



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* DE TIERRA
DE CULTIVO DE TEMPORAL DE MAÍZ Y FRIJOL EN VILLALDAMA VERACRUZ

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

PAULA RODRÍGUEZ FIGUEROA

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ
DIRECTOR DE TESIS

ASESOR DE TESIS

Q.F.B. OSCAR GONZÁLEZ MORENO
ASESOR DE TESIS



LO HUMBANO
R/E
DE NUESTRA REFLEXION

México, DF 2000



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

CARRERA DE Q.F.B.

SOLICITUD DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS

1. Nombre del solicitante: RODRIGUEZ FIGUEROA PAULA
2. No. de cuenta 7918673-1 3. Año en que termina la carrera: 1997
4. Título del tema: AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Bacillus thuringiensis* DE TIERRA DE CULTIVO DE TEMPORAL DE MAIZ Y FRIJOL EN VILLALDAMA VERACRUZ.
5. Director de tesis: Q.F.B. IDALIA L. FLORES GOMEZ
6. Lugar en el que se desarrollará el trabajo experimental:
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
- 7 Domicilio del solicitante: C. MARIQUITA # 225 COL. BENITO JUAREZ
CD. NEZAHUALCOYOTL EDO. MEX. C.P. 57000 Teléfono. 7366558
- 8 Observaciones:
9. Orientación de la carrera: CLINICOS
10. Tiempo aproximado del proyecto: SEIS MESES
11. Fecha de inicio: MARZO 1998
12. Opción de titulación: TESIS EXPERIMENTAL

México, D.F. a, 14 de mayo de 1998

Q.F.B. IDALIA L. FLORES GOMEZ
DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. OSCAR OSCAR MORENO

ASESOR DE TESIS

RODRIGUEZ FIGUEROA PAULA
SUSTENTANTE

M. en C. JOSE RAFAEL ALFONSO MORA GUEVARA
SECRETARIA TÉCNICA
JEFE DE LA CARRERA

S EÑORES, SOÑEMOS, Y QUIZAS HALLAREMOS LA VERDAD, PERO GUARDEMOS DE DARLES CREDITO O PUBLICAR NUESTROS SUEÑOS ANTES DE QUE HAYAN SIDO SOMETIDOS A PRUEBA POR UNA MENTE DOTADA DE DISCERNIMIENTO QUE ESTE COMPLETAMENTE DESPIERTA.

F.A. Kekulé (1890)

DEDICO ESTA OBRA A :

MI AMIGO Y COMPAÑERO
DE SIEMPRE PARA TI
JESUS.

A MI BELLO AMANECER
MI HIJO **DIEGO AKIRA**

A MI ABUELA QUE AUNQUE
YA NO ESTES FUISTE EL PILAR
DE MI FORMACION COMO SER
HUMANO " MUJER"

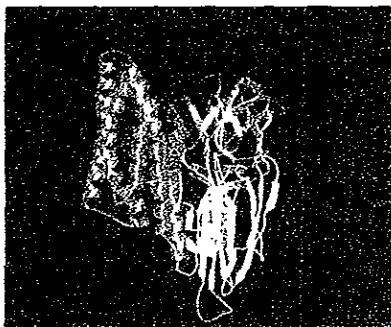


TABLA DE CONTENIDO

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVO	3
3. HIPOTESIS	4
4. MARCO TEORICO	5
4.1. CONTROL QUIMICO	6
4.2. CONTROL BIOLÓGICO	7
4.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
4.3.1. MODO DE ACCIÓN	16
4.3.2. TOXICIDAD EN MAMIFEROS	18
4.4. GENERALIDADES DE SUELO	22
4.4.1. RECOLECCION DE MUESTRAS DE SUELO	24
4.5. TAXONOMIA NUMERICA	25
4.5.1. ETAPAS DE LA TAXONOMIA NUMERICA	26
4.5.1.1. MATRIZ EN TABLERO DE AJEDREZ	26
4.5.1.2. SELECCION DE LA CEPAS	27
4.5.1.3. SELECCION DE CARACTERES	28
4.5.2. CALCULO DE SIMILITUD	30
5. MATERIAL	32
5.1. CRISTALERIA	32
5.2. EQUIPO	32
5.3. MATERIAL DIVERSO	33
5.4. MATERIAL BIOLÓGICO	33
5.5. MEDIOS DE IDENTIFICACION	34
5.6. REACTIVOS	34
5.7. CEPAS	34
6. METODO	35
6.1. DIAGRAMA DE FLUJO	35
6.2. TOMA DE MUESTRA	36
6.3. AISLAMIENTO	37
6.4. IDENTIFICACION PRESUNTIVA	38
6.4.1. MORFOLOGIA COLONIAL	38
6.4.2. MICROMORFOLOGIA	39
6.4.2.1. TINCION DE GRAM	39
6.4.2.2. TINCION DE SHAEFER Y FULTON	40
6.4.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS	40
6.5. CARACTERIZACION BIOQUIMICA	41
7. RESULTADOS	44
7.1. TOMA DE MUESTRAS	44
7.2. AISLAMIENTO	44
7.3. IDENTIFICACION PRESUNTIVA	47
7.4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA	48
7.5. DISEÑO ESTADISTICO	50
7.5.1. CALCULO DE SIMILITUD BACTERIANA	51

8. DISCUSION DE RESULTADOS	55
8.1. TOMA DE MUESTRAS	55
8.2. AISLAMIENTO	55
8.3. IDENTIFICACION PRESUNTIVA	56
8.4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA	57
9. CONCLUSIONES	59
10. CITAS	60
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
12. ANEXOS	63
12.1. MEDIOS DE CULTIVO	63
12.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS	64
12.3. METODO DE AISLAMIENTO POR ESTRIA CRUZADA	67
13. GLOSARIO	68

INTRODUCCIÓN.

Actualmente las plagas de maíz y de frijol en México son un problema común que afecta a las zonas agrícolas. Datos del CIAT indican que las plagas más importantes de esos granos son el gorgojo pardo (*Acanthoscelidos octetus*), el gorgojo pinto mexicano del frijol (*Sabrotes subfasciatus*) así como el gorgojo del maíz (*Sitophilus zea maiz*). Estas plagas afectan desde la fase de cultivo hasta el almacenaje de ambos granos causando pérdidas hasta en un 35 % de la producción nacional. Hasta 1996 el combate a las plagas citadas se había hecho a través del uso de insecticidas y plaguicidas químicos. Se estima que de un 100 % de los plaguicidas utilizados, solo el 1 % alcanza su objetivo y el 99 % restante recae en el ambiente provocando el desarrollo de resistencia en las plagas, intoxicación, contaminación y el surgimiento de nuevas plagas. En la búsqueda de una opción para el combate de estas plagas en zonas de agricultura se han encontrado vanas alternativas, destacándose de entre ellas los bioinsecticidas

Un bioinsecticida es un producto que se aplica a la planta en presencia del insecto parásito que contiene microorganismos patógenos para el mismo insecto. Las bacterias y los virus son los microorganismos que con mayor frecuencia se utilizan como bioinsecticidas. Las bacterias más usadas contra las plagas citadas son *Clavibacter xyfi cynodontis* y *Bacillus thuringiensis*.

Los bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* son altamente tóxicos para plagas específicas dejando ileso al hombre, a los cultivos, a la vida silvestre, no persisten en el ambiente y pueden ser producidos mediante procesos de fermentación.

Esta bacteria es un bacilo fácil de aislar a nivel de laboratorio, puede ser aislado fácilmente de muestras de suelo agrícola por métodos sencillos: dilución y siembra por estría cruzada utilizando medios de cultivo como agar soya tripticaseína y agar nutritivo

Bacillus thuringiensis es uno de los principales entomopatógenos y su característica determinante es que produce un cuerpo cristalino proteico o cuerpo paraesporal: la endotoxina delta. La ingestión del complejo espora-endotoxina de la bacteria por larvas de insectos susceptibles, representa para el patógeno una oportunidad para proliferar extensamente. En el proceso patológico, las esporas juegan un papel pasivo ya que solo cuando el pH intestinal ha disminuido, producto de la destrucción del epitelio intestinal por la delta-endotoxina, son las células vegetativas capaces de proliferar colonizando el hemocele y causando una septicemia letal en el insecto que finalmente se traducirá en cadáveres que contienen una elevada cantidad de esporas y cristales causando con esto la muerte de las larvas y de los insectos.

Desafortunadamente en México el área de investigación en bioinsecticidas no está tan desarrollado como se desearía a pesar de que a nivel mundial México es uno de los principales consumidores de bioinsecticidas hechos a base de *Bacillus thuringiensis*. Por lo cual considero que el aislamiento, así como la identificación de una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* es fase inicial para la formulación de un bioinsecticida a base de este microorganismo.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Revisando la literatura se encontró que en los países más desarrollados la investigación, aplicación y comercialización de insecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* estaba en plena efervescencia, en México prácticamente no existían antecedentes y a nivel comercial, ni siquiera se conocían los productos de manufactura extranjera (1956-1965 según datos del anuario de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de esos años). Actualmente en México no existe desarrollo tecnológico ni comercial de *Bacillus thuringiensis* por lo que a nivel mundial México es uno de los principales consumidores e importadores de *Bacillus thuringiensis* para el control de estas plagas. ¹

En 1996 el INEGI reporta las siguientes importaciones¹⁴:

INSECTICIDAS FORMULADOS A BASE DE OXAMIL, ALDICARB, <i>Bacillus thuringiensis</i>		
PAÍS	CANTIDAD KG	VALOR EN MILES DE PESOS
ALEMANIA	11 060	897
ARGENTINA	810	90
BRASIL	202	55
DINAMARCA	10 842	875
ESTADOS UNIDOS	927 846	72 900
FRANCIA	1 798	234
GUATEMALA	244 032	4 953
INDIA	19 829	1 510
ISRAEL	64 206	3 926
REINO UNIDO E IRLANDA	24 196	1 800
SUIZA	5 584	439
CHINA	111 360	2 349
TOTAL	1 421 765	90 028

La tabla anterior muestra el nivel de dependencia de las importaciones de nuestro país. Además de lo anterior se tiene que en el marco del TLC las nuevas disposiciones para la exportación de productos agrícolas tienen que cubrir más requisitos en cuanto a medidas fitosanitarias

Ante lo cual, una alternativa es la de fomentar el desarrollo de una metodología para obtener cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y que estas se utilicen para elaborar bioinsecticidas con tecnología del país, para no depender al 100% de las importaciones de este producto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar *Bacillus thuringiensis* de tierras de cultivo de temporal de maíz y frijol de Villaldama Veracruz, con los recursos de la FES Zaragoza.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Desarrollar una metodología para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* a partir de tierras agrícolas con los recursos con los que cuenta la Facultad de Estudios superiores "Zaragoza"
- Purificar una cepa de *Bacillus thuringiensis* a partir de su aislamiento de suelos agrícolas.
- Identificar y diferenciar a *Bacillus thuringiensis* de otras bacterias con base en sus *características morfológicas coloniales macroscópicas* y morfología microscópica.
- Caracterizar bioquímicamente a las cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelos agrícolas.

3. HIPOTESIS

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se encuentra libre en la naturaleza ya sea en suelos o infectando insectos plaga; por tal motivo se podrá aislar e identificar de estas fuentes, en este caso de tierras cultivables del Estado de Veracruz, en un medio de cultivo adecuado.

4. MARCO TEÓRICO

El hombre ha tomado conciencia de los graves daños que está causando a la ecología con el uso irrestricto de pesticidas químicos y esto ha sido el motivo principal de la investigación sobre métodos biológicos de control de plagas ¹⁷

Las plagas están constituidas principalmente por nemátodos, caracoles, ácaros, insectos, aves y roedores.

Una plaga se define en su sentido más amplio como cualquier especie que el hombre considera perjudicial a su persona, a su propiedad o al medio ambiente. Desde el punto de vista agrícola, plaga es una población de animales fitófagos, es decir, que se alimentan de plantas, que reduce la producción del cultivo, que afecta el valor de la cosecha e incrementa los costos

En general se acepta que el control de una plaga consiste en mantener la densidad de su población por debajo del nivel en el cual comienza a causar perjuicio económico. Por método de control se entiende todo aquel sistema natural o artificial que da como resultado la prevención, represión o la exclusión de una plaga.

Para llevar a cabo la práctica del control de plagas sobre todo en la reducción de las densidades de las poblaciones de insectos, se requiere de la utilización de diversos métodos o técnicas de control. Estos métodos se suelen clasificar según su naturaleza de la manera siguiente. Control químico, Control biológico, Control físico, Control mecánico, Control genético y Control integral o manejo de plagas, de estos solo se explican a continuación los dos primeros.

4.1. CONTROL QUÍMICO

Aunque el control químico puede reducir substancialmente la población de una plaga, es frecuente que el éxito sea temporal y vaya seguido por un resurgimiento de la plaga a mayores densidades de las que se tenían antes de que el control fuese iniciado. El costo de este éxito (que es a corto plazo, en cuanto a adición, al precio de las sustancias químicas) se refleja en la contaminación del ecosistema, en una amplia mortalidad de fauna silvestre y en el desarrollo de plagas resistentes.

En la actualidad se disponen de unas 400 clases de plaguicidas químicos para uso agrícola. Entre estos plaguicidas sintéticos destacan por su uso: Los hidrocarburos clorados (incluyendo al DDT), dieldrín , aldrin , heptacloro, clordano, endrín y lindano por mencionar algunos. Todos ellos han causado daños al medio ambiente y a la vida, tanto humana como animal, ya que su degradación se da con suma lentitud y también se sabe que estos se dispersan en el aire y son arrastrados por los vientos a zonas muy alejadas de la región en que fueron aplicados y que algunos de estos residuos se pueden desplazar hacia los abastecimientos de agua a través de las aguas de riego. Y una vez que penetran en los ríos y lagos, los plaguicidas se dispersan de un modo ilimitado. Parte de estos plaguicidas, que están presentes en el agua, es absorbida por las algas o plancton, y de esta manera penetran en la cadena alimenticia, contaminando además el suelo⁶.

Por lo que valorando el grave problema que implica el uso de plaguicidas químicos, algunos grupos ecologistas han sugerido un control más natural para el combate a las plagas que perjudican a la agricultura. Dentro de los métodos sugeridos se encuentra el de control biológico.

4.2. CONTROL BIOLÓGICO

Por control biológico se entiende el combate de plagas a través de sus enemigos naturales, esto es, mediante la acción de depredadores, parásitos y patógenos.

Existen dos tipos de control biológico: el natural y el artificial.

El control biológico se considera natural cuando este se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre. Se considera artificial o aplicado cuando es manipulado por el hombre

En todos los campos agrícolas existe un cierto grado de control biológico natural, pero no siempre los enemigos naturales son abundantes ni en especie ni en eficacia, por lo que debe considerarse que la aparición y la abundancia de enemigos biológicos no siempre aseguran un control eficaz de las plagas. Por esta razón es necesario mejorar su eficacia ya que con frecuencia se necesita la intervención del hombre para proteger o incrementar a los enemigos naturales de las plagas.

A diferencia del uso los plaguicidas químicos, el control biológico tiene algunas características ventajosas por las cuales se puede considerar factible como control de plagas: los enemigos biológicos no dejan residuos tóxicos sobre las plantas ni contaminan el medio ambiente, este control no produce desequilibrio en el ecosistema agrícola y las plagas no desarrollan resistencia a su enemigo biológico.

Dentro del control biológico existen varios métodos de tipo biológico que se han ensayado: uno ha sido la utilización de plantas con resistencia natural a ciertas plagas comunes. Siendo este método muy prometedor, tiene la desventaja de implicar tiempo e investigación largos, para la obtención de variedades resistentes a los insectos plaga. Otro método investigado se ha dedicado a aislar compuestos químicos que actúan como atrayentes sexuales de insectos específicos. Estos compuestos químicos son las feromonas que normalmente secretan los insectos hembras y sirven para estimular y atraer a los insectos macho. Sin embargo el uso a

gran escala de las feromonas aún no ha sido completamente efectivo, pero las pruebas indican que es prometedor.

Otro de los métodos sugeridos es el de las hormonas juveniles de insectos específicos. La idea consiste en aislar y determinar la estructura de estas hormonas y a continuación se podrían elaborar formas sintéticas de dicha hormona que serían muy selectivas, las cuales, estando en contacto con las larvas podrían evitar el desarrollo del insecto; Estas ya se han identificado, sintetizado y probado pero aún no se encuentran a nivel comercial

Otra técnica consiste en utilizar las enfermedades que sufren los insectos causadas por hongos, bacterias, y virus. Por lo general, estos microorganismos son inofensivos para plantas, animales y seres humanos.

Es este último método el que se está utilizando para el control de plagas de insectos principalmente y a los microorganismos que se usan para combatirlos se les da el nombre de entomopatógenos o bioinsecticidas conociéndose actualmente más de 100 mil especies de microorganismos, de los cuales más de 1500 son entomopatógenos y de ellos más de 100 especies son bacterias aisladas de insectos y de muestras de suelo.¹¹

Por definición un bioinsecticida es un producto que se aplica en la planta en presencia del insecto parásito que tiene microorganismos patógenos para el mismo insecto.¹⁷ Para que un microorganismo o su producto pueda usarse como bioinsecticida contra un insecto plaga de importancia agrícola forestal, doméstica y ornamental debe cumplir las siguientes características

1. Facilidad de tecnología para su producción masiva.
2. Efectivo.
3. Eficiente.
4. Seguro, o sea no tóxico para el hombre, plantas y animales.
5. De fácil transporte.

6. Estable al almacenamiento.

7 Persistencia aún después de la aplicación en el hábitat natural.

Tenemos que los microorganismos entomopatógenos que reúnen estos requisitos o características son las bacterias del género *Bacillus* sobresaliendo el *Bacillus thuringiensis*. Otras bacterias en importancia son las siguientes. *Bacillus popilliae*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus moritai*.^{6 16}

Los miembros del género *Bacillus* son fáciles de aislar de la tierra y del aire y se encuentran entre los organismos más frecuentes que aparecen cuando se siembran muestras de tierra en placas de agar con medios que contienen varios nutrientes.

Dentro de este género tenemos microorganismos formadores de esporas que pueden aislarse en forma selectiva de la tierra exponiendo la muestra a 80°C de 10 a 30 minutos para de esta manera liberar las esporas, las cuales permanecen viables. Cuando se siembran en placas e incuban en forma aeróbica, las colonias que se desarrollan son casi exclusivamente del género *Bacillus*.

Este género en general crece bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc. como únicas fuentes de carbono y por otro lado el amonio como única fuente de nitrógeno. También muchos miembros de este género producen enzimas extracelulares: amilasa, colagenasa, hemolisina, lecitinasa, fosfolipasa, proteasa y ureasa que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos para utilizarlos como fuente de carbono y donadores de electrones.^{2,3} De ellas solo unas cuantas se emplean comercialmente, entre ellas la especie *Bacillus thuringiensis* que ha demostrado ser un excelente agente de control para plagas del orden lepidóptera.

4.3. *Bacillus thuringiensis*

El *Bacillus thuringiensis* es uno de los principales entomopatógenos, fue descubierto en 1901 por el científico japonés Ishiwata quien reporta una bacteria aislada de un gusano de seda (*Bombix mori*) denominándola *Bacillus sotto*. Sin embargo la primera descripción válida de este microorganismo fue hecha por el alemán Berliner en 1911. Más tarde en 1915 este mismo investigador lo identificó como una nueva especie y propuso el nombre de *Bacillus thunngiensis*, ya que fue aislada en Turingia, Alemania.⁵

Los diversos subgrupos de *Bacillus thuringiensis* están compuestos por bacilos gram positivos, presentan esporas las cuales son centrales y subterminales, los bacilos tienden a formar cadenas cortas aunque también se presentan en pares, aislados. Las colonias tienen un tamaño de 2 a 5 mm de diámetro, tienen una textura rugosa (aspecto de vidrio esmerilado), traslúcidas, con bordes aserrados. A menudo forman proyecciones periféricas rizadas produciendo la clásica apariencia de cabeza de medusa y típicamente carece de cápsula y es generalmente móvil. Las colonias también presentan una ligera elevación en el centro (dan la impresión de un huevo estrellado denominándose *cabeza de medusa*). Son típicamente catalasa positivos presentando flagelos peritricos¹⁹.

Taxonómicamente el *Bacillus thuringiensis* se caracteriza por la producción de una gran variedad de toxinas con diversas propiedades. Se han descrito siete diferentes toxinas para este microorganismo:

1. ALFA EXOTOXINA (conocida como fosfolipasa C),
2. BETA-EXOTOXINA (toxina termoestable),
3. DELTA-ENDOTOXINA (el cristal proteico paraesporal),
4. Una enzima no identificada que puede no ser tóxica,
5. Una toxina lábil.

6 Una toxina soluble en agua aislada de una formulación comercial y

7. Una exotoxina conocida como factor ratón.

Considerando las siguientes como las de mayor importancia:

1 - ALFA-EXOTOXINA: (Fosfolipasa C o lecitinasa).

Esta enzima es capaz de lisar diversos tipos de células, principalmente al afectar los fosfolípidos de la membrana causando la acción necrosante y lítica. Actúa sobre la molécula de lecitina con la formación de diglicerido y fosforilcolina. La lecitinasa producida por *Bacillus thuringiensis* aparece en la fase logarítmica de crecimiento y su mayor actividad en el sobrenadante se observa después de 10 hrs. de inoculación. Es una proteína termolábil, estable en presencia de tripsina y urea 8M.

2 - BETA-EXOTOXINA.

Fue descubierta por Mc Connell y Richard en 1959, al inyectar el sobrenadante esterilizado de un cultivo de *Bacillus thuringiensis* en el hemocele del último estadio larvario de la palomilla *Galleria mellonella*. El aislamiento y caracterización de la Beta-exotoxina fue realizado por Barjac y Dedonder (1965-1968) a partir de la cepa de *Bacillus thuringiensis* serotipo H-1.

En 1969, Farkas propone la estructura química de esta toxina como análogo nucleotídico con un peso molecular aproximado de 700 Da. Estudios posteriores (1977), realizados por resonancia magnética nuclear (RMN) se corrobora el peso molecular de la toxina y su estructura química, definiéndola como un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a un ácido fosfoalárico.

En 1973, Faus informa sobre esta toxina como producto extracelular, dializable, soluble en agua y termoestable a 120 grados centígrados por 15 min. Esta toxina se produce durante la fase de crecimiento exponencial por algunas variedades de *Bacillus thuringiensis*.⁹

Una característica de la toxina es su amplio espectro de toxicidad que abarca diversas ordenes de insectos como; orthoptera, coleóptera, lepidóptera y díptera principalmente. Un boletín

emitido por los laboratorios Abbott (1986) refiere valores de DL-50, para diferentes animales de laboratorio infectados por diversas vías de inoculación. De dicho estudio se desprende que la vía tóxica es por inhalación con 3 mg /g de peso corporal.

El modo de acción de la toxina ha sido investigado por Sebasta y Horská, en 1968 ellos demostraron que la beta exotoxina inhibe el ARN polimerasa dependiente del ADN de *Escheriquia coli* in vitro y sugieren que dicha inhibición es la causa de toxicidad. En 1969 cuando se conoció la estructura química de esta toxina se sugirió que el potencial mutagénico que esta molécula podría tener por su afinidad con el ADN. Esta mutagenicidad fue probada por Meretoja y Carbely en 1971, en varios sistemas de mamíferos.

En 1989 se realizó el estudio más reciente de la mutagenicidad de la toxina por Marec y colaboradores demostrando que esta toxina no causa ninguna actividad genotóxica¹⁶. Sin embargo existe gran controversia en cuanto a el uso de este producto como bioinsecticida, por su material genético que lo compromete con el matenal genético de las células del ser humano

3 - DELTA-ENDOTOXINA.

Esta es la toxina más ampliamente estudiada de *Bacillus thuringiensis* Esta contenida en un cristal paraesporal protéico el cual es termolábil y soluble en solución alcalina. En 1967, Heimpel propone que esta toxina se llame delta endotoxina; sin embargo también se ha sugerido que sólo la porción activa del cristal se debe considerar como delta endotoxina.

Cuando *Bacillus thuringiensis* se propaga en un medio artificial o natural ocurre que después de la fase de crecimiento (fase log), se inicia la formación de endospora en la fase estacionaria

Siendo en el periodo de esporulación, cuando se inicia la biosíntesis del cuerpo paraesporal (cristal) o cuerpo de inclusión el cual contiene la delta-endotoxina

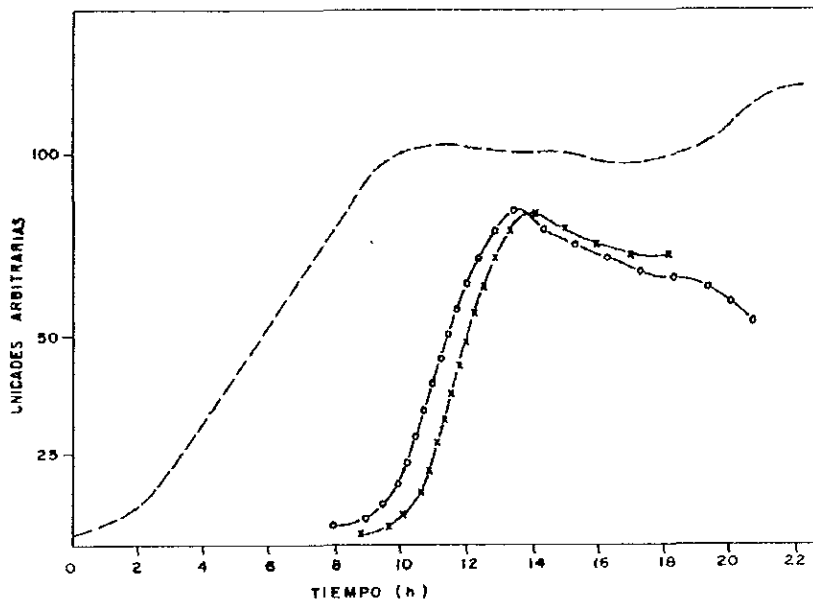


Fig. 1. Cambios bioquímicos durante la esporulación y síntesis del cristal en *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*.

Simbología:

--- = crecimiento x - x = antígenos de cristal
 o - o = esporas viables

Fuente: Betchel, D B , and L A Bulla, 1976

En el esquema se puede observar que después de un crecimiento rápido (de 3-6 horas), se inicia la formación de esporas y antígenos del cristal a las ocho horas de crecimiento.

En la siguiente figura se esquematiza la esporulación y síntesis del cristal en *Bacillus thuringiensis*

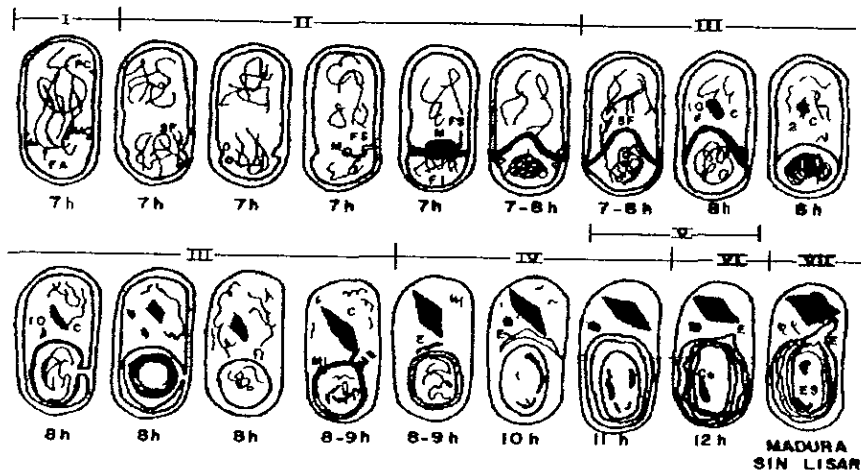


Fig. 2 Esquematación de la esporulación y síntesis del cristal en *Bacillus thuringiensis*.

Abreviaturas:

PC, pared celular;	MC, membrana celular;	M, mesosoma;
FA, filamento axial;	SF, septo de la preespora;	FI, preespora incipiente;
IO, inclusión oval;	C, cristal;	MI, membrana interna;
ME, membrana externa;	E, exosporo;	CO, corteza;
ES, espora madura en una célula sin lisar.		

Figura 2

Fuente: Betchel, D B, and L A Bulla, 1976

En el esquema se observa el inicio de la formación del cristal el cual ocurre entre la séptima y octava hora de crecimiento. El cristal se observará microscópicamente durante la última parte del estadio II aunque algunos investigadores como Firtz-James y Betch y Bulla sugieren que la formación del cristal se da en estadio III.

Una vez que la formación del cristal se ha iniciado, la proteína es sintetizada hasta el final del estadio IV. Aunque se puede continuar hasta el estadio V. La incorporación de aminoácidos radioactivos en la proteína del cristal es muy grande durante los estadios III y IV. Y regresan a su nivel basal hacia el final del estadio IV, ya que parece ser que todas las subunidades del cristal son sintetizadas simultáneamente.

Bioquímicamente se ha demostrado que no existe ARNm del cristal durante el crecimiento vegetativo, pero parece ser sintetizado entre 2-4 hrs después de iniciada la fase de esporulación. De la proteína del cristal producida durante la esporulación más del 80% es sintetizada de nuevo a partir de aminoácidos que se liberan durante la proteólisis que ocurre durante el proceso de esporulación.

Generalmente la forma del cristal es bipiramidal pero se han encontrado cristales de diversas formas y tamaños. Así los cristales de diferentes serotipos difieren en composición y en cantidad de cadenas polipeptídicas

La estructura molecular del cristal y su origen exacto en la célula no se conoce; sin embargo se sabe que la toxina está presente como una protoxina, la cual es hidrolizada a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales del hospedero. Al ingerir los insectos el cristal éste es solubilizado y la protoxina es activada por las proteasas. Se ha observado que los cristales de serotipos diferentes también varían su solubilidad y susceptibilidad hacia las enzimas intestinales

En cuanto al efecto fisiológico que dicha toxina presenta en los insectos hospederos, se ha observado que actúa sobre la superficie de las células epiteliales del intestino, interactuando con lípidos específicos y provocando un efecto similar a los detergentes, rompiendo la membrana celular causando citolisis. Trabajos más recientes sugieren que la toxina de *Bacillus thuringiensis* induce la formación de poros en la membrana tanto en las células epiteliales como en el intestino de los insectos como en las células cultivadas intestinales.

4.3.1. MODO DE ACCIÓN

Los cristales se encuentran agregados en una proteína muy grande que mide aproximadamente 130-140 kDa. En condiciones normales la proteína es una protoxina la cual para desarrollar algún efecto tóxico debe ser primeramente activada. La proteína del cristal es muy soluble en condiciones normales, por lo que esta condición asegura que no tenga efectos tóxicos para los seres humanos, animales y la mayoría de insectos. La solubilización de esta se obtiene a un pH cercano a 9.5, estas condiciones normalmente se encuentran en el intestino de algunas larvas de lepidópteros. Por esta razón la delta endotoxina de *Bacillus thuringiensis* es un bioinsecticida muy específico. Una vez que ha sido solubilizada la toxina en el intestino del insecto y también ha sido activada la protoxina por una proteasa del intestino se produce la toxina activa, la cual mide aproximadamente 60 kDa.

Esta toxina se liga o enlaza con las células epiteliales del intestino ocasionando la formación de poros en la membrana de la célula, provocando un desequilibrio de iones. Como resultado de este proceso el intestino del insecto sufre parálisis, las células epiteliales son lisadas y las larvas dejan de comer. El pH del intestino disminuye hasta que se equilibra con el pH de la sangre. Esta condición permite que las esporas de la bacteria se desarrollen y de esta manera la bacteria invade al huésped causándole septicemia letal.

Trabajos realizados (1989) sugieren que 13 genes codifican para proteínas insecticidas relacionadas, las cuales se denominan proteínas cry. Estos 13 genes se han dividido en cuatro tipos o clases y varias subclases en base a similitudes estructurales y aspectos de toxicidad: específicos para lepidópteros (I) específicos para dípteros y lepidópteros (II), específicos para coleópteros (III) y específicos para dípteros (IV).

En Francia en 1962, la doctora H de Barjac y A. Bonnefoi proponen por primera vez una clasificación serológica con base en los antígenos flagelares para este grupo de bacterias. Más tarde en 1981 de acuerdo a un análisis de flagelos del *Bacillus thuringiensis*, se incluye al menos 20 serotipos y la mayoría de los aislados tienen un modelo de gen protoxina con un complemento único en cada subespecie. Más de 50 genes de protoxinas dan algunos datos de toxicidad y dan bases para la clasificación de estos genes.

Este método de clasificación e identificación se establece en forma internacional para el *Bacillus thuringiensis* ya que es confiable, específico y rápido de desarrollar. Las pruebas bioquímicas, el análisis de estereosomas y de las demás técnicas utilizadas se emplean como criterios complementarios a esta clasificación.⁵ Ver la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación serológica con base en los antígenos flagelares¹⁰.

Properties of δ - endotoxin genes and their products ^a				
Gene designation	Host range ^b	Predicted mass (kDa) of protoxin	Origin of gene (<i>B. Thuringiensis</i> sub-species) ^c	Unique toxicity properties (reference) ^d
<i>cryIA (a)</i>	L	133.2	<i>kurstaki</i> HD1	<i>Bombyx mori</i>
<i>cryIA (b)</i>	L/D	131.0	<i>kurstaki</i> HD1 <i>berliner</i> <i>aizawai</i> <i>alesti</i>	Several lepidoptera
<i>cryIA(c)</i>	L	133.3	<i>kurstaki</i> HD10 <i>kurstaki</i> HD73	<i>Heliothis virescens</i>
<i>cryIB</i>	L	138.0	<i>thuringiensis</i> HD2	<i>Pieris brassicae</i>
<i>cryIC</i>	L	134.0	<i>aizawai</i> <i>entmocidus</i> <i>kenyae</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
<i>cryID</i>	L	132.5	<i>aizawai</i> HD68	<i>Manduca sexta</i>
<i>cryIE</i>	L	133.2	<i>tolworthi</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>cryIF</i>	L	133.6	<i>aizawai</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>cryIG</i>	L	130.0	<i>galleria</i>	<i>Galleria mellonella</i> (52a) ^f
<i>cryIIA</i>	L/D	70.9	<i>kurstaki</i> HD1	Relatively low toxicity for lepidoptera and diptera
<i>cryIIB</i>	L	70.8	<i>kurstaki</i> HD1 (cryptic)	<i>Manduca sexta</i>
<i>cryIIC</i>	L	69.5	<i>shanghai</i>	Good toxicity for <i>Trichoplusia m</i> and <i>Manduca sexta</i> (69)
<i>cryIIIA</i>	C	73.1	<i>san diego</i>	Colorado potato beetle
<i>cryIIIB</i>	C	75	<i>tolworthi</i>	Colorado potato beetle
<i>cryIIIA</i>	D	134.4	<i>israelensis</i> <i>morrisoni</i>	Certain diptera (<i>Aedes aegypti</i>) and blackflies
<i>cryIIIB</i>	D	127.8	<i>morrisoni</i>	Certain diptera (<i>Aedes aegypti</i>) and blackflies
<i>cryIIIC</i>	D	77.8	<i>morrisoni</i>	Certain diptera (<i>Aedes aegypti</i>) and blackflies
<i>cryIID</i>	D	72.4	<i>morrisoni</i>	Certain diptera (<i>Aedes aegypti</i>) and blackflies

Sin embargo hay una correlación general entre el tipo de inclusiones y el grupo de insectos afectados por la toxina. Las inclusiones bipiramidales contienen proteína tóxicas para la larva de los lepidópteros, las inclusiones irregulares y compuestas contienen proteínas tóxicas para las larvas de los dípteros y una inclusión cuadrada o romboide contienen proteínas tóxicas para las larvas de los coleópteros. Las clase de *Bacillus thuringiensis* pueden ser agrupadas de acuerdo a su patogenicidad refiriéndose a su especificidad. Es probable que si bien el cristal es el principio tóxico activo responsable de la parálisis y otros síntomas del hospedero susceptible, en muchos casos el bacilo invade los tejidos y la cavidad del cuerpo acelerando el proceso letal.

La conversión de protoxina a toxina activa en medio alcalino se utiliza para realizar bioensayos con productos de *Bacillus thuringiensis* utilizando una solución amortiguadora de cloruro de sodio.

4.3.2. TOXICIDAD EN MAMÍFEROS:

En 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó y garantizó que *Bacillus thuringiensis* no es tóxico para mamíferos; causando como máximo daño, una irritación en la conjuntiva del ojo la cual se resuelve rápidamente removiendo el material.

Se llevaron a cabo estudios toxicológicos con *Bacillus thuringiensis* serotipo 14 (H-14) en varios animales de laboratorio (ratones, ratas, conejillos de indias, conejos) usando diferentes rutas de administración (hipodérmica, intraperitoneal, oral, percutánea, inhalación, ocular, escarificación). No se demostró toxicidad aguda o crónica usando dosis promedio de 10^7 a 10^8 bacterias por animal. No se pudo inducir el shock anafiláctico en los conejillos de indias, también se hicieron pruebas de desafío máximo y de seguridad de irritación ocular en los mamíferos. Estos resultados confirman la seguridad de *Bacillus thuringiensis* H-14 para con los mamíferos.

El *Bacillus thuringiensis* H-14 se produce por fermentación líquida sumergida. Puede cultivarse sobre medios nutritivos de agar usados para la producción comercial de las otras variedades de la bacteria. el medio de cultivo debe ser seleccionado cuidadosamente ya que de este depende la propagación y toxicidad de la delta-endotoxina, ya que al parecer la fuente de nitrógeno influye en la toxicidad de la delta-endotoxina producida. Sin embargo la concentración de nitrógeno debe ser la adecuada ya que a altas concentraciones produce pleomorfismo evitando la formación del cristal y a concentraciones muy bajas ocasiona un descenso en la producción del cristal. De igual forma resulta la importancia de la fuente de carbono y factores de enriquecimiento. Cada fuente de carbono influye en la producción del cristal, la concentración de azúcares presentes en el medio, debe ser balanceada debido a que la concentración está íntimamente relacionada con la producción de diferentes tamaños de cristal y en cierto grado sube la toxicidad del producto final. Algunos factores de enriquecimiento son indispensables ya que estos acortan el plazo de adaptación en el medio de *Bacillus thuringiensis* Tanto los aminoácidos como las vitaminas son algunos de estos factores de enriquecimiento.

También se requieren mínimas concentraciones de sales minerales para cubrir necesidades de nutrición y esporulación. Algunos de estos son magnesio, manganeso, hierro, zinc y calcio siendo la fuente de este último el carbonato de calcio el cual cumple con la función de proveer de calcio para la esporulación y es un agente neutralizante en el medio. Ver la tabla 2.

Tabla 2 Fuentes nutricionales para *Bacillus thuringiensis*.¹¹

FUENTES DE CARBONO	FUENTES DE NITRÓGENO	FUENTES DE AMINOÁCIDOS Y VITAMINAS	FUENTE DE MINERALES Y SALES
Melazas	Harina de semilla de algodón	Líquidos de remojo de maíz.	Magnesio
Jugos naturales diluidos	Harina de soya	Extracto de malta.	Manganeso
Jugos de agave	Harina de pescado	Peptonas.	Hierro II
	Residuos de desperdicio de pollo.		Zinc
	Caseína		Calcio
	Levadura forrajera.		Carbonato de calcio.

También puede ser cultivado en un medio de esporogonios que contenga autolisado de levadura y sobre un medio con casaminoácidos y citrato de sodio

Crece bien en una variedad de materiales proteicos como polvos comerciales de productos de soya, hanna de pescado, productos de leche evaporada, suero de sangre de una variedad de animales así como el material que contenga materiales fecales humanos de tanques cloacales primarios. Caldos obtenidos de pedazos de carne molida o huesos sostienen el crecimiento de la bacteria y el desarrollo de su toxina sin elementos químicos adicionales.¹¹

Bioquímicamente *Bacillus thuringiensis* presenta las siguientes características:

ROJO DE METILO	+	FENILALANINA	-		
VOGES PROSKAUER	-	CITRATO SIMMONS	+		
CALDO NITRATO	+	UREA DE CHRISTENSEN	+		
ARABINOSA + RF	-	HIDRÓLISIS GELATINA	+		
GLUCOSA +RF	+	HIDRÓLISIS ALMIDÓN	+		
SALICINA	+	CATALASA	+		
XYLOSA + RF	-	HIDROLISIS DE CASEINA	+		
MANIFOL	-	LIPASA	+		
LACTOSA + RF	-	HIDROLISIS DE ESCULINA	+		
LIA {	H ₂ S	-	SIM {	INDOL	-
	LISINA DECARBOXILASA	-		MOTILIDAD	+
				H ₂ S	-

Fuente: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8th Ed 1986

Bacillus thuringiensis presenta esporas que pueden ser: ovoides o cilíndricas, las cuales no deforman la célula en forma apreciable, estas pueden ser centrales o paracentrales.

En la naturaleza, los microorganismos generalmente se encuentran asociados, por lo que para su aislamiento se recurren las técnicas de aislamiento para separarlos. Estas técnicas nos conducen a la obtención de un cultivo puro o axénico (es aquel que contiene una sola especie microbiana) ^{2,19}

Dentro de los métodos más comunes para el aislamiento de bacterias aerobias se tienen los siguientes: técnica de la estría cruzada en placa la cual es una técnica cualitativa muy sencilla, utilizada para aislar bacterias y obtener cultivos puros, una segunda técnica, la de las diluciones es un procedimiento cualitativo y cuantitativo que nos permite conocer tanto el tipo como el número de microorganismos en una muestra. Y es de esperarse que en las diluciones más altas solo exista un tipo de microorganismo.

En ambas técnicas los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación dependerán del microorganismo que se quiera aislar. ^{2,3}

Una vez aisladas las bacterias estas son semitransparentes y es difícil su observación sin teñir. Ante esto las tinciones son de gran utilidad ya que se usa para revelar el tamaño, la forma y la agrupación de los microorganismos para mostrar la presencia de varias estructuras internas y externas y para producir reacciones químicas y físicas específicas.

La presencia de ciertas estructuras y su respuesta a la tinción ayuda a la clasificación e identificación de los microorganismos. ^{2,3}

El estudio de los microorganismos en base a la descripción de la morfología colonial y microscópica no es suficiente para hacer una identificación satisfactoria por lo cual se recurre al estudio de su comportamiento fisiológico y para esto existe un gran número de pruebas metabólicas que nos permiten llegar a la caracterización de un microorganismo ¹⁹

Metabolismo es la suma de todos los procesos químicos que ocurren dentro de un

microorganismo y se dividen en anabolismo y catabolismo ²

4.4. GENERALIDADES DE SUELO.

Desde un punto de vista funcional el suelo es considerado como la capa del planeta que provee el sustrato que hace posible la vida vegetal y animal. Las características biológicas del suelo varían según su localización y clima; además varían en profundidad, propiedades físicas, composición química y origen. ^{12, 15}

Hay cinco categorías principales de los constituyentes del suelo: partículas minerales, residuos orgánicos, agua, gases y sistema biológico.

Pocos ambientes tienen tan gran variedad de microorganismos como el suelo: es una mezcla microscópica formada por miles de millones de bacterias, hongos, algas, protozoos y virus en cada gramo, representando un obstáculo para calcular la población de una muestra de suelo.

Los métodos de cultivo solo revelan los tipos fisiológicos y nutritivamente compatibles con el ambiente del medio de cultivo.

Las cuentas microscópicas directas permiten teóricamente contar todos los microorganismos excepto los virus, pero esta técnica también tiene limitaciones, sobre todo para distinguir los microorganismos vivos de los muertos. Muchas veces el análisis biológico del suelo está relacionado con el aislamiento e identificación de un tipo fisiológico específico de un microorganismo.

La diferencia en la composición de los suelos y las diferentes características físicas, así como las prácticas agrícolas, producen también diferencias en la densidad de la población microbiana y en la clase de microorganismos que forman esta población. ¹⁵

Las condiciones que influyen en el desarrollo de los microorganismos en cultivos de laboratorio son aplicables al suelo ¹²

Con especial referencia al suelo dichas condiciones se resuelven como sigue:

- a) Cantidad y tipo de sustancias nutritivas.
- b) Humedad disponible.
- c) Grado de aireación.
- d) Temperatura
- e) pH.
- f) Prácticas y sucesos en los que contribuyen gran cantidad de microorganismos, como el riego y el abono de los suelos.

La población de bacterias del suelo sobrepasa a los demás grupos de microorganismos tanto en número como en variedad. Las cuentas directas han revelado que hay varios billones por gramo, y las realizadas en muestras sembradas en placa dieron solamente una fracción de las hechas por examen directo. La razón de esto es porque hay una gran variedad nutricional y fisiológica de los tipos de bacterias que se hallan en el suelo y que ninguna situación de cultivo por si sola puede proporcionar un medio y alimentos para soportar el desarrollo de todas las células viables de una muestra.

En el suelo se encuentran bacterias autótrofas, heterótrofas, mesófilas, termófilas y psicrófilas; aerobias y anaerobias; degradadoras de celulosa y oxidantes del azufre; fijadoras de nitrógeno y degradadoras de proteínas; y otros tipos. Ver la tabla 4. ²⁰

Tabla 4. Grupos fisiológicos de bacterias en varios tipos de suelos (Número de bacterias por gramo de suelo)

	TIPO DE SUELO				
	JARDÍN	CAMPO	PRADERA	BOSQUE DE CONÍFERAS	CIÉNAGA
Contenido de humedad en porcentaje de suelo húmedo	17.9	18.1	17.0	21.2	37.2
Porcentaje de carbonato de calcio	4.7	5.0	11.4	0	7.6
Bacterias desarrolladas en placas de gelatina nutritiva	8 400 000	8 100 000	8 100 000	1 500 000	1 500 000
Bacterias desarrolladas en placas de agar nutritivo	2 800 000	3 500 000	3 000 000	900 000	1 700 000
Bacterias desarrollándose en cultivos de glucosa-agar en anaerobios (picadura)	280 000	137 000	620 000	345 000	2 180 000
Bacterias metabolizadoras de urea	37 000	8 500	5 200	8 800	2 500
Bacterias desnitrificantes	830	400	850	380	370
Bacterias metabolizadoras de pectina	535 000	70 000	235 000	810 000	3 700
Bacterias anaerobias ácido butíricas	368 000	50 300	83 500	203 000	235 000
Bacterias anaerobias metabolizadoras de proteínas	35 000	22 000	36 800	17 000	2 000
Bacterias anaerobias metabolizadoras de celulosa	367	350	367	177	11
Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno	2 350	1 885	18	0	17
Bacterias anaerobias fijadoras de nitrógeno	5 500	700	370 000	2 020	67
Bacterias nitrificantes	880	1 701	37	0	34

FUENTE: Duggeli en S. A. Wakeman, *Principles of soil Microbiology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1932

4.4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO.

Para cada prueba de suelo se utilizan de 1 a 10 g. de tierra. El terreno debe dividirse en unidades de muestreo con base a la uniformidad de la pendiente, color, textura, administración de tratamiento de fertilizante y patrón de cultivo.

Para la toma de muestras debe escogerse el instrumento correcto de muestreo, el cual debe escogerse dependiendo de la naturaleza del suelo y de la facilidad para obtener el instrumento. Para un suelo blando y húmedo son muy satisfactorios el tubo muestreador de tierra de phowda, la paleta o llana. Para suelos más duros serían más convenientes un pico o una azuela²⁰.

Deben recogerse submuestras de por lo menos 10 lugares del terreno y colocarse en un balde limpio y seco, mezclándose las submuestras y tomándose una muestra de una libra (medio kg), si la muestra del suelo esta húmeda, debe secarse a la sombra antes de su envío a el laboratorio.^{15,20}

4.5. TAXONOMIA NUMERICA

La Taxonomía numérica, también conocida como TN, Taxonomía Adansoniana (en honor al botánico francés del siglo XVIII, Michael Adanson), Taxonomía computacional, análisis fenético numérico, Taxometría y Taxonometría la definen Sneath y Sokal (1973) como: "el agrupamiento en taxa mediante métodos numéricos de las unidades taxonómicas con base en las características de estas." Siguiendo los principios básicos de Adanson la taxonomía numérica requiere que se estudien el mayor número posible de aspectos "rasgos o caracteres" de la biología de los organismos (denominados unidades taxonómicas operacionales u OTU, por sus siglas en inglés). Una característica clave de los métodos de la Taxonomía numérica es que a priori, todos los caracteres tienen la misma importancia o peso en la construcción de las clasificaciones

Una vez que los taxa se definen, es posible asignar distinto valor relativo a los caracteres diferenciales útiles (a posteriori) para propósitos de identificación. Una premisa importante es que los taxa deben definirse con base en la similitud global y no crearse simplemente, como resultado de la intuición taxonómica

Esto significa que los taxa no se establecen solo por la presencia o ausencia de ciertos caracteres esenciales predeterminados entre grupos de OTU. De esta manera los caracteres individuales, como la presencia de colonias de color amarillo no son suficientes para justificar la inclusión de OTU en los taxa

4.5.1. ETAPAS DE LA TAXONOMIA NUMERICA.

Estas etapas incluyen la selección de la cepa y de la prueba, la codificación de los datos y su ingreso a la computadora, el análisis de datos y la interpretación de resultados.

4.5.1.1. MATRIZ EN TABLERO DE AJEDREZ.

Este es un sistema manual para la identificación y asignación de nombres a microorganismos. Este sistema consiste en un cuadro de identificación global, ideado por Farmer para ser usado en los CDC (Center of Disease Control). Con objeto de identificar todas las especies, biogrupos y grupos de microorganismos.

Los números en los cuadros que se intersectan representan el porcentaje de cepas que son positivas o reactivas *versus* las diversas especies bacterianas (listadas en las columnas horizontales) para cada característica (listadas en las columnas verticales). En general, una reacción se considera positiva si el 90 % o más de las cepas es reactivo, negativa si el 10 % o menos de las cepas no produce un resultado y variable si un 11-89 % de las reacciones es positivo. La capacidad para determinar las reacciones positivas y negativas para las diversas características evaluadas en este tipo de sistema de identificación da como resultado un alto grado de exactitud diagnóstica. La principal desventaja de la matriz en tablero de ajedrez es lo tedioso que resulta comparar punto por punto las diversas reacciones con aquellas obtenidas en los medios de prueba y elaborar los patrones que mejor encajan con un género, especie o biogrupo específico.

4.5.1.2. SELECCION DE LA CEPA.

En las series de OTU deben de incluir algunas cepas de identidad conocida, para efectos de comparación. Estas cepas de referencia sirven como marcadores y facilitan la identificación final de organismos desconocidos. Resulta útil incluir cuando menos dos cepas de referencia de cada especie, ya que esto reduce la posibilidad de cometer errores por contaminación o etiquetamiento equivocado, lo que anularía su valor comparativo. Con esta cuidadosa atención a los detalles los métodos de la Taxonomía numérica, se han utilizado con buenos resultados para examinar cultivos aislados representativos provenientes de una diversa gama de hábitats naturales, entre otros: suelo, superficies foliares y agua, y racionalizar grandes taxa heterogéneos, como el género *Streptomyces*. Mediante esta clase de estudios es posible estudiar las relaciones intra e intergenéricas

En la mayoría de estos casos se emplean cultivos identificados, y se recomienda que siempre que sea posible se usen cepas tipo *bona fide* de cada especie dentro del área donde se hace el estudio. Estos organismos de referencia es posible obtenerlos de colecciones de cultivos como la *American Type Culture Collection* (EE UU) o la *National Collection of Type Cultures* (Gran Bretaña)

Una vez seleccionado el organismo, es esencial confirmar su pureza. Ninguna clasificación resultará satisfactoria si se usan cultivos contaminados. La pureza de todos los cultivos se debe inspeccionar de manera regular durante el tiempo que dure el estudio. Para ello basta el examen de las características morfológicas de la colonia y los frotis con tinción de Gram

4.5.1.3. SELECCION DE CARACTERES.

Los caracteres deben ser estables para que permitan la obtención de clasificaciones naturales confiables. Las pruebas basadas en propiedades únicas se denominan caracteres unitarios, y por definición abarcan caracteres taxonómicos de dos o más estados que no pueden ser subdivididos de manera lógica, excepto por cambios en el método de codificación. Los caracteres unitarios varían en la cantidad de información genética que representan. La presencia de una endospora y la utilización de sacarosa son caracteres unitarios, pero el primero representa la participación de unos 50 operones mientras que el segundo solo la de uno

Con los conocimientos actuales de la Biología molecular microbiana, es imposible subdividir la esporulación en los caracteres constitutivos y, para fines prácticos se le considera como un carácter único o unitario.

En circunstancias ideales, el régimen de prueba debe incluir una colección al azar de todos los posibles caracteres que se puedan estudiar.

Una lista ideal incluiría datos de la colonia y de micromorfología, características de crecimiento, pruebas bioquímicas, efectos de agentes inhibidores potenciales, utilización de compuestos como la única fuente de carbono para energía y crecimiento, así como información genética, serológica, quimiotaxonómica y molecular.

Una precaución inteligente consiste en usar aproximadamente el mismo número de caracteres de cada una de las categorías antes mencionadas. Cuando se evalúan las pruebas que se van a incluir es prudente seleccionar aquellas que sean sencillas de bajo costo y rápidas ya que se realizará una gran cantidad de pruebas y los análisis químicos complicados y que requieren de mucho tiempo no serían los adecuados. Una lista ideal incluye los siguientes caracteres.

Tabla 5. Caracteres usados en la taxonomía numérica de bacterias.

Categoría de la prueba	Prueba
Morfología de la colonia	Presencia de pigmentos no difusibles o difusibles, fluorescentes, no fluorescentes o luminosos Tamaño y forma de la colonia (presencia de colonias en propagación).
Micromorfología	Tinción de Gram y reacciones de tinción ácido-resistentes Presencia de cocos, bacilos, micelios, vainas Tamaño celular Estructuras de fijación. Presencia de gránulos intracelulares Motilidad (flagelos polares peritricos, o deslizantes) Pruebas de dimorfismo o polimorfismo Presencia de esporas.
Características de crecimiento	Presencia de anillo o tónica, o crecimiento turbio o floculento en caldo de cultivo. Acrobiosis o anaerobiosis Crecimiento en 0 a 10% (p/v) de cloruro de sodio. Requerimientos especiales para el crecimiento por ejemplo: aminoácidos vitaminas o iones metálicos
Bioquímica	Metabolismo fermentador u oxidativo de la glucosa. Presencia de catalasas, oxidasas u otras enzimas Capacidad para degradar moléculas complejas, por ejemplo almidón y tributirina Producción de ácido a partir de carbohidratos Producción de indol y H ₂ S Prueba de rojo de metilo Reducción de nitratos Reacción de Voges-Proskauer
Pruebas de inhibición	Presencia o ausencia de crecimiento en presencia de antibióticos, colorantes y otros compuestos inhibidores; por ejemplo: cianuro de potasio..
Utilización de compuestos como la única fuente de carbono para energía y crecimiento	Presencia o ausencia de crecimiento en presencia de compuestos que contienen carbono; por ejemplo: alanina, fructosa y citrato de sodio
Serología	Presencia o ausencia de reacciones de aglutinación a antisueros específicos.
Quimiotaxonomía	Presencia o ausencia de componentes subcelulares, por ejemplo: ácidos micólicos y menaquinonas
Genética molecular	Presencia de relaciones guanina + citocina específicas (G-C) del DNA.
Fagotipificación	Presencia de patrones específicos de tipificación de bacteriófagos

Los procedimientos de inoculación, tiempos y temperaturas de incubación deben de ser los ideales. Cualquier condición especial requerida por una OTU debe aplicarse a todas las OTU en estudio. Es deseable que todos los medios se inoculen con una cantidad fija de células, de preferencia que se hallen en la fase logarítmica de crecimiento. Además, todas las cepas deben ser inoculadas a una misma temperatura (óptima) durante el mismo tiempo. Esto requiere tiempos de incubación suficientes para permitir el crecimiento del organismo más

lento Cuando sea posible se deben incluir cepas testigo en el estudio a fin de comprobar la sensibilidad del medio y de los reactivos así como sus reacciones.

4.5.2. CALCULO DE SIMILITUD.

Sólo pocos de los muchos métodos posibles para medir valores de similitud son de uso rutinario en bacteriología .Las fórmulas de algunos métodos potencialmente útiles, conocidos como coeficientes, se muestran en la tabla 6 .

Tabla 6 Algunos coeficientes con valor de discriminación útil para la microbiología		
Fuente Austin y Colwell, 1977		
Coeficiente	Abreviatura	Fórmula
Asociación simple	S_{SM}	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$
Jaccard	S_J	$\frac{a}{a+b+c}$
Dice	S_D	$\frac{2a}{2a+b+c}$
Hamann	S_N	$\frac{(a+d)-(b+c)}{a+b+c+d}$
Kulczynski	S_K	$\frac{1}{2}\left(\frac{a}{a+b}\right) + \left(\frac{a}{a+c}\right)$
Rogers y Tanimoto	S_{RT}	$\frac{a+d}{a+d+2(b+c)}$
Diferencia total	D_T	$\frac{b+c}{a+b+c+d}$
Innominado	S_{UNI}	$\frac{2(a+d)}{a+b+c+d}$

Estos coeficientes miden las relaciones entre pares de OTU , y se diseñaron pensando en diversas disciplinas; de la tabla 6. Se observa que estas fórmulas se basan en un grupo de símbolos: a, b, c y d Estos símbolos corresponden a la cantidad de apareamientos positivos(a)

y negativos (b), así como a la cantidad de resultados diferentes (b, c) entre un par de OTU.

Esta relación se representa en forma diagramática como sigue:

		Resultados para OTU 1	
		+	—
Resultados para OTU 2	+	a	b
	—	c	d

Uno de los coeficientes más ampliamente usado es el apareamiento simple (S_{AS}), el cual mide los apareamientos positivos (a) y negativos (d) como proporción del número total de caracteres

(a + b + c + d). Así, $S_{AS} = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)}$. La escala de valores con este coeficiente variará

entre "cero", para la diferencia total, a "uno" para la similitud total entre pares de OTU. Es decir que pueden existir valores entre cero y uno, lo cual significa que para valores cercanos a uno hay una similitud total entre la bacteria de comparación y la bacteria de referencia y por el contrario, para valores cercanos a cero significa que no hay similitud entre las bacterias que se están comparando.

Un segundo coeficiente de uso amplio es el coeficiente de Jaccard (S_j) el cual toma su nombre del estudio clásico de Jaccard de 1908. Este coeficiente descuenta los apareamientos negativos. Así,

$$S_j = \frac{a}{(a + b + c)}$$

El intervalo de valores también va de cero a la unidad y es directo para convertir los valores en porcentajes

5. MATERIAL

5.1. CRISTALERÍA

- Caja de portaobjetos
- Cajas de Petri Kimax de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura
- Frascos goteros de 30 ml vidrio color ámbar.(boro silicato)
- Matraz Erlenmeyer graduado (125, 250 y 500 ml.)
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Probetas (100 ml)
- Termómetro (-.10 a 200°C) Brann.
- Tubos de ensaye (13 x 100)
- Tubos de ensaye (18 x 150)
- Tubos de ensaye con tapón de baquelita

5.2. EQUIPO

EQUIPO	ESPECIFICACIÓN
Balanza analítica	marca Mettler
Balanza granataria	marca Ohaus
Baño maría	
Estufa	
Incubadora	marca Casa Ríos
Microscopio compuesto	marca Karl Zeiss
Microscopio de contraste de fases	marca Karl Zeiss
Olla express	marca Presto de 20 litros
Refrigerador	marca American

5.3. MATERIAL DIVERSO.

- Algodón.
- Asas bacteriológicas
- Bata Blanca
- Cubre bocas.
- Escobillones para tubos de ensaye y matraces
- Espátula de acero (3 pulgadas de largo)
- Gasa.
- Gradilla de alambre
- Guantes de asbesto
- Hisopos estériles
- Lápiz graso.
- Marcadores
- Masking tape de 2 cm de ancho
- Mechero de Bunsen
- Mechero Fisher.
- Papel cera film
- Papel seda.
- Pizetas de 200 ml. de capacidad
- Tela de alambre con centro de asbesto.
- Triángulo de porcelana.
- Tripie

5.4. MATERIAL BIOLÓGICO

Muestra de suelo agrícola obtenida del Estado de Veracruz.

MEDIOS DE CULTIVO

Agar de soya tripticaseína.

ESPECIFICACIONES DE BIOXON

Cuidados: altamente higroscópico
Reg. No. 0099R83SSA. Lote:
06B10871. Fecha de caducidad:
01/02/01

Caldo de soya tripticaseína

Cuidados: altamente higroscópico.
Reg. No. 0114R83SS. Lote: 12011162.
Fecha de caducidad: 01/abr/01

5.5. MEDIOS DE IDENTIFICACIÓN.

Agar de almidón,
Agar fenil-alanina
Agar LIA
Agar urea de Christensen.
Caldo arabinosa + rojo de fenol (RF)
Caldo glucosado + rojo de fenol (RF).
Caldo lactosado + rojo de fenol (RF).
Caldo para nitratos.
Caldo trehalosa + rojo de fenol (RF)
Caldo xilosa + rojo de fenol (RF)
Citrato de Koser o de Simmons.
Gelatina nutritiva
Medio agar sulfuro indol motilidad (SIM).
Rojo de metilo Voges-Proskauer (RE-VP)

5.6. REACTIVOS.

- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Alcohol-acetona.
- Alfa-naftol
- Cristal violeta.
- Hidróxido de potasio al 40 %.
- Peróxido de hidrógeno
- Reactivo de Ehrlich.
- Safranina.
- Solución salina al 0.9 isotónica estéril.

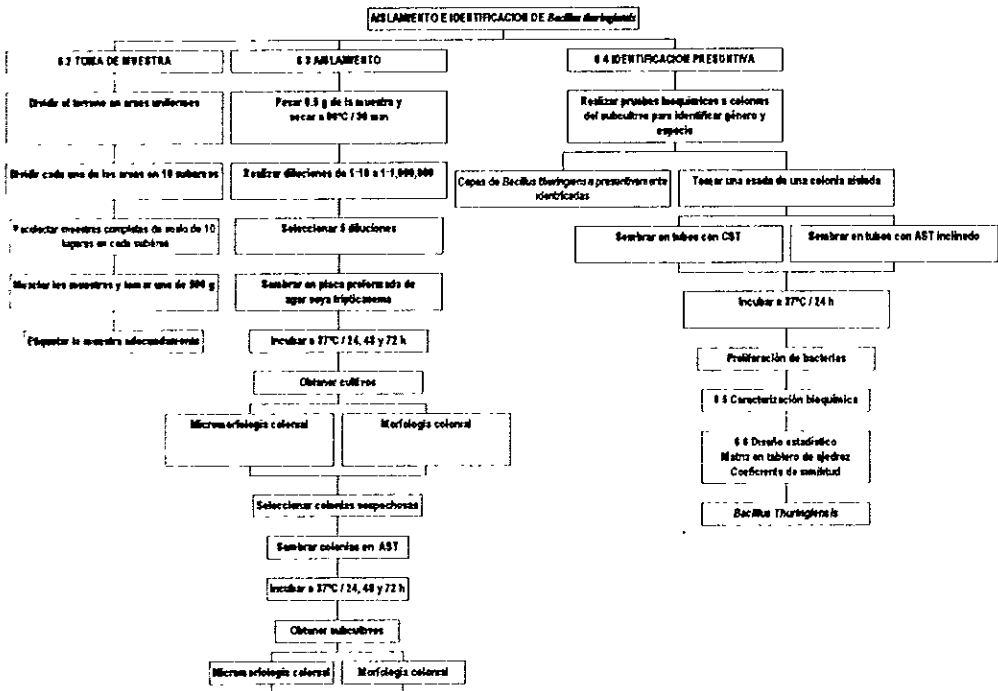
5.7. CEPAS

Cepas de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" (Laboratorio de Producción del Campus I) UNAM, que se utilizarán como control:

- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus cereus*

6. METODO

6.1. DIAGRAMA DE FLUJO

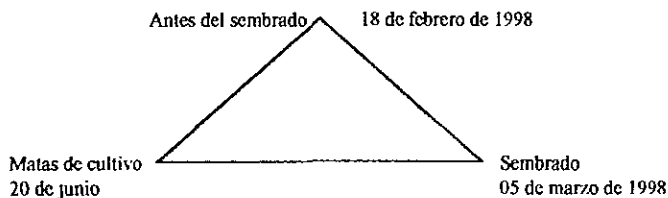


AST - Agar soya tripticaseína, CST - Caldo soya tripticaseína, * : Pruebas bioquímicas seleccionadas de los datos reportados en el Bergey's Manual of *cf*, ** Pruebas bioquímicas seleccionadas y sugeridas para la identificación de *Bacillus thuringiensis*

6.2. TOMA DE MUESTRA.

El terreno muestreado tiene las siguientes características; es una parcela cuya superficie es de tres hectáreas, uniforme , plano y sin adición de fertilizantes.

Las muestras se recolectan de la siguiente manera: a) Se divide el terreno (para efecto de tomar las muestras representativas), en 20 áreas o lugares que se identifican con un número de área o lugar, cada área a su vez se subdivide en 10.lugares. b) Se procede a tomar una muestra, de cada subdivisión con la ayuda de un cucharón plástico y un azadón (en cada lugar tomar un núcleo uniforme de la superficie a profundidad de arado, seis pulgadas); c) Se pesa cada una de las muestra en una báscula (peso de cada muestra es de 250 gramos d) Traspasar cada una de ellas a una bolsa seca y limpia, etiquetado cuidadosamente cada una de las 10 submuestras, destacando lugar y número de muestra. Una vez terminado el muestreo de cada una de las áreas e) Las muestras son trasvasadas a una tina , donde se mezclaran perfectamente. f) Se procede a tomar y pesar adecuadamente una muestra 500 gramos en una bolsa limpia y seca, (si la muestra del suelo esta húmeda debe secarse a la sombra antes de colocarla en la bolsa, utilícase papel, tela o tabla de madera para extender la tierra para que se seque). g) Etiquetar con los siguientes datos cantidad de muestra fecha de toma de muestra y presencia o ausencia de cultivo. Este procedimiento se realiza tres veces: 1) antes del sembrado de maíz y frijol, 2) una vez que se ha sembrado y 3) cuando están presentes las matas de cultivo. Nota: Evitar la contaminación manteniendo las muestras de tierra alejadas de fertilizante almacenado o lejos de sacos de fertilizante usados.²⁶



6.3. AISLAMIENTO

1. Pesar 0.5 g de muestra de suelo agrícola (obtenida antes del sembrado de maíz y frijol, una vez que se ha sembrado y cuando están presentes los cultivos).
2. Marcar una serie de tubos del 1 al 10. de 16 x 100 mm estériles.
3. Adicionar a cada tubo 4.5 ml. de solución salina al 0.9 % estéril en condiciones de esterilidad.
4. Agregar al primer tubo 0.5 g. de muestra de suelo, homogeneizar la suspensión.
5. Efectuar diluciones decimales de cada muestra, como se indica en la tabla 1.

ESQUEMA DE DILUCIONES SERIADAS		
TUBO No	SOL. SALINA (0.9 %)	DILUCION
1) 0.5 g Muestra	4.5 ml	
2) 0.5 ml del tubo 1	4.5 ml	10^{-1}
3) 0.5 ml del tubo 2	4.5 ml	10^{-2}
4) 0.5 ml del tubo 3	4.5 ml	10^{-3}
5) 0.5 ml del tubo 4	4.5 ml	10^{-4}
6) 0.5 ml del tubo 5	4.5 ml	10^{-5}
7) 0.5 ml del tubo 6	4.5 ml	10^{-6}
8) 0.5 ml del tubo 7	4.5 ml	10^{-7}
9) 0.5 ml del tubo 8	4.5 ml	10^{-8}
10) 0.5 ml del tubo 9	4.5 ml	10^{-9}

6. Al efectuar cada dilución , cambiar de pipeta.
7. Seleccionar seis diluciones.
8. Se preparan seis cajas de petri, con una oblea de agar preformada (agar soya tripticaseína) y se marcan o identifican con la dilución respectiva de la muestra.
9. Se vierte en cada una de las cajas 1 ml de cada una de las diluciones seleccionadas de la muestra, se mezcla perfectamente y se agrega una segunda capa muy delgada del agar.

- 10 Después de solidificar, se incuba a 37° C por 48 horas.
- 11 Realizar observaciones de morfología colonial y micromorfología.
- 12 Se procede a el aislamiento de cada una de las colonias sospechosas de ser *Bacillus* Gram (+) esporulados.
13. De cada una de las muestras se procede a realizar la resiembra de las colonias elegidas sospechosas en un medio de cultivo de agar soya tripticaseína por el método de la estría cruzada para obtener cultivos aislados de colonias sospechosas Ver anexo 3

6.4. IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA.

Para la identificación presuntiva de *Bacillus thuringiensis* se siguen tres pasos

- ◆ Morfología colonial.
- ◆ Micromorfología.
- ◆ Pruebas bioquímicas.

De las colonias aisladas se observa su morfología colonial y morfología microscópica (tinción de Gram y tinción de Shaeffer y Fulton).

6.4.1. Morfología colonial.

Los microorganismos que crecen sobre superficies sólidas tienden a formar agrupaciones que se denominan colonias las cuales suelen ser de características constantes para el medio de cultivo usado, la temperatura de incubación y el microorganismo de que se trate en este caso describiremos a *Bacillus thuringiensis*

Una colonia microbiana está constituida por individuos de la misma especie provenientes de

una célula o de un grupo de ellas, llamadas unidad formadora de colonias (UFC).

Observar las colonias en las placas de agar soya tripticaseína las siguientes características

- ◆ Tamaño.
- ◆ Forma
- ◆ Superficie
- ◆ Borde
- ◆ Luz transmitida.
- ◆ Producción de pigmento
- ◆ Color
- ◆ Elevación.
- ◆ Aspecto
- ◆ Luz reflejada
- ◆ Consistencia

6.4.2. Micromorfología.

La presencia de ciertas estructuras y su respuesta a la tinción ayudan a la identificación y clasificación de los microorganismos

6.4.2.1. Tinción de Gram.

- a) Hacer un frotis de cada una de las cepas aisladas
- b) Fijar los frotis al calor
- c) Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto, escurrir el colorante y lavar con agua.
- d) Cubrir el frotis con solución de lugol y dejarlo actuar durante un minuto, escurrir y lavar con agua.
- e) Decolorar con alcohol-cetona, de 5 a 15 segundos y lavar con agua.
- f) Cubrir el frotis con Safranina y dejarla actuar durante un minuto.

Se prepararan 33 tubos de cada medio para cada cepa aislada y cepas control. Ver la siguiente tabla

Tabla No7 Pruebas bioquímicas.					
ME-DIO DL. CULTIVO	INOCULACION	TEMP DE INCUB	TIEMPO DE INCUB.	TIEMPO DE LECTURA	PRUEBAS BIOQUIMICAS
AGAR INCLINADO	PICADURA Y ESTRIA	35 A 37°C	18 A24 hrs.	24 A 72 hrs	UREA CHRISTENSEN
		35 A 37°C	24 A 48 hrs	24 A 48 hrs	CITRATO DE SIMMONS
		35 A 37°C	18 A24 hrs	24 hrs	LIA
		35 A 37°C	18 A24 hrs	18 A24 hrs	FENILALANINA
AGAR SEMISOLIDO	PICADURA	35 A 37°C	18 A24 hrs	24 hrs	SIM
		35 A 37°C	18 A24 hrs	24 hrs	HIDRÓLISIS DE ALMIDON
		35 A 37°C	18 A24 hrs	24 hrs	HIDRÓLISIS DE GELATINA
CATINOS	AGITACION	35 A 37°C	24 hrs	24 hrs	ROJO DE METILO
		35 °C	24 hrs	24 hrs	VOGES PROSKAUER
		35 °C	18 A24 hrs	24 hrs hrs	NITRATOS
		35 °C	24 hrs	24 hrs	MANTOL
		35 °C	24 hrs	24 hrs	ARABINOSA + RF
		35 °C	24 hrs	24 hrs	GLUCOSA + RF
		35 °C	24 hrs	24 hrs	XYLOSA + RF
		35 °C	24 hrs	24 hrs	LACTOSA + RF
		35 °C	24 hrs	24 hrs	SALICINA

Los resultados de las pruebas bioquímicas se leen como habitualmente se hace para las pruebas que se leen directamente (Urea, Citratos, LIA, Carbohidratos + Rojo de Fenol). Para las pruebas en las que es necesano adicionar uno o más reactivos para su lectura, se cubren los tubos con sus respectivos reactivos (SIM, Rojo de Metilo, Voges Proskauer,

Nitratos, Almidón, Hidrólisis de gelatina y Fenilalanina).

Debido a la gran cantidad de pruebas a realizar, se hace proliferación de las cepas a caracterizar, generando cultivos en caldo soya tripticaseína, con una alta concentración de bacterias, colocando una asada abundante de microorganismos en 20 ml por cada uno de cuatro tubos para cada una de las cepas obtenidas e incubar a 37°C por 24 hrs

- Inocular las pruebas bioquímicas en caldo con un inóculo de 0.2 ml de cultivo de las anteriores proliferaciones e incubar a 37°C.

Para las pruebas bioquímicas sólidas y semisólidas se realizan cuatro resiembras por cada una de las cepas obtenidas, en agar inclinado de soya tripticaseína. Incubar a 37°C por 24 hrs

- Inocular las pruebas bioquímicas sólidas y semisólidas ya sea por picadura o picadura y estría según sea el caso. Incubar a 37°C.

Los resultados se leerán a las 18, 24, 48 y 72 horas de incubación, para las pruebas que así lo requieran.

7. RESULTADOS

7.1. TOMA DE MUESTRA

Se obtienen tres tipos de muestra de suelo agrícola donde se cultiva maíz y frijol, según el sistema de cultivo tradicional.

Ver la siguiente tabla

Toma de muestra.	Nº de muestra	CANTIDAD	FECHA
Antes del cultivo	1	500 g	18 DE FEBRERO 1998
Durante el cultivo	2	500 g	05 DE MARZO DE 1998
Posterior a la cosecha del cultivo	3	500 g	20 DE JUNIO DE 1998.

Lugar: Villaldama, Veracruz

7.2. AISLAMIENTO

Todas las muestras fueron tratadas con la misma metodología para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* y se obtuvieron los siguientes resultados. En los cultivos primarios de cada una de las muestras de tierra agrícola, después de un tiempo de incubación de 24, 36 y 48 horas a 37°C se observan las siguientes características

Muestra 1 de tierra agrícola recolectada antes del cultivo de maíz y frijol (18 de febrero de 1998). Se observó crecimiento de una gran diversidad de colonias diferentes en cuanto a tamaño, forma y pigmentación, sin embargo se eligió una de las diluciones (1×10^{-4}) por presentar colonias notablemente aisladas y con características de morfología colonial reportadas en la bibliografía y que además presentan morfología microscópica bacilar.

Muestra 2 - Recolectada durante la siembra de maíz y frijol (05 de marzo de 1998). Se observó crecimiento de colonias en las diluciones 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} , eligiéndose la dilución 1×10^{-5} por presentar colonias sospechosas notablemente aisladas .

Muestra 3.- Recolectada durante la presencia de las matas del cultivo de maíz y frijol (20 de junio 1998. Se observa que en esta tercera muestra se obtuvieron colonias sospechosas en las siguientes diluciones 1×10^{-3} , 1×10^{-4} y 1×10^{-5} . Eligiéndose la dilución 1×10^{-3} por presentar cuatro colonias definidas y aisladas

Todas las colonias elegidas de los cultivos de cada una de las muestras de tierra agrícola cumplen con las características tanto de morfología colonial como de micromorfología para *Bacillus* Gram positivos. Cabe señalar que para la obtención de las cepas se realizaron cuando menos seis por tres cultivos, obteniéndose 18 primo aislamientos con sus respectivas diluciones

De cada una de las colonias sospechosas obtenidas del cultivo de las diluciones elegidas se realizaron resiembras en cajas petri con agar soya tripticaseína obteniendo los siguientes resultados.

Ver la tabla 8 para morfología colonial.

TABLA 8 Morfología Colonial de Cepas Aisladas			
	Cepa I	Cepa II	Cepa III
Tamaño	5 mm	4.5 mm	6 mm
Color	Blancas	Blancas	Blancas
Forma	Circular	Circular	Circular
Bordes	Irregulares	Irregulares	Irregulares
Elevación	Planas (ligera elevación)	Planas	Planas
Superficie	Rugosa (esmeriladas)	Rugosa (esmeriladas)	Rugosa (esmeriladas)
Aspecto	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Luz reflejada	Brillantes	Brillantes	Brillantes
Luz transmitida	Opacos	Opacos	Opacos
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Pigmentación	No tiene	No tiene	No tiene

Así mismo para cada colonia elegida de las resiembras se determinó la morfología microscópica obteniendo los siguientes resultados Ver a continuación la tabla 9.

TABLA 9 Morfología microscópica de cepas aisladas			
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
Tinción Gram	<i>Bacillus</i> Gram (+) En pares, también presenta cadenas semilargas. Se observan abombados	<i>Bacillus</i> Gram (+) En pares, también presenta cadenas semilargas Se observan abombados.	<i>Bacillus</i> Gram (+) En pares, también presenta cadenas semilargas. Se observan abombados.
Tinción Shaeffer y Fulton	Se observa espora en color verde - Espora terminales que dan la impresión de formar bastones --Esporas subterminales --También se observan huecos claros junto a la espora de forma semiamorfa	Centrales subterminales. Se observan huecos claros junto a la espora de forma semiamorfa	Terminales centrales Se observan huecos claros junto a la espora de forma semiamorfa

Las colonias de las cepas control (*Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*) presentan las siguientes características son colonias con centro abombado, dando la impresión de ser huevos estrellados, cremosas aunque con el tiempo se toman secas y muy rugosas, sus bordes se muestran en proyecciones continuas sin formar cúmulos que se forman en el cultivo de cepas sospechosas En la morfología microscópica las cepas control presentan las siguientes características. se observan bacilos Gram positivos formando cadenas cortas, presentan esporas subterminales.

7.3. IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA:

Para la identificación bioquímica fueron elegidas colonias del aislamiento secundario por cumplir en un 80 % con las características de morfología colonial y morfología microscópica de *Bacillus thuringiensis*, las cuales fueron resemebradas en agar inclinado (AST) para su purificación y posteriormente sometidas a una batería de pruebas bioquímicas, seleccionadas del Bergey's Manual, para *Bacillus thuringiensis* obteniéndose los siguientes resultados. Ver la tabla 10.

TABLA 10						
	<i>Bacillus thuringiensis</i> *	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Cepa I	Cepa II	Cepa III
ROJO DE METILO	+	+	-	+	+	+
Voges PROSKAUER.	-	+	-	-	-	-
CALDO NITRATO	+	-	+	+	+	+
ARABINOSA + RF	-	-	-	-	-	-
GLUCOSA + RF	+	+	+	+	+	+
SALICINA	+	+	+	+	+	+
XYLOSA + RF	-	+	+	+	+	+
MANTIOLO	-	-	-	-	-	-
LACTOSA + RF	-	-	-	-	-	-
LIA {	LISINA DFCARBOXILASA	-	-	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-	-	-
SIM {	INIXOL	-	+	+	-	-
	MOTILIDAD H ₂ S	+	-	-	+	+
		-	-	-	-	-
FNILALANINA	-	-	-	-	-	-
CITRATO SIMMONS	+	-	-	+	+	+
UREA CHRISTENSEN	+	-	-	+	+	+
HIDRÓLISIS GELATINA	+	-	-	+	+	+
HIDRÓLISIS ALMIDÓN	+	-	-	+	+	+
CATALASA	+	+	+	+	+	+
CRECIMIENTO A 30°C	+	-	-	+	+	+
CRECIMIENTO A 42°C	+	-	-	+	+	+

* MURRAY R., Brenner D., HOLT J., Krieg N., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 12th Ed United States of America. Williams & Wilkins, 1989.

Nota Para el control de los resultados se emplearon cepas control conocidas en género y especie (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) proporcionadas por el cepario del Campus I de la FES Zaragoza, UNAM. Así como los resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas a identificar, fueron cotejados y comparados con los que se reportan para *Bacillus thuringiensis* en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (op cit.).

7.4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA.

De las cepas identificadas presuntivamente como *Bacillus thuringiensis* se realizaron proliferaciones de cada una de ellas, tanto en caldo soya tripticaseína, como en agar inclinado (agar soya tripticaseína). Una vez que se obtuvieron las proliferaciones, las cepas fueron sometidas a las mismas pruebas bioquímicas utilizadas para su identificación presuntiva, en un rango de 33 ensayos para cada una de las pruebas bioquímicas.

Con los resultados obtenidos, se elabora una matriz en tablero de ajedrez para obtener la conclusión de los resultados basados en los porcentajes obtenidos de los 33 ensayos para cada una de las pruebas. Ver la tabla 11.

PRUEBAS BIOQUIMICAS	TABLA II						
	CEPAS AISLADAS			CONCLUSION			
	CEPA I	CEPA II	CEPA III	CEPA I	CEPA II	CEPA III	
ROJO DE METILO	0 90	1 00	1 00	+	+	+	
Voges PROSKAUER	0	0	0 6	-	-	-	
CÁLIDO NITRATO	0 94	1 00	0 99	+	+	+	
ARABINOSA + RF	0	0	0	-	-	-	
GLUCOSA + RF	1 00	1 00	1 00	+	+	+	
SALICINA	0 94	1 00	0 97	+	+	+	
XYLOSA + RF	1 00	0 94	0 94	+	+	+	
MANTOL	0	0	0	-	-	-	
LACTOSA + RF	0	0 6	0 6	-	-	-	
LIA {	LISINA DE CARBOXILASA	0	0	0	-	-	-
	H ₂ S	0	0	0	-	-	-
SIM {	INDOL	0	0	0	-	-	-
	MOTILIDAD	1 00	0 99	0 97	+	+	+
	H ₂ S	0	0	0	-	-	-
FENILALANINA	0	0	0	-	-	-	
CITRATO SIMMONS	0 97	0 99	1 00	+	+	+	
UREA CHRISTENSEN	0 97	1 00	0 97	+	+	+	
HIDRÓLISIS GELATINA	1 00	0 94	0 94	+	+	+	
HIDRÓLISIS ALMIDÓN	0 94	0 97	0 97	+	+	+	
CATALAZA	0 97	0 94	1 00	+	+	+	
CRECIMIENTO A 30°	0 94	1 00	0 97	+	+	+	
CRECIMIENTO A 42°	0 97	1 00	0 97	+	+	+	

Los números indican el porcentaje de positividad para cada prueba, de 33 repeticiones realizadas para cada prueba bioquímica y para cada cepa probada. La prueba se considera (+) si da más del 90 % y negativa (-) si da de 10 % o menos.

7.5. DISEÑO ESTADÍSTICO

MÉTODO DE SIMILITUD BACTERIANA: . Austin y Colwell. 1977.

Se aplicó el método de Austin y Colwell quienes sugieren los estudios de taxonomía numérica para medir valores de similitud bacteriana. Los métodos potencialmente útiles son los conocidos como coeficientes de valor discriminatorio siendo los siguientes los que se eligieron para determinar los valores de similitud bacteriana de las cepas caracterizadas.

Coeficiente	Abreviatura	Fórmula
Asociación simple.	S_{sm}	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$
Jaccard	S_j	$\frac{a}{a+b+c}$
Dice	S_D	$\frac{2a}{2a+b+c}$

Los siguientes coeficientes miden las relaciones entre pares de OTU, observándose que estas fórmulas se basan en un grupo de símbolos: a, b, c y d.

	Resultado para OTU ₁ (Tablas del Bergey's Manual para Bt)	
Resultados OTU ₂ (ensayos probados para la cepa aislada)	+	-
+	a	b
-	c	d

donde

a = es el número de casos verdaderos positivos.

b = es el número de casos falsos positivos.

c = es el número de casos falsos negativos.

d = es el número de casos verdaderos negativos

7.5.1 CALCULO DE SIMILITUD BACTERIANA.

Para calcular numéricamente el rango de similitud de las cepas aisladas con la de referencia bibliográfica y validar que las cepas aisladas son de *Bacillus thuringiensis* se obtiene el "Par OTU", formado por el OTU1 y OTU2. El OTU1 se obtiene de los resultados reportados en la referencia bibliográfica: *Bergeys Manual of Systematic bacteriology* y el OTU2 se obtiene de los resultados de 33 ensayos realizados a cada una de las cepas.

Para la cepa I:

ASOCIACION DE LA CEPA I		
PRUEBA BIOQUÍMICA.	<i>Bacillus thuringiensis</i> *	CEPA I
ROJO DE METILO	+	+
VOGES PROSKAUER.	-	-
CALDO NITRATO	+	+
ARABINOSA + RF	-	-
GLUCOSA +RF	+	+
SALICINA	+	+
XYLOSA + RF	-	+
MANITOL	-	-
LACTOSA + RF	-	-
LIA	LISINA DECARBOXILASA	-
	H ₂ S	-
SIM	INDOL	-
	MOTILIDAD	+
	H ₂ S	-
FENILALANINA	-	-
CITRATO SIMMONS	+	+
ÚREA CHRISTENSEN.	+	+
HIDRÓLISIS GELATINA	+	+
HIDRÓLISIS ALMIDÓN	+	+
CATALAZA	+	+
CRECIMIENTO A 42°	+	+
CRECIMIENTO A 30°	+	+

* Datos de pruebas bioquímicas de *Bacillus thuringiensis* reportados por el *Bergeys Manual of Systematic bacteriology op. cit.*

valores de las constantes :

$$a = 12, b = 1, c = 0, d = 9$$

Coefficiente	Abreviatura	Indice de similitud.
Asociación simple.	S_{sm}	$\frac{12+9}{12+1+0+9} = 0.95$
Jaccard	S_j	$\frac{12}{12+1+0} = 0.93$
Dice	S_D	$\frac{2(12)}{2(12)+1+0} = 0.96$
Diferencia total	D_T	$\frac{1+0}{12+1+0+9} = 0.045$

Para la cepa II

ASOCIACION DE LA CEPA II		
PRUEBAS BIOQUÍMICAS.	<i>Bacillus thuringiensis</i> *	CEPA II
ROJO DE METILO	+	+
VOGES PROSKAUER	-	-
CALDO NITRATO	+	+
ARABINOSA + RF	-	-
GLUCOSA + RF	+	+
SALICINA	+	+
XYLOSA + RF	-	+
MANITOL	-	-
LACTOSA + RF	-	-
LIA { LISINA DECARBOXILASA	-	-
{ H ₂ S	-	-
SIM { INDOL	-	-
{ MOTILIDAD	+	+
{ H ₂ S	-	-
FENILALANINA	-	-
CITRATO SIMMONS	+	+
UREA CHRISTENSEN	+	+
HIDRÓLISIS GELATINA	+	+
HIDRÓLISIS ALMIDÓN	+	+
CATALAZA	+	+
CRECIMIENTO A 42°	+	+
CRECIMIENTO A 30°	+	+

* Datos de pruebas bioquímicas de *Bacillus thuringiensis* reportados por el *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*

valores de las constantes :

$$a = 12, b = 1, c = 0, d = 9$$

Coefficiente	Abreviatura	Indice de similitud.
Asociación simple	S_{sm}	$\frac{12+9}{12+1+0+9} = 0.95$
Jaccard	S_j	$\frac{12}{12+1+0} = 0.93$
Dice	S_D	$\frac{2(12)}{2(12)+1+0} = 0.96$
Diferencia total	D_T	$\frac{1+0}{12+1+0+9} = 0.045$

Para la cepa III:

ASOCIACION DE LA CEPA III		
PRUEBAS BIOQUÍMICAS.	<i>Bacillus thuringiensis</i> *	CEPA III
ROJO DE METILO	+	+
VOGES PROSKAUER	-	-
CALDO NITRATO	+	-
ARABINOSA + RF	-	-
GLUCOSA + RF	+	+
SALICINA	+	+
XYLOSA + RF	-	+
MANTOL	-	-
LACTOSA + RF	-	-
LIA	LISINA DECARBOXILASA	-
	H ₂ S	-
SIM	INDOL	-
	MOTILIDAD	+
	H ₂ S	-
FENILALANINA	-	-
CITRATO SIMMONS	+	+
UREA CHRISTENSEN	+	+
HIDRÓLISIS GELATINA	+	+
HIDRÓLISIS ALMIDÓN	+	+
CATALAZA	+	+
CRECIMIENTO A 42°	+	+
CRECIMIENTO A 30°	+	+

* Datos de pruebas bioquímicas de *Bacillus thuringiensis* reportados por el *Bergeys Manual of Systematic bacteriology*.

valores de las constantes :

$$a = 12, b = 1, c = 0, d = 9$$

Coficiente	Abreviatura	Indice de similitud.
Asociación simple	S_{sm}	$\frac{12+9}{12+1+0+9} = 0.95$
Jaccard	S_j	$\frac{12}{12+1+0} = 0.93$
Dice	S_D	$\frac{2(12)}{2(12)+1+0} = 0.96$
Diferencia total	D_t	$\frac{1+0}{12+1+0+9} = 0.045$

8. DISCUSION DE RESULTADOS

8.1. Toma de muestra.

Para la toma de muestra se consideró primero el tipo de suelo, el cual tiene pocas irregularidades lo que facilitó el procedimiento, segundo el sistema de cultivo el cual es de tipo temporal, tercero, la profundidad de toma de muestra fue suficiente siendo esta a profundidad de arado (8 pulgadas) y cuarto el proceso de toma de muestra se llevó a cabo tres veces en fechas diferentes que corresponden a antes del sembrado, durante el cultivo y después de la cosecha. El hacer la toma de muestra en estas fechas no tuvo mayor impacto en el trabajo ya que no hubo diferencias en las muestras. Todos estos pasos resultaron en un procedimiento que garantiza obtener cantidades adecuadas de muestras para la siguiente fase del trabajo.

8.2. Aislamiento.

El criterio empleado para trabajar con las diluciones 3, 4 y 5 para la obtención de *Bacillus thuringiensis* de tierra agrícola, básicamente fue la cantidad de colonias obtenidas por cultivo. Si bien el hábitat natural del *Bacillus thuringiensis* es el suelo por lo que se esperaba que el número de colonias sospechosas de ser *Bacillus thuringiensis* fueran abundantes, sin embargo en las muestras trabajadas de tierra agrícola se observó que aún en el cultivo de la primera dilución, la presencia de colonias sospechosas de ser *Bacillus thuringiensis* son escasas en comparación con otras que no cumplen con estas características. Se optó trabajar con estas diluciones porque se observaron colonias notablemente aisladas y con las características descritas en la bibliografía para *Bacillus thuringiensis*.

Para la identificación se utilizó un subcultivo, esto es se hizo una resiembra del cultivo en agar soya tripticaseína para efectos de tener un cultivo puro y definir mejor las características de morfología colonial y morfología microscópica. En este paso del trabajo se observó que si bien *Bacillus thuringiensis* tiene cierto parecido de morfología colonial y morfología microscópica con las cepas control (*Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*) también se pueden apreciar marcadas diferencias: como la aparición de cúmulos sobre las colonias después de 72 horas los cuales solo aparecen sobre las colonias sospechosas de ser *Bacillus thuringiensis* pero no en las cepas control y esto se explica porque las células bacterianas de *Bacillus thuringiensis* sufren una lisis celular liberando el complejo espora-cristal al medio de cultivo. En cuanto a la morfología microscópica podemos notar que los bacilos de las cepas control son diferentes, esto es debido a la presencia del cuerpo paraesporal y a grandes huecos claros (cristales) que hacen que el *Bacillus thuringiensis* se vea ensanchado o más ancho que las susodichas cepa control

8.3. Identificación presuntiva.

Para la identificación presuntiva se realizó un cultivo secundario por el método de la estría cruzada para asegurar la pureza de las colonias elegidas como sospechosas de ser *Bacillus thuringiensis*. Los resultados que arrojan estas pruebas fueron muy interesantes ya que se comparan con pruebas realizadas a las cepas control (*Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*) y se cotejan con datos de pruebas bioquímicas de referencia para *Bacillus thuringiensis* tomados del *Manual Bergey's* ⁴.

En la comparación que se hace con los resultados de cepas control contra las cepas sospechosas se encontró que hay diferencias en algunas pruebas como la Urea, citrato de

Simmons e Indol). Esto se debe a que existen diferencias en su comportamiento fisiológico que las discrimina de las cepas sospechosas. Sin embargo al cotejar resultados de las cepas sospechosas con los datos de referencia para *Bacillus thuringiensis* tomados del *Manual Bergey's* ⁴ notamos que solo hay una diferencia notable que es la prueba de Xilosa reportada como negativa para *Bacillus thuringiensis* y la obtenida por las cepas resultó ser positiva. Sin embargo todas las demás pruebas presentan semejanzas con las reportadas por el *Manual Bergey's* ⁴ para *Bacillus thuringiensis*. Esto nos permite asegurar que las cepas aisladas son *Bacillus thuringiensis* y que por lo que se observa con los resultados de las cepas control si existen ciertas diferencias en cuanto a su comportamiento fisiológico.

8.4. Caracterización bioquímica.

En los resultados obtenidos de 33 ensayos para cada una de las cepas por 22 pruebas, se observa que si bien existe similitud de comportamiento fisiológico con las características bioquímicas reportadas en el *Manual Bergey's* ⁴ para *Bacillus thuringiensis*, algunas pruebas fueron positivas tardías como en el caso de la Urea, en la cual tenemos que de 33 ensayos cuando menos se tienen 4 pruebas negativas a las 48 horas y positivas a las 72 horas; en cuanto a la prueba de Citrato de Simmons se presenció abundantemente crecimiento pero un vire tardío en el indicador a las 72 horas.

Otra de las pruebas que manifestó un comportamiento totalmente diferente fue la de la Xilosa, la cual de los 33 ensayos para las 3 cepas obtenidas fue positiva, en tanto que la reportada en los datos de referencia es negativa.

Se realizaron 22 pruebas con 33 ensayos cada una para cada una de las cepas obtenidas.

De los resultados arrojados se calculan los índices de similitud los cuales fluctúan entre 0.92 para el índice de Jaccard. 0.95 para el índice de asociación simple, 0.96 para el índice de asociación de Dice y 0.045 para el índice de Diferencia total y siguiendo la escala de valores de los coeficientes, se observó que los tres primeros índices están más cercanos a uno y por lo cual se afirma que las cepas aisladas son realmente *Bacillus thuringiensis*, en cuanto al último valor obtenido por el índice de diferencia total, entre más bajo sea el valor existe similitud total de acuerdo a lo estipulado en el método de similitud bacteriana de Austin y Colwell

Por lo cual se afirma que lo que se obtuvo fueron cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, aisladas y caracterizadas de muestras de tierra agrícola del Municipio de Villaldama en el Estado de Veracruz donde se siembra exclusivamente maíz y frijol.

9. CONCLUSIONES

Mediante técnicas sencillas de aislamiento, como lo es el método de las diluciones en placa vaciada fue posible aislar *Bacillus thuringiensis* de hábitat natural, que es el suelo, utilizando agar soya tripticaseína como medio de cultivo. Asimismo se pudo hacer su identificación empleando técnicas básicas como morfología colonial, morfología microscópica y una identificación preliminar basada en características metabólicas. Finalmente se logró identificar plenamente mediante la caracterización bioquímica.

Durante el desarrollo del proyecto no se utilizó cepa de referencia de *Bacillus thuringiensis* porque esta clase de cepas son altamente costosas, actualmente se cotizan en varios miles de dólares, hace cinco años el costo cotizado era de \$ 5,000.00 dólares por vial. Cabe señalar que en el País se encuentran este tipo de cepas, que son de importación, únicamente en algunos centros de investigación biotecnológica siendo su uso exclusivo para los mismos. De ahí la importancia de trabajar con cepas nativas las cuales después de aislarse y caracterizarse se pueden tipificar y de esta manera tener cepas nativas de referencia que puedan estar disponibles para apoyar posteriores investigaciones que se lleven a cabo sobre *Bacillus thuringiensis* en nuestro país.

10. CITAS

- 1 AGRO-SÍNTESIS Bioplaguicidas, plantas transgénicas y alimentos fermentados. p. 48-56.
- 2 BAILEY-SCOTT, E.G *Diagnóstico Bacteriológico de laboratorio.*
- 3 BROCK, Thomas D. *Microbiología.*
- 4 BUCHANAN, R E , Gibbons, N.E *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*
- 5 de BARJAC, H Identification of the H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. p. 1970-1980
6. DICKSON, T R. *Química Enfoque Ecológico.*
- 7 EMMEL C., Thomas. *Ecología y biología de poblaciones.*
- 8 ENKERLIN C., Ernesto. *Ciencia ambiental y desarrollo sostenible .*
- 9 FAUST R M , A. The *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin Current status. p. 153-156.
- 10 FAUST R.M., A. Bulla, Lee Jr. *Bacterial and their toxins as Insecticides in Microbial and Viral Pesticides*
- 11 GALÁN WONG, Luis J y Rodríguez Padilla, Cristina. Bioinsecticidas p. 44-47
- 12 GARCÍA TREJO, Antonio *Experiencias en microbiología del suelo.*
- 13 GÓMEZ BRINDIS, J G. México debe producir bioinsecticidas. p 20
- 14 INEGI Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos
- 15 JACKSON, Richard M *La vida en el suelo*
- 16 MAREC F.V , Weiser, Matha y Weiser, J Analysis of Genotoxic Activity of *Bacillus thuringiensis* beta exotoxina by means of the *Drosophila* wing spot test p 347-355.
- 17 MENDOZA DE GYVES, Emilio. (UACH) *Agrobiotecnología.*
18. SEBESTA K., Horská, K Inhibition of DNA dependent RNA polimerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var p. 281-282.
- 19 STANNIER, Roger. *The microbial world.*
- 20 TAMHANE, R.V. *Suelos su química y fertilidad en zonas tropicales.*

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGRO-SÍNTESIS. Bioplaguicidas, plantas transgénicas y alimentos fermentados. 1993, no.7, p. 48-56
2. ANGUS, T.A Symposium on Microbial Insecticides. *Bacteriological Reviews*, 1965, vol. 29, no. 3, p. 365-372.
3. BAILEY-SCOTT, E.G. *Diagnóstico Bacteriológico de laboratorio*. 2a. ed. Argentina : Editorial Panamericana, 1978.
4. BROCK, Thomas D *Microbiología*. 6a. ed. New York: Edit Prentice Hall Hispanoamericana, 1993.
5. BUCHANAN, R.E., Gibbons, N.E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 8th. U.S.A : The Williams and Wilkins Company. 1986.
6. CANTEWELL, E.G., A.M. Heimpel & M.J. Thompson,. The production of an Exotoxin by various Crystal forming Bacterial Related to *Bacillus thuringiensis* var. *Thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol.* 1964, vol.6; p. 466-480
7. CIAT. *Insectos del frijol almacenado y su control*. Cali : Centro de información sobre frijol., 1986. Folleto de divulgación.
8. CUMMINS, C.S. and Harries. The Chemical Composition of the Cell Wall and some Gram-positive Bacteria and its possible Value as a Taxonomic Character. *J. Gen.Microbiol*, 1956, vol. 13, p. 583-600.
9. de BARJAC, H & M.R. Dedonder,. Isolement d'un nucléotide identifiable a la "toxine thermostable" de *Bacillus thuringiensis* var Berliner *C.R. Acad. Sc. Paris*. 1965, p. 2843-2845.
10. de BARJAC, H & R. Dedonder, Purification de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* et analysis complementaries. *Bulletin de la Societé de Chimie Biologique* : Bulletin de la Societé et analysis complementanes 1968, vol 50, no., 4 .p. 941-944.
11. de BARJAC, H. *Microbial Control of Pest and Plant diseases*. New York : Academic Press, Inc. 1978.
12. DICKSON, T R. *Química Enfoque Ecológico*. México : Limusa Noriega Editores, 1997, 377-389.
13. EMMEL C., Thomas. *Ecología y biología de poblaciones*. México: Ed. Nueva Editorial Interamericana, 1975.
14. ENKERLIN C., Ernesto. *Ciencia ambiental y desarrollo sostenible*. México: International Thompson Editores, 1997.
15. ESCAMILLA, E.J., RIVERA, L.J. y ONTIVEROS, Isabel. Control Biológico de plagas. *Información Científica y Tecnológica*. 1986 vol. 8, número 119, p. 37-38.
16. FAUST R.M.,. The *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin Curren status. *Bull Entomol. Soc. Amer.* 1973, vol. 19; p. 153-156.
17. GALÁN WONG, Luis J. y RODRÍGUEZ PADILLA, Cristina. Bioinsecticidas. *Información Científica y Tecnológica* 1989, vol. 11. num. 154. p. 44-47.
18. GARCÍA TREJO, Antonio. *Experiementos en microbiología del suelo*. México : Edit Continental S.A. de C.V. 1981.
19. GÓMEZ BRINDIS, J.G. México debe producir bioinsecticidas. *Agro-síntesis*. Enero 1997, vol. 31, p.20.

20. HEIMPEL, and T A: Angus. Bacterial Insecticides *Bacteriological Reviews*. 1960, vol. 24, no 3
21. INEGI *Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos*. México, 1996. Tomo I.
22. JACKSON, Richard M *La vida en el suelo*. 2a ed. Barcelona España : Editorial Ediciones Omega 1981, p. 33-39.
23. JADE, Lee, CARROL, Joe y ELLAR, David J Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 1991, vol. 353, p. 815-821.
24. LAGUNES T A y C Rodríguez H *Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas de maíz almacenado en condiciones rústicas*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Colegio de Postgraduados. México : Chapingo, 1989. p 149 p
25. MAREC F.V Matha & J. Weiser,. Analysis of Genotoxic Activity of *Bacillus thuringiensis* beta exotoxina by means of the Drosophila wing spot test. *J. Invertebr. Pathol* 1989, vol. 53; p. 347-355.
26. MENDOZA DE GYVES, Emilio. (UACH) *Agrobiotecnología*. México : Grupo Editorial Iberoamericana. 1994
27. SALEH, S M, R F. Harris ALLEN. Method for determinig *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in soil. *Can. J. Microbiol.* 1969, vol. 15, p. 1101-1104.
28. SEBESTA K, K Horská,. Inhibition of DNA dependent RNA polimerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. Geleachie. *Biochem Biophys*, 1968, vol 164; p 281-282,
29. STANNIER, Roger. *The microbial world*. 15 ed New Jersey Prentice Hall.1986, p 475-487.
30. TAMHANE, R.V. *Suelos su química y fertilidad en zonas tropicales*. México Edit Diana.1978. p. 365-375.
31. VANKOVÁ J. , K Horská, K Sebesta,. The fate of *Bacillus thuringiensis* in Gallena mellonella caterpillar *J Invertebr. Pathol*. 1974, vol 23 , p 209-212.
32. YOO, Kwan-hee. Caracterización of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil in Wonju Area *The Journal of Microbiology*. 1996, vol. 34, no. 4, p. 370-373.

12. ANEXO

12.1. MEDIOS DE CULTIVO

1) CALDO SOYA TRIPTICASEINA BÍOXON

Fórmula para 1000 ml de agua destilada:

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
pH final	7.3 ± 0.2
Lote: 12011162 Registro No. 0114R8355	

2) AGAR DE SOYA TRIPTICASEINA BÍOXON

Fórmula para 1000 ml de agua destilada.

Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de soya	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Dextrosa	2.5 g
pH final	7.3 ± 0.2
Lote: 06B10871 Registro No. 0099R83SSA	

3) SOLUCION SALINA.

0.9 % Clave: 3610 Baxter S.A. de C.V. Lote: 0072

12.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

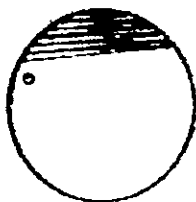
- a) Prueba de la Catalasa. Se colocan unas pocas gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % directamente sobre una colonia.
- b) Ureasa. Se inocula el medio con una asa recta con un cultivo puro del microorganismo en estudio; se siembra la superficie del pico de flauta del agar así como el fondo del medio de prueba, se incuba a 35 °C durante 18 a 24 horas
- c) Utilización de citratos Se toma una colonia bien aislada de la superficie del medio de aislamiento primario y se inocula como una estría en la superficie del pico de flauta, incubar el tubo a 35°C durante 24 a 48 horas.
- d) Rojo de metilo. Se inocula el caldo RMVP con un cultivo puro del microorganismo en estudio, se incuba el caldo a 35°C durante 48 a 72 horas Al término de este lapso se agregan 5 gotas de reactivo rojo de metilo directamente al caldo.
- e) Prueba de Voges-Proskauer. Se inocula un tubo de caldo RMVP con un cultivo puro del microorganismo en estudio, se incuba durante 24 horas a 35°C Luego de este lapso se pasa una alícuota de 1 ml de caldo a un tubo de prueba limpio y seco, se agrega 0.6 ml de Alfa-naftol al 5% seguido por 0.2 ml de KOH al 40 %
Es esencial que los reactivos se agreguen en este orden. El tubo se sacude suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico; luego se deja reposar durante 10 a 15 minutos.

- f) Reducción de nitratos. Se inocula el medio nitrato con un asa del microorganismo en estudio aislado en cultivo puro en agar y se incuba a 35°C durante 18 a 24 horas. Al término de la incubación se agrega 1 ml de los siguientes reactivos. Alfa-naftilamina y Ácido sulfanílico.
- g) SIM. Se inocula el medio de SIM por picadura con el microorganismo en estudio a 37°C durante 24 horas. Se hacen observaciones de motilidad, y formación de ácido sulfídrico. Después de este lapso se agregan 5 gotas del reactivo de Kovac.
- h) Hidrólisis de gelatina. Inocular un tubo con gelatina por picadura hasta el fondo del tubo, utilizando un asa recta el microorganismo. Incubar a 37°C por 24 horas, colocar los tubos en baño de hielo durante 5 minutos y observar.
- i) Obtención de ácidos a partir de carbohidratos. Se inoculan una serie de tubos con medio caldo rojo de fenol y el carbohidrato de estudio con la cepa. Incubar a 37°C durante 24 horas. Observar el resultado indicando si hay producción de ácido.
- j) Hidrólisis de almidón. Inocular un medio con agar almidón por picadura y estría, incubar a 37°C por 24 horas, para la lectura se adicionan dos gotas de lugol sobre las colonias aisladas observando el resultado.
- k) Fenilalanina. Se inocula el pico de flauta del medio con una sola colonia del microorganismo aislado en cultivo puro de agar primario. Incubar a 35°C por 18 a 24 horas, se agregan 4 o 5 gotas de cloruro férrico directamente a la superficie del agar. A medida que se agrega el reactivo, se gira el tubo para desalojar a las colonias superficiales.

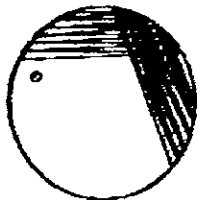
- l) Inocular un medio de LIA por picadura y estría. Incubar a 37°C por 24 horas Y hacer observaciones en el pico, en la base del tubo y en la picadura.

Se leerán los resultados de las pruebas bioquímicas como habitualmente se hacen para las pruebas que se leen directamente (urea, citratos, y LIA,RF+Carbohidrato., etc.), para las pruebas que es necesario adicionar uno o más reactivos para su lectura, cubrir los tubos con sus respectivos reactivos (SIM, RM-VP, nitratos,Almidón,Fenilalanina, hidrólisis de gelatina).

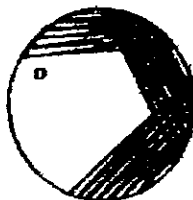
12.3. METODO DE AISLAMIENTO POR ESTRIA CRUZADA



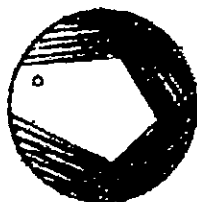
(a)



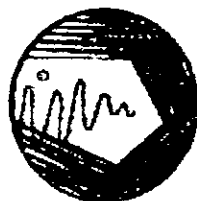
(b)



(c)



(d)



(e)

Método de aislamiento por estria cruzada.

13. GLOSARIO

Aerobios facultativos: microorganismos que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones y se encuentra disponible pero crecerá fermentativamente en su ausencia

Amilasa: enzima que cataliza la hidrólisis del almidón.

Antígeno H: antígeno flagelar de las bacterias; (H de *hauch*, del alemán que significa respirar).

Bacilo: bacteria cilíndrica o en forma de bastón; *Bacillus* es el nombre genérico para los bastoncitos aeróbicos formadores de esporas

Catabolismo: proceso metabólico que consiste de la oxidación última de un sustrato, se acompaña por la liberación de energía

Catalasa: enzima que cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno para producir agua y oxígeno

Cultivo: medio que contiene microorganismos vivos

Cultivo en placa. método para separar células bacterianas sobre una superficie sólida para obtener un cultivo puro de una colonia aislada (por estriación)

Cultivo puro. cultivo que contiene solamente una especie, tipo o microorganismo

Endósporas. cuerpos diminutos altamente resistentes que se desarrollan en ciertas células bacterianas y son capaces de dar lugar a nuevas células vegetativas, son características de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, y *Desulfotomaculum*.

Endotoxinas. grandes moléculas de lipopolisacárido que son componentes normales de las paredes celulares de las bacterias gramnegativas; pueden causar fiebre y choque mediante la infección.

Esporulación: proceso de formar endósporas.

Exotoxinas: sustancias tóxicas excretadas de la célula bacteriana.

Fase de muerte: fase en el crecimiento de un cultivo cuando la reproducción por lo general se detiene. Como el índice de muerte excede al índice de reproducción, el número real de microorganismos viables declina.

Fase estacionaria: crecimiento de un cultivo cuando el índice de reproducción iguala al índice de muerte y el número de bacterias viables permanece constante.

Fase Lag: periodo de ajuste a un medio después de la inoculación de un cultivo.

Fase log: periodo de reproducción más rápida en las fases de crecimiento de un cultivo; el tiempo de generación es constante cuando se pone en una gráfica, y el logaritmo del número de microorganismos aparece como una línea recta.

Fermentación: degradación anaeróbica de carbohidratos que resultan de la formación de productos de fermentación estable; los compuestos orgánicos son aceptores finales de electrones en este proceso de producción de energía.

Fitófago: Que se nutre de materia vegetal.

Grampositivo: describe a las bacterias que poseen una pared gruesa de peptidoglucano que retiene la tinción inicial de Gram cuando se lava con alcohol al 95 por ciento.

Incubación: mantenimiento de los cultivos bajo condiciones favorables de crecimiento.

Indicador: sustancia que se puede utilizar para reflejar las modificaciones de pH mediante el cambio de color.

Inoculación: transferencia de células microbianas de un cultivo a un medio estéril por medio de una aguja o cabo inoculante estéril; asimismo, la introducción de microorganismos en el cuerpo animal, como una vacuna.

Inóculo: microorganismos que se utilizan para transferencia en un medio.

LD₅₀: dosis de una sustancia que puede matar el 50 por ciento de los receptores en un tiempo determinado.

Insecticida: Aplicase al producto que sirve para matar insectos

Insecto: Animal artrópodo de respiración traqueal, cabeza provista de antenas y tres pares de patas.

Larva: Primera forma de ciertos animales (batracios, insectos, crustáceos, etc.) que en virtud de metamorfosis, difiere de la que tendrán en estado adulto.

Medio: sustancia nutriente utilizada con microorganismos en crecimiento; puede ser un medio líquido o un medio sólido al cual se le ha agregado agar.

Método de estricción en placa: el cultivo se estría sobre la superficie de un medio agar nutritivo a manera que separe los organismos en las colonias aisladas que se desarrollan.

Patógeno. Dicese de lo que causa las enfermedades

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Plaga: Abundancia de una cosa nociva o buena.

Plaguicida: Pesticida

Plancton Conjunto de los organismos microscópicos que viven en suspensión en las aguas
marinas o dulces

Septicemia: Infección de la sangre causada por la presencia de gérmenes patógenos.

Tóxico sustancia venenosa

Toxina Sustancia proteínica elaborada por bacterias, hongos, parásitos, capaz de producir en
el organismo efectos tóxicos.