el matraz descrito anteriormente. Después de las 4 horas de incubación, todo el contenido de éste matraz se vació en un fermentador con capacidad máxima para 25 litros, diseñado y construido por el Centro de instrumentos de la UNAM. El crecimiento de cada cultivo se siguió durante 48 h que corresponde al término de la fase de esporulación y liberación de la toxina. Con el fin de observar el crecimiento, los cambios de pH

y una posible contaminación, se tomaron muestras cada hora y se les determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Beckman) a 540 nm. El pH se registró con un electrodo (Thermolyne modelo 610) y la contaminación, se controló realizando observaciones periódicas al microscopio de contraste de fases. Los cambios de pH se controlaron por la adición de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio al medio de cultivo. La formación de espuma se controló exitosamente con la adición de antiespumante (Antifoam A. Sigma Chemical Co.).

#### 6.- RECUPERACION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.

Debido a que las esporas y cristales se encuentran en suspensión al final del proceso, es necesario realizar un proceso de recuperación y secado. Para la recuperación se ensayaron dos métodos: uno, fue la centrifugación de flujo continuo; el otro, por aglutinación a pH 4.5. El primero, consiste en recuperar el cultivo mediante centrifugación a 7500 r.p.m. Al término de éste proceso, el sobrenadante se descarta y el precipitado se suspende en un amortiguador de fosfatos para lavarse, y ser sometido a otra centrifugación de 7500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C empleando una centrífuga Sorvall RC-2B, rotor GSA. Este lavado se realizó dos veces. Para llevar a cabo el segundo método, se colecta el material al final del proceso fermentativo, y se ajusta el pH hasta 4.5. Con ello se consigue que las cargas negativas de los grupos carboxilos de la superficie celular se neutralicen, disminuyendo la estabilidad de la suspensión celular y permitiendo la floculación



de las células. Después se forma un precipitado, que es sometido a lavados y recuperación.

Una vez obtenido el precipitado por cualquiera de los dos métodos, se deshidrata directamente en una liofilizadora (LABCONCO Modelo 4451). Posteriormente, se muele en un mortero hasta obtener un polvo color café-crema, al cual se le determina su peso seco y se guarda en un frasco color ámbar para posteriormente realizar las pruebas de toxicidad.

#### 7.- DETERMINACION DE COLONIAS POR CONTEO EN PLACA.

El rendimiento real de cada cultivo se determinó por conteo de colonias viables en Cajas de Petri con agar nutritivo. Para ésta práctica se preparó un tubo de ensaye de 16 x 150 con 0.6 g del polvo de esporas y cristales (insecticida) y se incubó en baño maría a una temperatura de 80 °C durante 10 min. Apartir de éste tubo se realizaron diluciones en agua estéril desde  $1 \times 10^1$  hasta  $1 \times 10^{10}$ . De los tubos que contenían diluciones de  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^{10}$ , se tomaron 0.1 ml y se vaciaron en Cajas de petri con agar nutritivo, el contenido se dispersó con una varilla curva y se incubaron a 30°C en una incubadora durante 24 h, Al final de éste período se contó el número de colonias viables.

#### 8.- ESTABLECIMIENTO DEL INSECTARIO.

Para experimentar en el laboratorio la virulencia del insecticida bacteriano, fue necesario localizar algunas de las plagas de mayor importancia económica reconocida en nuestro país. De todas ellas,

seleccionamos a las de granos en almacenamiento, no sólo por su importancia económica sino porque el almacén de granos representa un ambiente relativamente controlado en cuanto a temperatura, humedad y prácticamente libre de interferencias ambientales no controladas, ya que desde el punto de vista experimental, esta condición es altamente deseable en las fases iniciales de experimentación. Las plagas elegidas fueron *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella* colectadas en las bodegas de la ANDSA. Estas dos especies de palomillas no sólo causan pérdidas económicas en México sino también a nivel mundial. Cuando se hizo la colecta de estas plagas, fueron proporcionadas en frascos de vidrio los cuales solo contenían maíz.

Durante nuestra fase experimental se les modificó este alimento por una dieta elaborada a base de una mezcla de salvado, glicerina y extracto de levadura en una proporción 10:3:1 (Rivera, O. J. L. 1986 y Ontiveros, F. I. G., 1988). El alimento se preparó de la siguiente manera: el salvado se mezcló con el extracto de levadura en un recipiente con la ayuda de una espátula, después se agregó poco a poco y sin dejar de mezclar la glicerina hasta homogenizar completamente la mezcla. El homogenizado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml y se esterilizó a 120 °C durante 15 min.

Los frascos para el cultivo de las palomillas fueron de 2.5 litros y se llenaron a la mitad con la dieta preparada. Estos frascos se inocularon con un promedio de 100 larvas. Las tapas de los frascos estaban perforados para permitir el paso del aire, forradas con papel estrasa por la parte interna para evitar la fuga

de las pequeñas larvas y permitir el intercambio gaseoso. Los frascos de cultivo se instalaron en un cuarto con temperatura de 30 °C y humedad relativa de 65-70 %, condiciones apropiadas para el desarrollo favorable de las larvas (Junko, et al. 1981).

#### 9.- FORMULACIONES BACTERIANAS.

Una vez obtenido el complejo espora-cristal en forma de polvo, se prepararon las formulaciones bacterianas para realizar las pruebas de toxicidad. Las cantidades usadas de cada componente se muestran a continuación:

COMPLEJO ESPORA-CRISTAL	HARINA DE MAIZ	CONCENTRACION*
0.0 mg	200 mg	0.0 %
0.2 mg	199.8 mg	0.1 %
1 mg	199 mg	0.5 %
2 mg	198 mg	1.0 %
10 mg	190 mg	5.0 %
20 mg	180 mg	10 %

El complejo espora-cristal y la harina de maíz estéril se agitaron en un vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Cabe mencionar que la harina de maíz se usó como acarreador. Las concentraciones se refieren a la cantidad total del bioinsecticida.

#### 10.- PRUEBAS DE TOXICIDAD.

Estas pruebas se realizaron en frascos de 250 ml de boca ancha, con las tapas perforadas y forradas por dentro. En estos frascos se colocaron 20 g de maíz y 200 mg de formulación. Todo el

contenido de los frascos se mezcló hasta que el grano quedara completamente cubierto por el polvo. Con la ayuda de unas agujas de disección y pinceles, se transfirieron 20 larvas de los primeros estadios, para su selección se usó un microscopio estereoscópico. Dicha selección se basó en los resultados reportados previamente por Rivera, O. J. L. 1986, los cuales mencionan que las larvas jóvenes son las más susceptibles al bioinsecticida. Cada bioensayo constó de 5 lotes experimentales, cada uno con una concentración de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10 % de la formulación y 2 lotes testigo con 0 %. Esto se realizó para cada una de las cepas bacterianas y con larvas de las dos especies-plaga.

El conteo de larvas muertas se realizó diariamente con la ayuda de una lupa. De los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de larvas muertas el cual se transformó en unidades probits con la ayuda de una tabla matemática y se graficaron contra el logaritmo de la dosis para calcular la dosis letal 50 (DL50). La dosis letal media ó 50, se refiere a la cantidad necesaria de cristales ó cristales y esporas, para matar sólo al 50 % de la población larvaria. Una unidad probits es un parámetro estadístico que nos permite expresar el porcentaje de efecto.

## V RESULTADOS.

### 1.- SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *B. thuringiensis*.

Para lograr éste propósito, fue necesario crecer a *B. thuringiensis* en medios de cultivo elaborados a base de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (vease tabla IV). La selección de dichas fuentes se hizo principalmente por la facilidad con que se pueden obtener en el mercado y por su bajo costo. En la tabla V, se muestran las combinaciones que se realizaron para preparar un medio de cultivo adecuado, así como su rendimiento medido como esporas viables crecidas en placas de agar nutritivo. Los resultados de dicha tabla muestran que de los medios usados, el que estaba compuesto por la combinación de harina de soya y melaza fue el que proporcionó la mayor cantidad de colonias viables ( $1.5 \times 10^{11}$ ). Además, la observación periódica al microscopio reveló un cultivo libre de impurezas, con células de tamaño normal y cuando llegaron a la fase de esporulación, lo hicieron en una forma sincrónica con un alto rendimiento. Con respecto a los otros medios de cultivo (las combinaciones de harina integral de centeno y melaza, harina de cebada y melaza, centeno y melaza), se encontró un buen rendimiento, ( $2.0 \times 10^8$ ,  $1.0 \times 10^8$  y  $4.0 \times 10^8$ , respectivamente). Sin embargo, la observación al microscopio reveló abundantes impurezas (residuos de las harinas) y una fase de esporulación asincrónica. La tabla también muestra que los rendimiento de los medios de cultivo con las combinaciones de

harina de arroz y melaza; harina integral de trigo y melaza, no fueron satisfactorios ( $9.4 \times 10^6$  y  $3.0 \times 10^6$ ) comparados con los anteriores, y la observación al microscopio mostró células deformes, impurezas y una esporulación muy asincrónica, esto es, que al final de las 48 horas de crecimiento se encontraron tanto esporangios en diferentes estadios de la esporulación como algunas esporas libres. Con base en estos resultados, se decidió que el medio de cultivo adecuado para el crecimiento correspondía al que contenía la combinación de harina de soya y melaza. Ya que el número de colonias viables proporcionado por este cultivo, es bastante aceptable aún tomando en cuenta que el tiempo de fermentación estudiado fue de 48 horas. Dicho valor supera a los reportados en la literatura por otros investigadores, en cuyos medios de cultivo, utilizaron componentes más complejos y de un alto valor económico con tiempos de fermentación más prolongados (Dulmage, 1970).

Tabla V. Crecimiento de *B. thuringiensis* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo			Esporas/ml
Harina de arroz	+	Melaza	$9.4 \times 10^6$
Harina integral de trigo	+	Melaza	$3.0 \times 10^6$
Harina integral de centeno	+	Melaza	$2.0 \times 10^8$
Harina de cebada	+	Melaza	$1.0 \times 10^6$
Harina de soya	+	Melaza	$1.5 \times 10^{11}$

## 2.- EFECTO DEL AMORTIGUAMIENTO POR $\text{CaCO}_3$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ SOBRE LA ESPORULACION DE *B. thuringiensis*.

Todo proceso fermentativo tiene como producto final la producción de ácidos, los cuales detienen el crecimiento y pueden alterar las fases subsiguientes del crecimiento bacteriano, como son la esporulación y la fase estacionaria. El medio elegido se transformó en un medio más ácido después del crecimiento bacteriano, lo que nos hizo suponer que requería de un amortiguador. Entonces, con la intención de favorecer el crecimiento del microorganismo en nuestro estudio y permitir un pH más estable que favoreciera la esporulación, nos propusimos estudiar el efecto de tres tipos de sales amortiguadoras :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{CaCO}_3$ , la cantidad de las sales usada para cada medio de cultivo, se extrajo de trabajos previos realizados en nuestro laboratorio por José Luis Rivera O.

(1986). De acuerdo a los resultados presentados en la tabla VI, podemos decir que aunque no existen grandes diferencias en la producción de esporas, con el uso de las tres sales, el medio que contenía las combinaciones de harina de soya, melaza y  $K_2HPO_4$ , proporcionó el mayor número de esporas viables que fue de  $2.8 \times 10^{10}$ . Así mismo, la observación al microscopio reveló que al término de las 48 hs todas las bacterias habían esporulado, esto significa que en el cultivo sólo había esporas libres. Además, la adición de esta sal permitió una menor formación de espuma.

Tabla VI. Efecto del amortiguamiento por  $CaCO_3$ ,  $KH_2PO_4$ , y  $K_2HPO_4$  sobre el crecimiento y esporulación de *B. thuringiensis*.

Medio de cultivo	Esporas/ml
Harina de soya + Melaza + $CaCO_3$	$9.3 \times 10^7$
Harina de soya + Melaza + $KH_2PO_4$	$2.9 \times 10^7$
Harina de soya + Melaza + $K_2HPO_4$	$2.8 \times 10^{10}$

Las concentraciones de cada sal para el cultivo fue de 5 g/l



### 3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO Y ESPORULACION DE *B. thuringiensis*.

Para determinar la temperatura óptima para el crecimiento y esporulación de la variedad de *B. thuringiensis*, se hicieron curvas de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo seleccionado (combinación: harina de soya y melaza, sal amortiguadora:  $K_2HPO_4$ ) a las temperaturas de 30, 35 y 40 °C, cuyos resultados se muestran en la figura 4. Estos resultados muestran que con la temperatura de 30 °C se obtuvo el mayor crecimiento (90%) en un periodo de 6 hs; sin embargo, a pesar de que con la temperatura de 35 °C se logró un crecimiento ligeramente menor (83%), éste fue más rápido. Se observa que en la etapa final, la curva de crecimiento baja, este descenso no indica muerte celular, sino más bien se debe a aglomeraciones que empiezan a formar las bacterias en el medio de cultivo convirtiéndolo más denso.

La figura 4 muestra también, que la bacteria no crece bien a una temperatura de 40 °C. Este hecho es importante, si consideramos su producción a gran escala. Los resultados cuantitativos en cuanto al rendimiento de cada cultivo se muestran en la tabla VII. Como puede verse, el rendimiento de colonias viables obtenidas por el crecimiento a las temperaturas 30 y 35 °C es semejante, lo cual indica que la bacteria puede crecer favorablemente entre 30-35 °C.

Figura 4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *B. thuringiensis*. La variedad fue crecida a diferentes temperaturas en el medio seleccionado, el crecimiento se midió como la absorbancia a 540 nm.

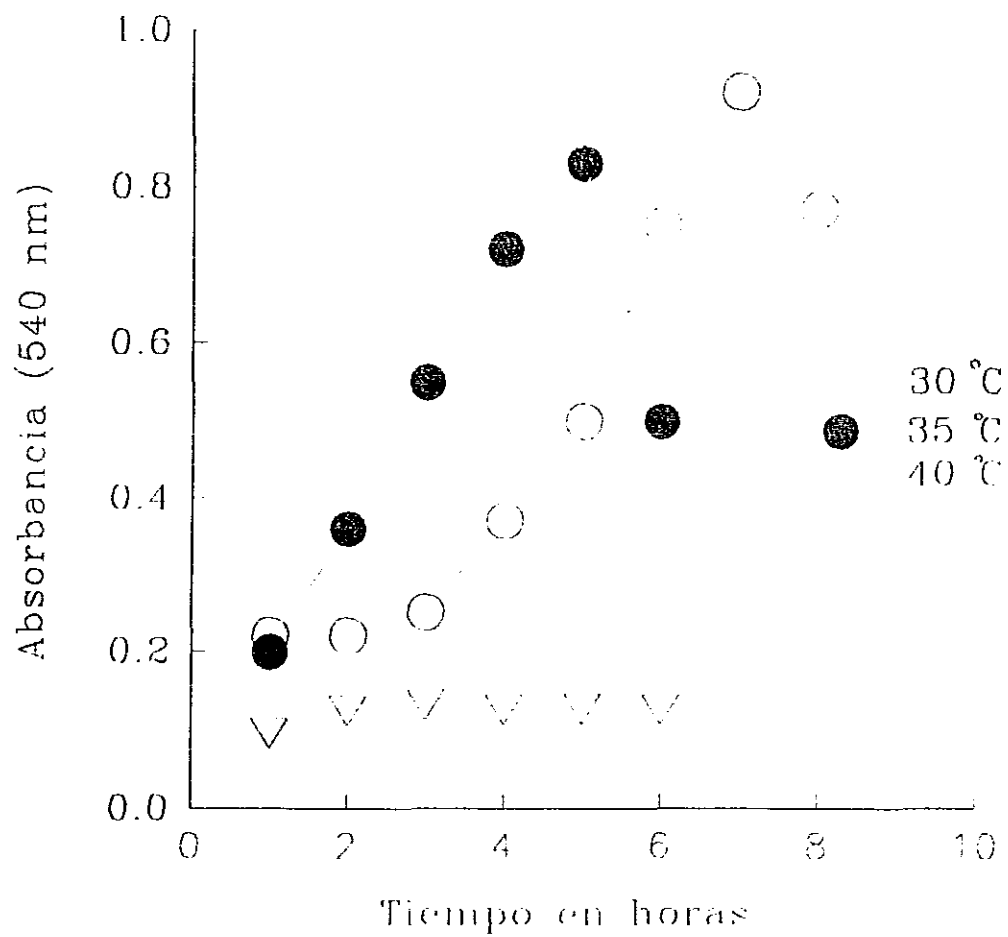


Tabla VII. Efecto de la temperatura sobre la esporulación de *B. thuringiensis*

Temperatura	Esporas/ml
30 °C	7.8 x 10 <sup>7</sup>
35 °C	4.2 x 10 <sup>9</sup>
40 °C	-
45 °C	-

- La bacteria no se desarrolló.

Los resultados descritos anteriormente indican que la bacteria crece óptimamente en un medio compuesto por la combinación de harina de soya y melaza con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como amortiguador, a temperaturas entre los 30 y 35°C y bajo las siguientes condiciones: agitación, 250 r.p.m. y a un pH de 7.2.

#### 4.- ESCALAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE *B. thuringiensis* EN FERMENTADOR DE 25 l.

Una vez seleccionado el medio de cultivo y las condiciones apropiadas para el crecimiento y esporulación de *B. thuringiensis*, el siguiente paso fue ensayar su crecimiento en un fermentador con capacidad para 25 litros. En esta etapa, se realizaron varias pruebas manipulando nuevamente los componentes del medio de

cultivo es decir fuentes de carbono y nitrógeno, pero todas ellas basadas en la composición del medio de cultivo seleccionado originalmente y que correspondió al medio integrado por harina de soya y melaza. El rendimiento de cada experimento se reporta en número de esporas viables (tabla VIII). Los datos presentados en esta tabla indican que aunque se sustituyera la harina de soya por otra fuente más rica en proteína en este caso por la gnetina, ó simplemente, esta última se adicionará al medio de cultivo, el rendimiento no mejora, lo cual demuestra que la harina de soya y la melaza son fuentes suficientes para el aporte de carbono y nitrógeno. El número de esporas viables obtenidas después de 48 horas de fermentación ( $4.3 \times 10^{10}$  esporas/ml) produjo un rendimiento mayor que aquel obtenido por otros investigadores como ( Drake y Smythe 1963, Dulmage 1971, Patente Magna 1963, Patente CRC 1978), Pearson y Ward (1988) (tabla comparativa XI), a pesar de que éstos son de una composición más compleja en cuanto a proteína y carbohidrato. Estos mismos autores reportan que el medio de cultivo adecuado para la producción del bioinsecticida debe contener una alta proporción de proteína y carbohidrato, tal y como lo muestra la composición de sus medios reportados en la tabla comparativa, lo cual no coincide con nuestros resultados.

Tabla VIII. Rendimiento del complejo espora-cristal de *B. thuringiensis* en un fermentador\* de 25 l.

Medio de cultivo	Esporas/ml
Harina de soya + melaza	$4.3 \times 10^{10}$
Grenetina + melaza	$1.5 \times 10^{10}$
Harina de soya + grenetina + melaza	$2.0 \times 10^{10}$

\* Condiciones de fermentación: temperatura 30°C, agitación 250 r.p.m., aereación 8 l/min, tiempo de fermentación 48 h.

#### 5.- RECUPERACION DEL COMPLEJO ESPORA CRISTAL.

La recuperación del complejo espora-cristal mediante la centrifugación fue la más eficiente, porque con ella se recupera la totalidad del material celular en unos cuantos minutos. Se obtienen aproximadamente 6.5 g/litro de peso húmedo y 3.30 g/litro en peso seco de esporas y cristales. Con el proceso de floculación, también se recuperan cantidades semejantes al de la centrifugación, sólo que en mayor tiempo. Por esta razón, si se piensa en la producción del complejo en cantidades industriales, el tiempo es un factor determinante, y por lo mismo, el más recomendable es el de centrifugación.

6.- TERMO-RESISTENCIA DE LAS PREPARACIONES DE ESPORAS DE *B. thuringiensis* OBTENIDAS EN EL MEDIO.

Las esporas además de la proteína tóxica, son un ingrediente fundamental en la composición de las preparaciones del bioinsecticida, porque éstas representan el agente infeccioso invasivo principal para los insectos. Conocer el grado de resistencia de las esporas al calor es importante, si tomamos en cuenta que cuando las preparaciones de *B. thuringiensis* son aplicadas en el campo, se enfrentan a una serie de cambios bruscos de temperatura que pueden afectar su estabilidad y su eficacia como bioinsecticida. En esta parte del trabajo, se determinó la termo-resistencia de las esporas en términos cuantitativos, los resultados reportados en la tabla IX muestran que las esporas que fueron expuestas al calor es decir pasteurizadas son casi igualmente resistentes a las que no lo fueron, y presentaron viabilidades de  $7.0 \times 10^6$  y  $9.0 \times 10^6$  respectivamente. Estas cantidades proporcionan una tolerancia de 77.78 %, este valor sugiere que el insecticida puede aplicarse en el campo sin temor a su inactivación ó destrucción por condiciones ambientales.

Tabla IX. Termo-resistencia de las esporas de *B. thuringiensis*.

Esporas	viables/ml
Sin pasteurizar	$9.0 \times 10^4$
Pasteurizadas	$7.0 \times 10^5$

Esporas termo-resistentes: 77.78 %.

Las esporas pasteurizadas se expusieron a una temperatura de 85 C durante 10 minutos.

#### 7.- CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *B. thuringiensis*

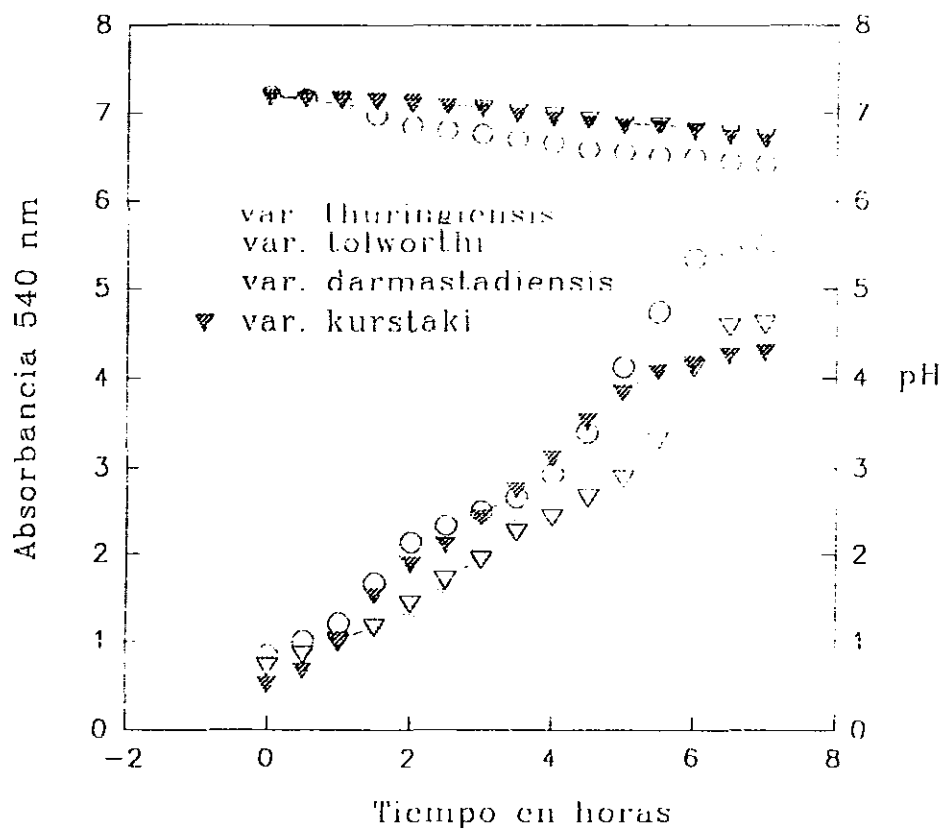
Las cepas de *B. thuringiensis* con las cuales se realizaron las pruebas de toxicidad fueron:

- a) variedad *thuringiensis*
- b) variedad *tolworthi*
- c) variedad *darmastadiensis*
- d) variedad *kustaki*

Las 4 variedades se cultivaron en el medio seleccionado, en un fermentador con capacidad para 25 litros. La figura 5 muestra los cambios de crecimiento y de pH obtenidos durante el desarrollo de los cultivos de cada variedad. En dicha figura se observa, que aunque las cuatro variedades proliferaron exitosamente en el medio seleccionado, el mejor crecimiento correspondió a la variedad *thuringiensis*. En ningún cultivo el pH descendió de un pH=6, lo

cual es importante si consideramos su importancia en la esporulación de las bacterias.

Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis*. La ordenada derecha indica el pH del medio y la ordenada izquierda el crecimiento. Los trazos superiores son los cambios de pH, mientras que los trazos inferiores son las curvas de crecimiento.





El rendimiento de cada variedad se muestra en la siguiente relación:

BACTERIAS	PESO SECO g/l*
variedad <i>thuringiensis</i>	3.30
variedad <i>tolworthi</i>	2.13
variedad <i>darmastadiensis</i>	2.55
variedad <i>kustaki</i>	2.50

El peso seco, se refiere al complejo espora-cristal.\*

Para conocer el grado de virulencia del complejo, se prepararon diluciones del complejo al 0.5, 0.1, 1.0, 5.0 y 10 % utilizando como diluyente harina de maíz debido a que los insectos-plaga se colectaron de granos de maíz almacenado. Otra razón importante por la que se escogió la harina de maíz es porque ésta es inofensiva y si se quiere proteger a los granos alimenticios se tiene necesariamente que pensar en un diluyente que no interfiera más adelante con el consumo humano ó de animales.

#### 8.- DESARROLLO DE *Ephestia cautella* Y *Sitotroga cerealella* EN EL INSECTARIO.

Los insectos utilizados para estas pruebas fueron, *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*. Las dos especies se consideran palomillas-plaga de granos en almacenamiento. Su selección se hizo

en base a la importancia que representan los granos de los cultivos agrícolas en la alimentación del hombre y a las pérdidas cuantiosas que sufren la mayoría de los países del mundo debido a los daños causados por una gran variedad de insectos.

La dieta utilizada para el desarrollo de las dos palomillas se basó en una mezcla de salvado, glicerina y extracto de levadura, en una proporción 10:3:1, respectivamente (Rivera, O. J. L. 1986 y Ontiveros, F. I. G. 1988). Se suministró esta dieta porque de acuerdo a los resultados de Rivera, su elaboración es fácil, el número de componentes son pocos y baratos (excepto la levadura), pero sólo se requiere 1/14 parte del total para esta dieta. Esta dieta ofrece grandes ventajas pues en ella las larvas y los adultos se desarrollan en forma constante proporcionando cantidades bastante aceptables y lo más importante, es que las larvas pueden recuperarse fácilmente, lo cual es ventajoso porque de acuerdo a los trabajos realizados en el laboratorio por Rivera y Ontiveros (1986 y 1988), los estadios larvarios tempranos de los insectos son más susceptibles de atacar.

Dentro del insectario, el desarrollo de estas dos especies-plaga fue como sigue:

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

Su desarrollo se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

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

#### 9.- PRUEBAS DE TOXICIDAD DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *B.thuringiensis* SOBRE *Ephestia cautella*.

La toxicidad del complejo espora-cristal se determinó calculando el porcentaje de larvas muertas, la cual se transformó en unidades probits y se graficaron contra el logaritmo de la dosis para calcular la dosis letal 50 (DL50). La dosis letal 50, se refiere a la cantidad necesaria de cristales o cristales y esporas para matar al 50% de la población larvaria. Mientras que una unidad probits es un parámetro estadístico que nos permite expresar el porciento de efecto. La figura 6. Describe el comportamiento de las variedades de *B. thuringiensis* con respecto a la toxicidad. Se observó que todas las variedades fueron virulentas en mayor o menor grado contra la plaga de *Ephestia cautella* siendo las variedades *thuringiensis*, *tolworthi*, *darmastadiensis* las menos virulentas y la variedad *kustaki* la mas potente. Estos resultados se corroboran con las dosis letales 50 tabuladas en la tabla X. Se encontró que la variedad *tolworthi* fue menos potente que las demás cepas ya que a los 7 días se obtuvo una DL 50 de 0.260 %, (tabla X); mientras que la variedad *thuringiensis* tuvo una DL 50 de 0.217 %. Con respecto a las variedades *darmastadiesis* y *kustaki* se encontró que fueron

más potentes que las anteriores, ya que las dosis letales 50 fueron de 0.360 y 0.360 %, respectivamente y los tiempos en los cuales se alcanzó el 50 % de las muertes de las larvas fueron de 5 y 3 días respectivamente (tabla X , figura 6 ). En la figura se muestran las curvas de *tolworthi*, *thuringiensis*, *darmastadiensis* y *kustaki*, la potencia de la toxicidad observada fue *kustaki* > *darmastadiensis* > *thuringiensis* > *tolworthi*.

Figura 6. Curvas utilizadas para determinar la dosis letal 50 de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* sobre la especie *Ephestia cautella*.

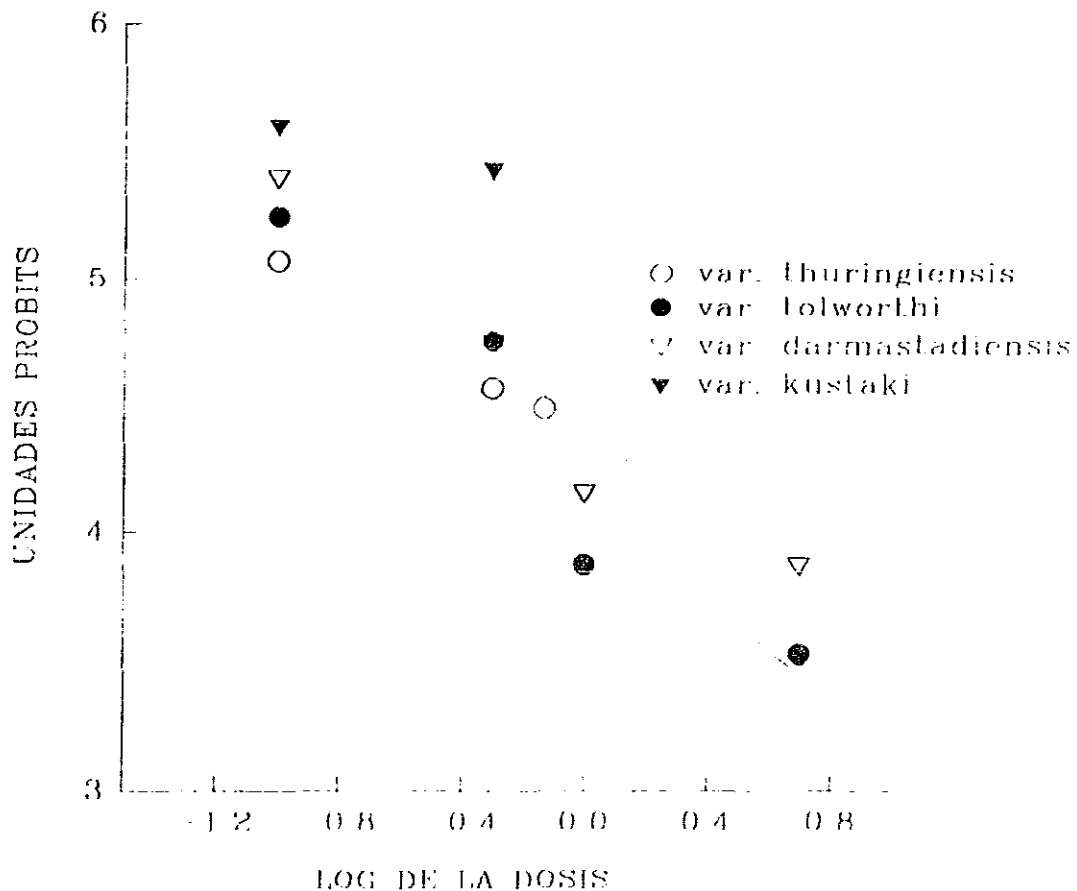


Tabla X. Dosis letal 50 de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* sobre las especies plaga de *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*. Los paréntesis indican los días a los que se obtuvieron las dosis letales 50.

VARIEDAD → ESPECIE↓	HD27 thuringien sis	HD125 tolworthi	HD199 darmastad iensis	HD1 kurstaki
E. cautella	DL50= 0.217% (7)	DL50= 0.260% (7)	DL50= 0.36% (5)	DL50= 0.355% (3)
S. cerealella	DL50= 0.140% (6)	DL50 = 0.082% (4)	DL50= 0.29% (5)	DL50= 0.857% (3)

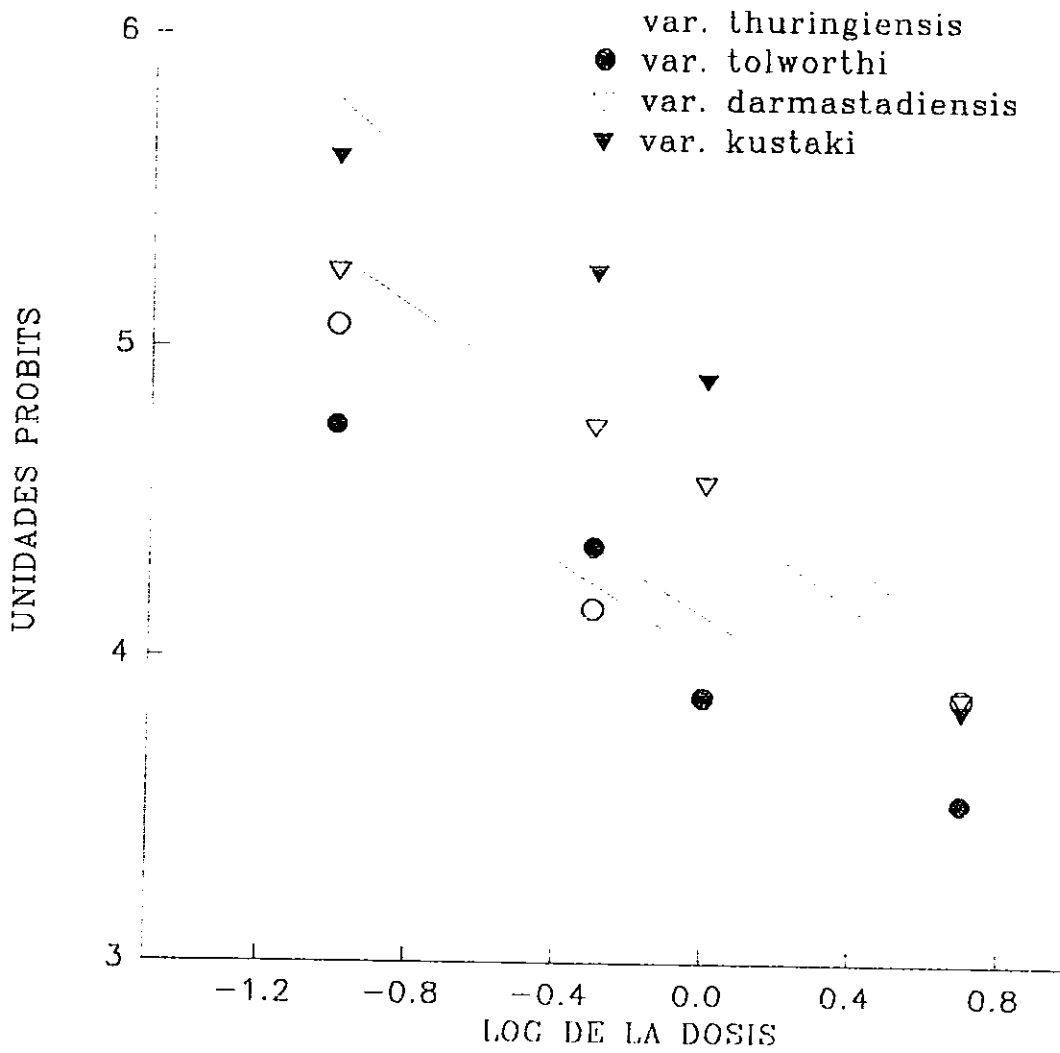
10.- PRUEBAS DE TOXICIDAD DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *B. thuringiensis* SOBRE *Sitotroga cerealella*.

La figura 7 , muestra los datos graficados de las unidades probits con respecto al logaritmo de la dosis, los datos para hacer esta

gráfica se obtuvieron igual que en la figura anterior; Contra la especie-plaga *Sitotroga cerealella* se observó que la variedad *thuringiensis* fue la de menor toxicidad (DL 50 0.140 % en un período de 6 días, tabla X), le siguió la variedad *darmastadiensis* (DL 50 de 0.290 %) en un lapso de 5 días, resultando ser las variedades *tolworthi* y *kustaki* las más potentes con dosis letales 50 de 0.082 % y 0.857 % en períodos de 4 y 3 días, respectivamente, tabla X. Resumiendo, las toxicidades de estas variedades contra *Sitotroga cerealella* fueron; *tolworthi* > *kustaki* > *darmastadiensis* > *thuringiensis*.

Estos resultados, muestran claramente que la variedad *kustaki*, fue la más potente para matar a la especie-plaga de *Ephestia cautella*; mientras que en el caso de *Sitotroga cerealella* la variedad *tolworthi* fue la más virulenta. Comparando la susceptibilidad de las especies-plaga a las diferentes cepas de *B. thuringiensis*, encontramos que *Sitotroga cerealella* fue menos resistente que *Ephestia cautella*, como lo muestran las dosis letales 50 en la tabla X. De los cursos temporales obtenidos, se puede decir que la toxicidad de estas formulaciones es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición (figura 6 y 7 , tabla X ) y que las formulaciones hechas en estos experimentos demuestran que el complejo spora-cristal tiene actividad plaguicida y que pueden ser útiles para el control de insectos-plaga de granos en almacenamiento.

Figura 7. Curvas utilizadas para determinar la dosis letal 50 de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* sobre la especie plaga de *Sitotroga cerealella*.



Las diferencias en cuanto a la susceptibilidad de estas dos especies a las diferentes cepas de *B. thuringiensis*, son comparables a las reportadas por Kinsinger y McGaughey (1979) y por McGaughey (1976 y 1982). Aún es difícil explicar la razón de estas diferencias, algunos autores mencionan que se debe al pH intestinal de cada especie-plaga (Kinsinger y McGaughey, 1979). Si esto último es cierto, entonces, las diferencias en la susceptibilidad de cada especie-plaga podría explicarse también mediante la especificidad de las delta-endotoxinas de cada variedad de *B. thuringiensis*, ya que como se mencionó en la introducción esta bacteria contiene una amplia gama de variedades las cuales producen diferentes tipos de toxinas específicas para lepidópteros, dípteros y coleópteros. Las observaciones al microscopio apoyan esta última hipótesis mostrando no únicamente diferencias apreciables entre las moléculas proteínicas entre las variedades, sino también indicando algunas correlaciones entre la organización molecular en los cristales y el grado de toxicidad cuando son reactivadas con proteasas (A. Burgerjon y P. Grison, 1971).



## V DISCUSION.

El complejo espora-cristal, posee muchas cualidades que lo hacen ser el mejor de los insecticidas microbianos, de eficacia específica y selectiva para el control de los primeros estadios larvarios de diversas especies de insectos susceptibles. No perjudica a los predadores de las plagas ni es tóxico para el hombre y la fauna. Estas características lo hacen aplicable en cualquier tipo de cultivo; a pesar de ello, su uso es restringido debido principalmente a los altos costos de su producción y a la inestabilidad en los campos de cultivo. Para facilitar su producción a nivel industrial, en este trabajo se planteó la posibilidad de encontrar un medio de cultivo adecuado y favorable que permitiera la producción masiva de este microorganismo y por lo tanto del bioinsecticida. De acuerdo a las pruebas de selección, el medio de cultivo compuesto por harina de soya y melaza resultó ser el más adecuado para el crecimiento de la bacteria, ya que el rendimiento obtenido por este medio de cultivo fue bastante aceptable de  $4.3 \times 10^{10}$  esporas/ml en 48 h de fermentación. Si comparamos este valor con los reportados en la literatura, encontramos que no es superado por ninguno de ellos (tabla XI). Por ejemplo, el rendimiento obtenido por el medio de cultivo de Drake y Smythe (1963), es de  $2.0-2.5 \times 10^9$  esporas/ml en 96 h de fermentación; el de Dulmage (1971), es de  $1.2-2.5 \times 10^9$  esporas/ml en un lapso de 48-72 h; ó el de Parson y Ward (1988), con un rendimiento de  $6.5 \times 10^9$  esporas/ml en 48 h de fermentación (tabla XI). La misma tabla muestra que la composición de los medios de

cultivo es importante para poder obtener un rendimiento similar. Por ejemplo, el medio de cultivo utilizado por Drake y Smythe (1963), cuya composición resulta ser compleja por las sustancias como la caseína, extracto de levadura, granos sólidos, almidón, sacarosa y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como amortiguador. Otro ejemplos lo constituyen las Patentes CRC (Inglesa) y la Megna, que se han dedicado por muchos años a la producción del complejo espóra-cristal en forma masiva, con lo cual, se ha logrado controlar exitosamente una amplia gama de insectos poderosamente nocivos para los cultivos. A pesar de todo lo dicho anteriormente, estos medios de cultivo no rinden los valores de producción obtenidos por nuestro medio seleccionado, y pone de manifiesto que el medio seleccionado tiene buenas opciones para un escalamiento en la producción del bioinsecticida. Los casos mencionados en esta tabla, son solo unos cuantos ejemplos de como lograr una producción a escala industrial. Al respecto Feitelson (1992) reporta que hay 53 patentes registradas en Estados Unidos de las cuales 39 se han registrado en los últimos cuatro años, de esto se puede concluir que habrá nuevas patentes y un mayor progreso en el campo de la ciencia básica, lo que incrementará la invención, la aplicación y comercialización de nuevos productos de este tipo para la agricultura.

Tabla XI. Resultados comparativos sobre la producción de *B. thuringiensis* en diferentes medios de cultivo.

\*\* Medio de cultivo formulado en este trabajo.

Medio de cultivo	Drake y Smythe	Megna	Dulmage	CRC	**
Composición g/l	(1963)	(1963)	(1971)	(1978)	
Caseína	20	-	-	-	-
Harina de soya	-	14	15	-	5
Extracto de levadura	5.4	-	-	10	-
Harina de maíz	10	17	-	2	-
Melaza	-	18.6	-	-	5
Almidón	45	-	10	13	-
Sacarosa	9	-	-	-	-
glucosa	-	-	5	-	-
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8	-	-	4	-
CaCO <sub>3</sub>	-	1	1	8	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	5
-----					
Esporas/ml	2.5x10 <sup>9</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	4.3x10 <sup>10</sup>
-----					
Tiempo de fermentación (h)	96	72	48-72	48-72	48
-----					

Otro aspecto importante de mencionar, es el valor de las sales amortiguadoras en la preparación de los medios de cultivo para crecer, ya que en nuestras series experimentales encontramos que ni el bicarbonato de calcio ni el fosfato monobásico de potasio, compensaron los cambios de pH tan eficientemente como el difosfato de potasio, para favorecer la esporulación de la bacteria. Este resultado podría interpretarse debido a que el fosfato dibásico tiene un  $pK_a = 6.6$  y no permitió una caída mayor en el pH del medio (figura 5). Los trabajos anteriores de nuestro laboratorio también concuerdan con estos resultados. También son congruentes con los resultados de otros investigadores que sugieren que para el fenómeno de la esporulación, se requiere de un cambio de pH hacia el lado alcalino (Pearson and Ward 1988).

Un factor determinante en el desarrollo de una bacteria radica en la temperatura de incubación. Los resultados de las curvas de crecimiento a diferentes temperaturas arrojaron un valor de 30 a 35 °C como un valor adecuado para el crecimiento de *B. thuringiensis*, dicha temperatura correlaciona positivamente con los valores encontrados en la literatura de 30,  $32 \pm 2$  °C (Dulmage 1970, 1971; Arcas, Yantorno y Ertola 1987).

El efecto de la temperatura también repercute en el proceso de la esporulación, así como en el paso de las esporas a su fase vegetativa. Por otro lado, se conoce que cuando las bacterias están en crecimiento y se les cambia la temperatura, responden con cambios en la síntesis de proteínas. Nosotros realizamos ensayos de

termo-resistencia, primero para ver la viabilidad de las esporas cuando se exponen a cambios de temperatura, principalmente por que cuando se aplica el complejo espora-cristal en el campo, este se encuentra sometido a los rayos solares, las lluvias y el calor. La exposición de las esporas al calor disminuyó la viabilidad en un 23 %. Por lo tanto de cada 100 esporas dispersadas, podemos decir que 77 tienen aun la capacidad de ser virulentas. La resistencia al calor por las esporas, ha sido por mucho tiempo objeto de estudio.

La mayoría de las investigaciones indican, que existen grandes diferencias en la resistencia al calor entre las esporas de las diferentes especies. Algunos autores han reportado, que la resistencia se debe al contenido de ácido diaminopimélico y de calcio, así como al desarrollo de la corteza de peptidoglicano. Otros autores mencionan que la resistencia se debe al grado de adaptación que presenten las especies a las diferentes temperaturas (Ameluxen y Lins, 1968; Singleton y Ameluxen, 1973). Warth (1978) menciona, que la resistencia se debe a la adaptación característica de las especies a las temperaturas y a la estabilización conferida por el estado de espora relacionado al contenido del ácido diaminopimélico.

La producción del bioinsecticida fue una etapa de este trabajo, sin embargo, su complemento consistió en ensayar su capacidad para destruir insectos-plaga, para lo cual crecimos algunas cepas de *B. thuringiensis* a una escala de fermentador de 25 l e implantamos un insectario, que nos permitió estudiar el complejo espora cristal en dos plagas de gran importancia para la agricultura.

Las características del cristal mencionadas al inicio y las pruebas de toxicidad realizadas en este trabajo con las cuatro variedades más representativas de *Bacillus thuringiensis* vs. las dos palomillas-plagas de granos de almacenamiento, confirman sus propiedades como insecticida microbiano. Los resultados mostrados en las figuras 6 y 7, demostraron que hubo diferencias en la virulencia de las variedades estudiadas, y que todas fueron capaces de acabar con las poblaciones larvarias antes ó poco después de los 10 días de exposición. Estos resultados se pueden analizar en forma más clara con las dosis letales 50 (tabla XI). Podemos decir que la variedad que tardó menos tiempo en matar a la mitad de la población de larvas de *S. cerealella* fueron la *kustaki* con un tiempo de 3 días y una  $DL_{50} = 0.857$ . El mismo tiempo requirió la variedad *darmastadiensis* pero para destruir el 50 % de larvas de la plaga *E. cautella* con una  $DL_{50} = 0.355$  %. El hecho de que una variedad bacteriana se comporte más efectiva que otra frente a un insecto determinado es importante, porque significa que contiene una amplia gama de variedades con especificidad para determinados grupos de insectos, lo cual, marca la diferencia con los insecticidas convencionales.

Otra ventaja que presenta es que con dosis letales 50 tan mínimas como 0.355 % ó la de 0.857 % se mata a la mitad de la población larvaria en sólo 3 días (variedad *kustaki* y *tolworthi* contra *E. cautella* y *S. cerealella*). En base a estos resultados puede decirse que las cantidades necesarias del complejo para proteger una área determinada son mínimas, y que la muerte de las larvas-

insecto se presenta a largo ó a corto tiempo, dependiendo de la concentración del complejo espora-cristal. El fenómeno tiene varias explicaciones: Una es que las larvas mueren inmediatamente por el cristal proteínico tóxico que produce la bacteria durante la esporulación (mecanismo de acción descrito en antecedentes), otra es que las esporas, las cuales representan el agente infeccioso, causan la muerte del insecto por septicemia (mecanismo también descrito en antecedentes). Generalmente, un insecto que ha estado en contacto con el insecticida microbiano y que no muere inmediatamente, no significa que esté sano y activo. Como es un insecticida biológico que actúa por vía oral, provoca la parálisis del canal digestivo de la larva y los efectos se manifiestan después de haberlo ingerido. Las larvas pueden permanecer en sus sitios unos días aparentemente vivas, pero al tener paralizado el canal digestivo, no pueden alimentarse y por lo tanto no causan daño alguno y en períodos cortos mueren. Las propiedades descritas anteriormente lo colocan como un insecticida de mayor potencia comparado con algunos plaguicidas químicos, además explica el porque con cantidades pequeñas se pueden controlar grandes poblaciones larvarias.

Varios autores han realizado estudios tendientes a probar la toxicidad de este bioinsecticida, tanto en almacenes como en estudios de campo (McGaughey 1978, 1982; Elliott et. al 1988).

Estos autores han encontrado que las preparaciones del bioinsecticida son eficaces para la exterminación de plagas como las causadas por *E. cautella*, *Lymantria dispar* y muchas clases de

palomillas.

En este trabajo sólo se estudiaron dos especies de palomillas-plaga de granos en almacenamiento. Sin embargo, debido a que los almacenes representan ambientes controlables en relación a factores externos, son lugares propicios para el desarrollo y proliferación de varias especies-plaga de insectos que dañan de manera importante a los granos que en ellos se guardan. Sin embargo, podemos decir que su utilidad continúa extendiéndose y que en un futuro estas alternativas serán una buena medida de control biológico, eficaz y seguro no solamente para los almacenes, sino también de insectos-plaga que perjudican a los cultivos agrícolas (Elliott 1988). Al respecto, si se piensa en la aplicación del complejo en el campo, se tiene que pensar necesariamente en el tipo de acarreador con que se mezcle el bioinsecticida para atraer a los insectos. En nuestro caso, se usó harina de maíz debido a que las palomillas fueron colectadas originalmente de granos de maíz. En otro tipo de grano ó cultivo, se puede sugerir un acarreador igual ó parecido al que la plaga esté atacando.

Por otra parte, si el bioinsecticida se quiere aplicar en el campo, hay que tomar en cuenta que en este caso la lluvia, los cambios bruscos de temperatura, el viento y la luz solar pueden influir determinantemente en su efectividad. Para ello se sugiere implementar algunas medidas, por ejemplo, si poco después de una aplicación ocurre una lluvia fuerte, es recomendable de aplicar nuevamente el bioinsecticida. Los ensayos de termo-resistencia de las esporas realizados en este trabajo, ilustran claramente que



el bioinsecticida actúa idealmente en un clima caliente, pues es propicio para que las larvas se alimenten con mayor intensidad. Sin embargo, bajo estas condiciones se puede sugerir su aplicación de preferencia al amanecer ó al atardecer, cuando las condiciones son más frescas y hay menos evaporación o viento. También se sabe que el complejo no es sensible a la degradación por la luz del sol (Pozsgay, M. y col. 1987).

## VI CONCLUSIONES.

1.- De los medios de cultivo estudiados se desprende que *B. thuringiensis* crece y produce el bioinsecticida en forma abundante en el medio compuesto por harina de soya, melaza y bifosfato de potasio. Dicho medio resultó ser el más apropiado para llevarse a cabo a una escala de mayor producción. Estos resultados también muestran, que la producción del bioinsecticida es posible mediante el crecimiento de esta bacteria en medios de cultivo compuestos por materias primas nacionales y de bajo costo, por lo tanto factible de ser producido en nuestro país.

2.- La temperatura entre 30 y 35 °C, así como la adición de una sal amortiguadora (bifosfato de potasio) favorecieron un buen rendimiento del complejo espora-cristal, lo cual permitió un escalamiento de producción a un fermentador de 25 l. Estos resultados demuestran que factores importantes como la temperatura y el pH pueden ser controlables.

3.- La formulación de este medio de cultivo, resultó en un alto rendimiento en peso seco para las otras cepas de *B. thuringiensis* crecidas, por lo que se concluye que puede ser utilizado para el desarrollo de cualquier otra variedad de *B. thuringiensis*.

4.- Las pruebas de termo-resistencia indicaron que el bioinsecticida es completamente estable a condiciones ambientales

adversas, como se demostró por la pasteurización. Esto significa que el complejo espora-cristal se puede aplicar en los campos de cultivo sin temor a ser inactivado por el calor.

5.- En cuanto a las pruebas de toxicidad, se puede decir que las cuatro variedades de *B. thuringiensis* mostraron ser mortales para las dos especies-plaga: *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*, siendo la variedad *kustaki* la más tóxica para *Ephestia cautella* ya que en sólo 3 días y con una concentración muy baja (0.360%) logró matar a la mitad de la población larvaria; en cambio, la variedad más letal para *Sitotroga cerealella* fue la *tolworthi*, la cual mató a la mitad de la población en 4 días con una concentración de 0.082% del complejo espora-cristal.

Estos resultados son interesantes, porque con ellos se comprueba que el bioinsecticida es una alternativa eficaz para el control de insectos-plaga en vez de los pesticidas químicos, los cuales tienen efectos secundarios en los ambientes donde se aplican.

## VII PERSPECTIVAS

En base a los resultados de este trabajo es importante resaltar las siguientes proposiciones:

1.- El alcance de este proyecto no termina con la selección del medio de cultivo para el insecticida microbiano, una alternativa es seguir su escalamiento en un fermentador de mayor capacidad, con condiciones ambientales de temperatura, tensión de oxígeno y pH, controladas para la obtención de un alto rendimiento.

2.- La sensibilidad de los insectos Lepidópteros es variable a la acción tóxica del complejo espora-cristal, de acuerdo a la variedad considerada. En el caso específico de *Ephestia cautella* y *Sitotroga cerealella*, las variedades más virulentas son *tolworthi* y *kustaki*, por lo tanto son las más recomendables para estudios posteriores.

3.- Otra pauta a seguir en estas investigaciones son las pruebas de campo con nuevas formulaciones que sean acordes a las condiciones geográficas de nuestro país, para lo cual es recomendable hacer más estudios con bioinsecticidas con características de menor costo y con ventajas sobre el control de las plagas.

4.- Es importante mencionar que en la actualidad se presentan algunos problemas como son: el desarrollo de resistencia por parte de los insectos plagas y su estabilidad en el campo, pero con los avances en las diversas técnicas de la ingeniería genética habrá

nuevas cepas con un espectro más amplio hacia las plagas.

5.- En cuanto a los procesos de recuperación del complejo espora-cristal, la técnica de centrifugación de flujo continuo resulto ser la más recomendable, debido a las ventajas en cuanto al tiempo y a la recuperación del material, lo cual es importante si consideramos su producción a un nivel industrial. Para que una compañía invierta en la producción de un producto, debe hacer estudios sobre los gastos y el tiempo del proceso, los cuales deben bajos y cortos para una mejor optimización. Por otra parte si se opta por el proceso de floculación, la recuperación del material es casi igual que el proceso anterior sólo que la recuperación requiere de un tiempo mayor y en este caso implicaría la adquisición de tanques apropiados al volumen del cultivo requerido. Sin embargo; si se aumenta la escala de producción se necesitará del estudio de otros métodos de separación del complejo espora-cristal, porque a medida que se incrementa el volumen de producción surgen más problemas en cuanto a la separación, y es probable que ya no funcionen los métodos descritos anteriormente. Si este es el caso, podrían ensayarse otros métodos que involucren la separación de proteínas, como podrían ser las técnicas electroforéticas o bien técnicas de separación cromatográfica a gran escala.

## VIII BIBLIOGRAFIA.

- ADANG, M.J., FIROOZABADY E., KLEIN J., DEBOER D., SEKAR V., KEMP J.D., MURRAY E., ROCHELEAU T.A., RASHKA K., STAFFELD G., STOCK C., SUTTON D. & MERLO D.J. (1987). Expression of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene in tobacco plants. *Molecular strategies for crop protection*. 46: 345-353.
- AMULEXEN, R., AND M. LINS. (1968). Comparative thermostability of enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:765-769.
- ARANDA, H.E. (1987). Modelos de predicción de eventos biológicas para plagas insectiles. *Problemas de Contaminación en México*. 2:8-10.
- ARONSON, A.I., BECKMAN W. & DUNN P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. rev.* 50:1-24.
- ARCAS, J., O. YANTORNO AND R. ERTOLA. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biothech. Letters*. 9:105-110.
- BAI, C. & DEGHEELE D. (1988). Polypeptides and shape of the *Bacillus thuringiensis* berliner crystal. *Meed. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. 53:261-265.
- BARTON, K.A., WHITELEY H.R. & YANG N.S. (1987). *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant*

*Pysiol.* 86:1103-1109.

BURGERIGON, A. & P. GRISON. (1971). Effects of *Bacillus thuringiensis* Berlinen (Crystaux-spores et toxine thermostable) sur le potential biotique de *Zeirapheradiniana* Gn. *A. Sci. For.* 28: 391-401.

CHUNGJATUPORNCHAI, W., HOFTE H., SEURINCK J., ANGSUTHANASOMBAT CH. (1988). Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for diptera and lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* 173:9-16.

COTTON, R.T. (1963). Pests of stored grain and grain products. Burgess Publising Co. Minneapolis Minn. EUA. pp. 318.

CRAWFORD, D.C. & HARVEY W.R. (1988). Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurtaki*  $\delta$ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. exp. Biol.* 137:277-286.

CRICKMORE, N., Nicholls C., Earp D.J., Hodgman C. & Ellar D.J. (1990). The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal  $\delta$ -endotoxin combinations. *Biochem. J.* 270: 133-136.

DELÉCLUSE, A., CHARLES J.F., KLIER A. & RAPOPRT G. (1991). Deletion by in vivo recombination show that the 28- kilodalton cytolytic polypeptide form *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* 173:3374-3381.

DRAKE, B.B. AND SMYTHE, C.V. (1963). U.S. PANTENT 3,087,865

- DULMAGE, H. T. (1970). Production of the spore- $\delta$ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.*, 11:385-389.
- DULMAGE, H. T. (1971). Production of  $\delta$ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 18:353-358.
- ELLIOTT, L.J., R. SOKOLOW, M. HEUMAN AND S. ELEFANT. (1988). An exposure characterization of a large scale application of a biological insecticide, *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Ind. Hyg.* 3:119-122.
- ESCAMILLA, M.J.E. (1979). El control biológico de plagas. *Naturaleza.* 6:363-373.
- FEITELSON, J.S., PAYNE J. & KIM L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/technology.* 10: 271-275.
- HAIDER, M.Z. & ELLAR D.J. (1987). Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal  $\delta$ -endotoxin. *Biochem. J.* 248:197-201.
- HAIDER, M.Z. & ELLAR D.J. (1988). Investigation of relationships between structure and insecticidal specificity for a *Bacillus thuringiensis aizawai* delta-endotoxin. *Bacterial Protein Toxins, Zbl. Bakt. Suppl.* 17:53-54.
- HERBERT, D.A. & HARPER J.D. (1987). Food comption by *Heliothis zea* (leptidoptera: noctuidae) larvae intoxicated with a  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 80:593-596.



- HIMENO, M. (1987). Mechanism of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Toxicol. Toxin Reviews*. 6:45-71.
- HINTON, H.E. AND CORBER, H.S. (1972). Common insect pests of stored food products. A guide to their identification. British Museum (Natural History). *Economic Sciences*. 15:61
- HOFMANN, CH., LUTHY P., HUTTER R. & PLISKA V. (1988a). Binding of delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem*. 173:273-280.
- HOFMANN, CH., VANDERBRUGGEN H., HOFTE H., VAN RIE J., JANSENS S. & VAN MELLAERT H. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:7844-7847.
- HOY, M.A. & OUYANG Y.L. (1987). Toxicity of the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari:Tetranychidae and Phytoseiidae). *J. Econ. Entomol.* 80:507-511.
- HUFFAKER, C.D. & MESSENGER, P.S. (1976). Theory and practice of biological control. pp. 29-31 y 175. Academic Press, New York.
- KISINGER, R. A., and WM. H. MCGAUGHEY.(1979) Susceptibility of populations of indianmeal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 72:346-349.
- KNOWLES, B.H., THOMAS W.E. & ELLAR D.J. (1984). Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-

specific toxin is an initial insecticidal action.  
*FEBS. LETT.* 168:197-202.

KNOWLES, B.H. AND D.J. ELLAR. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 924:153-157.

KNOWLES, B.H., BLATT M.R., TESTER M., HORSNELL J.M., CARROLL J., MENESTRINA G. & ELLAR D.J. (1989). A cytolytic  $\delta$ - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEB. LETT.* 244:259-262.

MCGAUGHEY, W.H. (1976). *Bacillus thuringiensis* for control in three species of moths in stored grain. *Can. Entomol.* 108:105-112.

MCGAUGHEY, W.H. (1978). Moth control in stored grain: efficacy of *Bacillus thuringiensis* on corn and method of evaluation using small bins. *J. Econ. Entomol.* 108:105-112.

MCGAUGHEY, W.H. (1982). Evaluation of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* for control of the indianmeal moth and almond moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) in stored inshell peanuts. *J. Econ. Entom.* 75:754-757.

MADDRELL, S.H.P., LANE N.J., HARRISON J.B., OVERTON J.A. & MORETON R.B. (1988). The initial stages in the action of an insecticidal  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the epithelial cells of the malpighian tubules of the insect, *Rhodnius prolixus*. *J. Cell. Sci.* 90:131-144.

MADDRELL, S.H.P., OVERTON J.A., ELLAR D.J. & KNOWLES B.H. (1989).

- Action of activated 27 000 Mr toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on malpighian tubules of the insect, *Rhodnius prolixus*. *J. Cell. Sci.* 94:601-608.
- MAHILLON, J., CHUNGJATUPORNCHAI W., DECOCK J., DIERICKX S., MICHIELS F., PEFEROEN M. & JOOS H. (1989). Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS. Microbiol. Lett.* 60:205-210.
- NAKAMURA, K., OSHIE K., SHIMIZU M., TAKADA Y., OEDA K. & OHKAWA H. (1990). Construction of chimeric insecticidal proteins between the 130-kDa and 135-kDa proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for analysis of structure-function relationship. *Agric. Biol. Chem.* 54:715-724.
- ONTIVEROS, F.I.G. (1988). Bioenzayo de 4 cepas de *Bacillus thuringiensis* como agente entomopat6geno sobre dos especies de lepidopteros plaga de granos almacenados: *Ephestia cautella* y *Sititroga cerealella*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- PEARSON, D. & WARD O.P. (1987). Purification of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of novel bioassay technique. *Biotechnol. Lett.* 9:771-776.
- PAO-INTARA, M., ANGSUTHANASOMBAT CH. & PANYIM S. (1988). The mosquito larvicidal activity of 130 kDa delta-endotoxina of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* resides in the 72 kDa amino-terminal fragment. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 153:294-300.
- POZSGAY, M., P. FAST., H. KAPLAN, AND P.R. CAREY. (1987). The

- effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var *kustaki* HD1 and NRD12: A Raman spectroscopic study. *J. Invertebr. Pathol.* 50:246-253.
- RAMIREZ, M.M. (1981). Insectos y almacenamiento de granos. *Naturaleza.* 2:92-100.
- REISNER, W.M., FEIR D.J., LAVRIK P.B. & RYERSE J.S. (1989). Effect of *Bacillus thuringiensis* *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin on insect malpighian tubule structure and function. *J. Invert. Pathol.* 54:175-190.
- RIVERA, J.L. (1986). Producción y ensayo de *Bacillus thuringiensis* como agente entomopatógeno. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- SACCHI, V.F., PARENTI P., HANOZET G.M., GIORDANA B., LUTHY P. & WOLFERSBERGER M.G. (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K<sup>+</sup>-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS. LETT.* 204:213-218.
- SHIVAROVA, N. (1989). Raising the efficiency of conjugative transfer in *Bacillus thuringiensis*. *Comptes rendus de l'academie des sciences.* 42:83-85.
- SINGLETON, R., AND R.E. AMELUXEN. (1973). Protein from thermophilic microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 37:320-342.
- SOURTTY, T., YLINEN L. & KARPPA P. (1987). Analytical and preparative methods for  $\beta$ -exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Cromatographia.* 24:745-447.
- VAECK, M., REYNAERTS A. & HOFTE H. (1989). Protein engineering

in plants: expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. 6:425-439.

VAN RIE, J., JANSSENS S., HOFTE H., DEGHEELE D. & VAN MELLAERT H.(1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ - endotoxins importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.

WARTH, A.D.(1978). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 134:699-705.

WHITELEY, H.R & SCHNEPF H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann.Rev.Microbiol.* 40:549-76.

WOLFERSBERGER, M.G. (1989a). The toxicity of two *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia.* 46:475-477.

WOLFERSBERGER, M.G. (1989b). Neither barium nor calcium prevents the inhibition by *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin of sodium- or potassium gradient-dependent amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane vesicles. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 12:267-277.