

146  
Rej.

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOENSAYO DE 4 CEPAS DE Bacillus thuringiensis COMO AGENTE ENTOMOPATOGENO SOBRE DOS ESPECIES DE LEPIDOPTEROS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS: Ephestia cautella y Sitotroga cerealella

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A :

ISABEL GLORIA ONTIVEROS FLORA

1 9 8 8



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

Resumen.....	1
I Introducción.....	2
1 Métodos de Control.....	5
1.1 Control Químico.....	5
1.2 Control por Esterilización.....	7
1.3 Selección de Plantas Resistentes.....	7
1.4 Enemigos Naturales.....	8
2 Biología e Identificación de Insectos Plaga de Granos Almacenados.....	11
3 Tipos de Daño que Pueden Ocasionar los Insectos a los Granos en Almacenamiento.....	11
4 Caracterización de <u>Ephestia cautella</u> (Walker).....	12
5 Caracterización de <u>Sitotroga cerealella</u> (Oliver).....	13
6 Descripción de <u>Bacillus thuringiensis</u> (Berliner).....	15
6.1 Actividad Entomopatógica de <u>Bacillus thuringiensis</u> (Berliner).....	16
II Objetivos.....	18
III Materiales y Métodos.....	19
1 Cepas de <u>Bacillus thuringiensis</u> .....	19
2 Medio de Cultivo.....	19
3 Condiciones de Cultivo.....	20
4 Preparación del Inóculo y Siembra.....	20
5 Crecimiento y Cosecha.....	20
6 Recuperación del Complejo Espora-Cristal.....	21

7 Aislamiento de la cepa Bacillus thuringiensis  
HD-1 variedad kurstaki.....21

8 Formulaciones Bacterianas.....21

9 Cultivo de Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.....22

10 Pruebas de Toxicidad.....22

IV Resultados y Discusión.....23

1 Producción del Complejo Espora-Cristal.....23

2 Pruebas de Toxicidad.....24

V Conclusiones.....29

VI Sugerencias.....30

VII Literatura Citada.....31

## RESUMEN

Se probó el medio de cultivo líquido Holmberg, A. (1980), modificado por Rivera (1986), para el crecimiento de las siguientes cepas bacterianas de Bacillus thuringiensis: HD-27 variedad thuringiensis, HD-125 variedad tolwortii, HD-199 variedad darmastadiensis y HD-1 variedad kurstaki. Este medio permitió un rápido crecimiento y una abundante esporulación de las 4 cepas bacterianas.

Se realizaron pruebas de toxicidad con el complejo espora-cristal de las 4 cepas de Bacillus thuringiensis con larvas de dos especies de palomillas plaga de granos almacenados: Ephestia cautella y Sitotroga cerealella, se utilizaron concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0% del complejo espora-cristal.

De las pruebas hechas se concluye que: el complejo espora-cristal de las 4 cepas de Bacillus thuringiensis puede ser utilizado como bioinsecticida para el control de Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

La cepa más potente para el control de las dos especies plaga, resultó ser Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki, ya que utilizó menos tiempo y una dosis más baja (0.1%) para matar a un mayor número de larvas en comparación con las otras 3 cepas.

## I.-INTRODUCCION

Con la introducción de la agricultura, el hombre modificó el equilibrio ecológico en numerosas zonas, al crear condiciones artificiales. De manera natural el control de las especies se debe a una combinación de factores bióticos y abióticos tales como el agua, el clima, recursos nutricionales, competidores, enemigos naturales y patógenos. Al ser alterados algunos de los factores reguladores, ciertas especies pueden aumentar en número considerablemente hasta llegar a constituir un plaga. Según Krebs (1985), las plagas son aquellas especies que causan daños a la economía, molestan al hombre o ponen en peligro su salud. La primera idea que surge acerca de ellas es la de controlarlas, lo cual en este contexto significa disminuir los daños. Una de las formas evidentes de lograr esto último es disminuir la abundancia promedio de la plaga.

Una de las primeras sustancias químicas de carácter insecticida fue el sulfato de cobre, utilizado para combatir las plagas de la vid. A principios del siglo XX se comenzaron a utilizar en forma sistemática en los campos de cultivo: rotenona, nicotina, queroseno, aceite de pescado, compuestos de azufre, polvo de arsénico y mercurio, y se creó lo que se conoce como la primera generación de pesticidas. La segunda generación de pesticidas se inicia a principios de la segunda guerra mundial con el descubrimiento del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) por Müller en 1939, el hexacloruro de benceno por Jones en 1945 y los ésteres fosfóricos orgánicos por Schader (Rivera, 1986). El precio es mucho menor a los que se utilizaban anteriormente y matan a un gran número de especies. El empleo de estos nuevos insecticidas, principalmente el DDT produjo éxitos tempranos espectaculares, por ejemplo los programas contra el mosquito salvaron millones de individuos de la muerte debida al paludismo y a la fiebre amarilla. El control de plagas en zonas de cultivo y almacenamiento, condujo a altos rendimientos en las cosechas de todo el mundo (Stairs, 1971).

Sin embargo, la utilización desmesurada de plaguicidas ha tenido y tiene consecuencias muy negativas; por una parte, su uso reduce algunas especies de insectos útiles (polinizadores, productores de miel, depredadores, competidores naturales etc.) y contribuye por ello a la aparición de nuevas plagas. Muchas especies de insectos se han convertido además en resistentes a ciertos insecticidas lo que induce a buscar nuevos productos de

mayor eficacia. En segundo lugar, figura el grave problema de la toxicidad de muchos plaguicidas utilizados en la agricultura, que al ser arrastrados por las aguas causan la muerte de los peces y las aves, destruyen su alimento y lo contaminan. En algunos países se tuvo que prohibir su uso, debido principalmente a sus efectos perturbadores en el medio ambiente y daños ocasionados al hombre. Una de las catástrofes ecológicas más importantes, al parecer motivada por la utilización incontrolada de plaguicidas, fue la ocurrida en el Coto de Doñana (Huelva, España), en el verano de 1973 y que produjo la muerte de 40,000 aves de dicho parque nacional, una de las más importantes reservas ecológicas de Europa. Estos hechos llevaron a la búsqueda de otros métodos de control de plagas. Para comienzos de la década de 1970 tomaron auge ciertos compuestos que son liberados por los insectos en especial los atrayentes sexuales, los cuales fueron considerados potencialmente como la tercera generación de pesticidas. Estos aún no han logrado su desarrollo, debido a una gran cantidad de dificultades técnicas. Actualmente, están siendo desplazados por los insecticidas de tipo bacteriano, con características insecto-patógenas, y se consideran a éstos como la cuarta generación de pesticidas con grandes posibilidades de producción y desarrollo (Ortiz, 1986).

Los granos representan para el hombre una base fundamental para su alimentación y por sus características de materiales nutritivos, son objeto de infestación por diversas entidades biológicas que persiguen su propia sustentación y se convierten en factores de plaga (Velázquez, 1983).

La infestación de insectos a granos almacenados, constituye una de las más importantes causas de pérdidas a nivel mundial. Los granos de mayor cultivo en México son el maíz y el frijol, que constituyen la principal fuente de alimentación de nuestro pueblo. La producción de estos dos granos básicos, se ha intensificado en algunos años hasta los niveles que su consumo lo demanda, pero se ha visto severamente mermada registrando pérdidas por más del 15% de la cosecha que, se almacena bajo condiciones tecnificadas y por tanto es de esperarse que el grano que se almacena en el medio rural presente mermas aún más elevadas. Algunos estudios realizados en poblaciones rurales reportan pérdidas que varían de un 25 a 50% (Loaiza, 1962) y de 20 a 25% (Guarino, 1980). De la información tomada de Ramírez (1981) se acepta que en México existe una pérdida global que va de un 5% hasta 20% de la producción total de maíz, trigo, y

frijol almacenado. Esto se acentúa en aquéllas áreas bajas, cálidas y húmedas del país, que proporcionan condiciones ecológicas adecuadas para la infestación de insectos, hongos y roedores que dañan al grano. (Ramírez, 1980).

Uno de los problemas más importantes, al que se enfrentan actualmente las naciones, es la producción de granos y otros alimentos para la subsistencia de la humanidad; existen dos mecanismos para solucionar esto: la primer medida consiste en el aumento de la producción, la cual se lograría por un mejoramiento de técnicas de cultivo, la formación de nuevas zonas para siembra y la producción de semillas mejoradas. El otro mecanismo sería la implantación de almacenes con características apropiadas, que permitan el control de plagas y faciliten la conservación de los granos (Ramírez, 1980).

La situación actual de las prácticas de control de plagas de insectos, a nivel mundial y de manera especial en los países subdesarrollados como México, ha sido caracterizada desde hace varios años por una serie de hechos desfavorables entre los cuales destacan, la contaminación del medio ambiente, por un lado con residuos tóxicos de plaguicidas que se aplican indiscriminadamente, más de 400 especies de insectos plaga y ácaros han desarrollado resistencia a los plaguicidas (Áranda, 1987), se ha provocado un daño grave a los enemigos naturales de los organismos plaga, se ha dañado a otros organismos que no son el objetivo del control, incluyendo fauna silvestre; existe acumulación de residuos tóxicos en cultivos alimenticios y en los tejidos de muchos animales y el hombre; el costo cada vez mayor de estos agroquímicos repercute en un alto costo de los productos agropecuarios que afecta al consumidor. Esta situación ha obligado a buscar alternativas de control que no dependan del uso de plaguicidas químicos. Entre los distintos métodos de control biológico de plagas con posibilidades de ser aplicados a gran escala, como es el caso del control microbiológico que es uno de los más atractivos, principalmente aquel que se basa en la utilización de bacterias entomopatógenas. El presente trabajo pretende probar, en base a la información consultada, que se puede aplicar un modelo de control microbiológico de plagas de granos almacenados con el uso del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis.

## 1.-METODOS DE CONTROL

### 1.1 CONTROL QUIMICO

En la actualidad el control de plagas se lleva a cabo principalmente mediante la utilización de plaguicidas químicos (tabla I). Sin embargo, el empleo de rociados no selectivos ha conducido a la destrucción de controles naturales y a la alteración de los suelos agrícolas lo que disminuye las poblaciones de la flora bacteriana y por tanto el ciclo del nitrógeno (Morales, et al., 1977).

Uno de los principales problemas que se presenta con los insecticidas químicos es que muchos de los insectos se hacen resistentes. En otros términos, un determinado insecticida en una concentración dada se hace a menudo menos eficaz después de algunos años de uso, tal parece como si la sustancia química hubiera perdido fuerza, pese a que la composición se ha mantenido inalterada. Esto es debido a las mutaciones al azar que los insectos han tenido y la consecuente presión de selección por un ambiente aparentemente hostil. Por otra parte, al cambiar los plaguicidas se producen en algunos casos insectos resistentes a más de una sustancia química. En consecuencia, los insecticidas de amplio espectro han dado lugar a problemas más graves que aquellos que solo transitoriamente han resuelto.

TABLA I

INSECTICIDAS QUIMICOS MAS COMUNES (Martínez, 1985)

Organoclorados	Organofosforados	Carbamatos	Piretrinas
Endrina	Demeton	Aldicarb	Resimetina
Aldrina	Paratión	Carbofuran	Bioresimetrina
DDT	Metilparatión	Metomil	Aletrina
Toxafeno	Fenitón	Bayón	Decametrina
Canfeclor	Diazinon	Servin	Cipermetrina
BHC	Diclorvos		Permetrina
Endosulfan	Fenitrón		Fenvalerato
Lindano	Dimetoatón		
Metoxicloro	Malatión		

## 1.2 CONTROL POR ESTERILIZACION

La técnica de esterilización consiste en criar moscas macho, esterilizarlas por radiación y luego soltarlas a su ambiente natural, lo que da como resultado que las hembras que se aparean con los machos irradiados no puedan poner huevos fértiles. Esta técnica es específica de la plaga combatida y no transtorna, por consiguiente, al ecosistema. Desafortunadamente tienen que resolverse muchos problemas técnicos antes, de que el control por medio de machos estériles pueda extenderse a diversas plagas. En primer lugar hay que encontrar la manera de esterilizar el insecto sin afectar la posibilidad de encontrar parejas, cuestión difícil de conseguir; sin embargo, existe una gran opción, que es la de matar el esperma sin que se perjudique al adulto. En una gran cantidad de casos, el proceso de esterilización debilita al macho, a tal grado que no puede competir eficazmente con los insectos de su misma especie no tratados. En el caso de insectos hembras que se acoplan muchas veces con machos distintos, resulta virtualmente imposible reducir las probabilidades de apareamiento fecundo a niveles suficientemente bajos para que se produzca un control. El caso del gusano barrenador Callitroga americana y C. marcellaria, es particularmente favorable porque una mosca hembra virgen solo se aparea una sola vez en su vida y además, si la propagación de machos estériles con respecto a los no esterilizados es suficientemente alta, entonces el control resulta posible (Brian, 1981).

## 1.3 SELECCION DE PLANTAS RESISTENTES

Durante algún tiempo, se han venido seleccionando plantas resistentes al ataque de plagas, habiéndose logrado en algunos casos buenos resultados. La producción de una variedad de alfalfa resistente al gorgojo (Coleoptera: Curculionidae) y de varios cereales resistentes a la infección de la roya son ejemplos que pueden citarse. Los éxitos en este campo han sido prometedores, de modo que esta investigación merece apoyarse aún más. Las nuevas variedades de plantas han de producir altos rendimientos mientras mantienen la resistencia natural a las enfermedades. Sin embargo, se ha visto que durante un cierto tiempo la defensa genética de una especie ha sido contrarrestada por cambios genéticos en el organismo

atacante. De esta manera, muchos cultivos resistentes pierden su inmunidad después de algunos años, de modo que hay que desarrollar nuevas variedades resistentes (Turk, et al., 1976).

#### 1.4 ENEMIGOS NATURALES

En esta sección se han tenido resultados muy importantes, por ejemplo con el escarabajo japonés. Esta plaga fue importada inadvertidamente en un envío de plantas orientales y se pudo propagar principalmente en la costa oriental de los Estados Unidos, donde se fue convirtiendo gradualmente en una plaga importante. Esto propició que los científicos buscaran alternativas viables para su eliminación natural, una de éstas fue encontrar un depredador del escarabajo japonés, hallándose para este fin una avispa oriental, la cual paraliza a la larva del escarabajo y deposita en ella un huevo. Al salir la joven avispa del huevo se come la larva como su primer alimento y no se nutre de larvas de otros insectos, por consiguiente esta clase de control es específica y no afecta el resto del ecosistema (Kenward, 1981).

En algunos casos el aumento simple de la población de depredadores naturales tales como la catarina (Coleoptera: Coccinellidae) o la mantis religiosa (Dictyoptera: Mantidae), se ha revelado como una técnica eficaz.

Con otros mecanismos se han registrado éxitos contra plagas importantes, como la utilización de organismos patógenos. Desde hace algunos años se ha reglamentado el uso de microorganismos, tales como virus (Stairs, 1971) eficaces contra el gusano de la mazorca y la cápsula del algodón. Con hongos se han hecho muchos intentos para el control de insectos de importancia económica (Wilkinson, 1976). Hasta el momento se conocen 28 grupos de insectos que son susceptibles al ataque por hongos como: Beauveria bassiana, Metharrhizium anisopliae y algunas especies de Entomophitopora (Yendol, et al., 1971).

El estudio de los protozoarios patógenos para insectos, ha sido un campo con una gran cantidad de dificultades en comparación con otras técnicas, debido a su reproducción estricta in vivo, y que las cantidades de su producción no han alcanzado niveles muy altos. Y su utilización en la actualidad no es costeable. (McLaughlin, 1971).

Los nemátodos constituyen otra alternativa en el control

biológico y su acción se ha visto tanto en plagas terrestres como en insectos acuáticos de importancia médica; un caso bien estudiado es el del nemátodo Agamermis decautata, que ataca al saltamontes y causa su muerte. Al igual que en el caso de los protozoarios esta área también se enfrenta a grandes dificultades para su producción en altos volúmenes, así como su aplicación (Poinar, 1971).

El uso de las bacterias como otro tipo de control biológico se presenta actualmente como una área muy interesante y se ha considerado como los "bioinsecticidas del futuro", con grandes posibilidades de desarrollo y aplicación. Se conoce una gran variedad de bacterias asociadas con insectos y la mayor parte de ellas pertenecen a las familias: Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacilliaceae, Micrococcaceae y Bacillaceae (Tabla II). Sin embargo no todas han sido utilizadas como agentes de control debido, a sus propias características (Dubnau, 1985).

Las bacterias se pueden clasificar de acuerdo a su asociación con el hospedero en la naturaleza como patógenos obligados o patógenos facultativos. Los patógenos obligados se caracterizan de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) Se encuentran asociados a su hospedero en la naturaleza.
- b) El intervalo de sus hospederos esta muy restringido.
- c) No se cultivan normalmente in vitro.

Los patógenos facultativos:

- a) Se encuentran libremente en la naturaleza.
- b) Se cultivan in vitro.

Los insecticidas microbianos más importantes en la actualidad están constituidos con especies del género Bacillus entre las que sobresalen las siguientes tres especies: B. popillae, B. thuringiensis y B. sphaericus.

Para la producción de un bioinsecticida es necesario tener en cuenta que cumplan las siguientes características:

- 1) Que el insecticida dañe específicamente al insecto plaga.
- 2) Que sea de rápida acción.
- 3) Que tenga relativa estabilidad frente a los factores del medio ambiente tales como la desecación, luz solar, etc.
- 4) Que su producción sea factible y costeable. (Lechtman, 1980).

TABLA II

## BACTERIAS QUE SE HAN IDENTIFICADO COMO ENTOMOPATOGENAS

FAMILIA	ESPECIE	HOSFEDERO
Pseudomonadaceae	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Saltamontes (Ins:Orthoptera)
	<u>Pseudomonas septica</u>	Escarabajos (Ins:Coleoptera)
	<u>Vibrio leonadii</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
Enterobacteriaceae	<u>Serratia marcescens</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
	<u>Escherichia coli</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
	<u>Aerobacter aerogenes</u>	Mariposas (Ins:Lepidoptera)
	<u>Proteus vulgaris</u>	Saltamontes (Ins:Orthoptera)
	<u>Proteus mirabilis</u>	Saltamontes (Ins:Orthoptera)
	<u>Salmonella enteritidis</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
	<u>Shigella dysenteriae</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
Lactobacillaceae	<u>Diplococcus sp.</u>	Abejorro (Ins:Hymenoptera)
	<u>Streptococcus fecalis</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
Micrococcaceae	<u>Micrococcus sp</u>	Escarabajos (Ins:Coleoptera)
Bacillaceae	<u>Bacillus thuringiensis</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)
	<u>Bacillus cereus</u>	Mariposas (Ins:Lepidoptera)
	<u>Bacillus popillae</u>	Escarabajos (Ins:Coleoptera)
	<u>Bacillus lentimorbus</u>	Escarabajos (Ins:Coleoptera)
	<u>Bacillus sphaericus</u>	Mosquitos (Ins:Diptera)
	<u>Bacillus larvae</u>	Abejas (Ins:Hymenoptera)
	<u>Clostridium novyi</u>	Palomillas (Ins:Lepidoptera)

## 2.-BIOLOGIA E IDENTIFICACION DE INSECTOS FLAGA DE GRANOS ALMACENADOS

Los insectos pueden clasificarse por el daño que producen en: plagas primarias, plagas secundarias y plagas terciarias. Las plagas primarias son aquellas especies de insectos, que son capaces de romper la cubierta externa del grano y dañarlo, o bien los adultos depositan sus huevecillos en el exterior del grano y al nacer la larva perfora el grano alimentándose de su interior, por ejemplo Sitophilus, Rhizopertha, Prostephanus, Ephestia.

Las plagas secundarias son aquellas especies de insectos, que se desarrollan una vez que el grano ha sido dañado por las plagas primarias; un ejemplo característico de este tipo de plaga es el de Tribolium castaneum.

Las plagas terciarias son aquellos insectos que se desarrollan una vez que el grano ha sido dañado por las plagas primarias y secundarias. Generalmente se alimentan de impurezas, granos quebrados y perforados, residuos dejados por otros insectos, y de los hongos que se desarrollan una vez que el grano se ha deteriorado completamente. Un ejemplo son las especies de género Criptolestes (Ramírez, 1986).

## 3.- TIPOS DE DAÑOS QUE PUEDEN OCASIONAR LOS INSECTOS A LOS GRANOS EN ALMACENAMIENTO

El daño que producen los insectos a los granos, se ha clasificado en directo e indirecto. El daño directo consiste en la destrucción del grano por el insecto con fines alimenticios o por la oviposición, así mismo los insectos al morir o sus excrementos contaminan al grano al hacerlo inadecuado para el consumo humano, ya que en estas condiciones se pueden desarrollar bacterias patógenas para el consumidor. Muchas veces puede tener un aspecto poco atractivo comercialmente, como en el caso de la seda que producen las larvas de las palomillas Plodia interpunctella, Ephestia cautella (Cotton, 1963).

El daño indirecto es el producido por el calentamiento del grano debido al metabolismo de los insectos, lo cual origina un mal olor causado por el desarrollo de los microorganismos que encuentran un medio favorable de temperatura y humedad. Los dos tipos de daño demeritan considerablemente tanto el poder germinativo de las semillas, como la calidad y cantidad del grano; inaceptable para consumo alimenticio o industrial (Ramírez, 1981).

Los trabajos de muestreo que se han efectuado, indican que en México existen 25 especies de insectos de importancia económica, que infestan a granos almacenados y a sus productos, sin embargo, se ha demostrado que los que mayor daño ocasionan a los granos y a las harinas, son unas 15 especies entre insectos primarios y secundarios pertenecientes a varias familias de los órdenes Coleoptera y Lepidoptera y son los de mayor importancia los siguientes: gorgojo Sitophilus que ataca cereales enteros, barrenillo de los granos Rhyssopertha que se alimenta de cereales, gorgojo de dientes de sierra Orizaephilus que se desarrolla en almacenes de cereales y harinas, barrenador de los granos Prostephanus que se alimenta de cereales, gorgojo Tribolium que es omnívoro, gorgojo pardo del frijo Acanthoscelides que ataca al frijol, palomilla dorada de los cereales Sitotroga cerealella, palomilla banda clara Plodia interpunctella que infestan cereales y harinas, palomilla gris Ephestia kühneli y Ephestia cautella, que son plaga de granos y harinas almacenadas. (Cotton, 1963).

#### 4.- CARACTERIZACION DE Ephestia cautella (Walker)

Clase: Insecta  
Orden: Lepidoptera  
Familia: Pyralidae  
Género: Ephestia  
Especie: E. cautella

Se le conoce comúnmente como polilla tropical de los almacenes, o palomilla de la fruta seca.

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

Tipos de daños e importancia: Esta especie es una plaga primaria. Los huevecillos son puestos en acumulaciones de harina o sobre los granos, incuban de 3 a 6 días, lo que depende de la temperatura. Las larvas al emerger empiezan inmediatamente a

tejer hilos de seda y forman lo que se conoce como el apelmazamiento del grano. Las larvas bien desarrolladas, miden aproximadamente 1.5 cm. de largo, son de color blanquizco a rosado generalmente. Las polillas adultas que no se alimentan viven menos de 14 días, y los huevos (hasta 300 por cada hembra) los depositan normalmente dentro de los 3 ó 4 días de haber emergido del capullo, la larva se desplaza libremente entre el producto almacenado y lo contamina con su seda y deyecciones. La larva perfora el grano y lo destruye, alimentándose del interior, hasta que llegan a la madurez. Después construyen el capullo y emerge el adulto. En condiciones óptimas, los huevos eclosionan en tres días y el desarrollo de la fase de huevo a la de adulto dura aproximadamente 25 días.

Condiciones de temperatura y humedad relativa para el desarrollo:

Temperatura (°C)	% de Humedad Relativa
Máxima: 38	100
Minima: 15	45
Optima: 28	70

La incidencia en el país es muy alta. (Hinton, et al., 1972).

##### 5.- CARACTERIZACION DE Sitotroga cerealella (Oliver)

Clase: Insecta  
Orden: Lepidoptera  
Familia: Gelechiidae  
Género: Sitotroga  
Especie S. cerealella.

Se le conoce comúnmente como polilla de los cereales o palomilla dorada de los cereales.

Diagnósis: Son polillas pequeñas de color entre pardo y amarillento pálido. Las alas anteriores con dos pequeños puntos negros; las alas posteriores con una visible orla de largas sedas; ápice puntiagudo. Palpos labiales curvos. Los productos que ataca generalmente son el arroz, sorgo, maíz, cebada y trigo.

Tipos de daños e importancia: Esta especie es considerada como plaga primaria de productos almacenados, causa daños muy parecidos a los que llevan a cabo los gorgojos (Coleoptera: Curculionidae). La merma de peso de los granos de maíz atacados por ésta especie es aproximadamente del 10%. Por lo general infesta los productos agrícolas antes de la recolección. En los productos almacenados abunda solamente en las capas superficiales de los granos guardados a granel. La hembra deposita los huevos en la superficie de los granos, y la larva sale del huevo y taladra el grano y penetra en él. Ahí permanece hasta que ha alcanzado su pleno crecimiento, luego se forma la pupa y después aparece la fase adulta que sale dejando en el grano un capullo característico. Las larvas solamente se alimentan de productos agrícolas almacenados; ya que los adultos tienen vida corta. El periodo de desarrollo de la fase de huevo a la de individuo adulto es aproximadamente de 30 días a 30°C .

Condiciones de temperatura y humedad relativa para el desarrollo:

Temperatura (°C)	% Humedad relativa
Máxima: 35	80
Mínima: 16	25
Optima: 32	75

Su incidencia en el país es muy alta. (Hinton, et al., 1972).

## 6.- DESCRIPCION DE Bacillus thuringiensis (Berliner)

### EL GENERO Bacillus:

La mayoría de los bacilos son quimioheterótrofos versátiles, capaces de utilizar un intervalo considerable de compuestos orgánicos simples (azúcar, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.) como sustratos para la respiración y en ocasiones también fermentan carbohidratos. Pocas especies requieren de factores de crecimiento no orgánico, otras pueden requerir aminoácidos, vitamina B o ambas. La mayoría son mesófilas, con temperatura óptima en un intervalo de 30 a 45°C. Sin embargo, el género también contiene a numerosas termófilas representativas, que crecen a temperaturas hasta de 65°C. Las especies mesófilas del género Bacillus pueden dividirse en tres subgrupos principales distinguidos por la estructura y la localización de la endospora (Stanier, et al., 1986).

Grupo 1: La forma de la endospora es oval, su posición dentro de la célula vegetativa es central, ésta no es distendida por la espora. Especies representantes: B. subtilis, B. cereus, B. thuringiensis (Stanier, et al., 1986).

Grupo 2: La forma de la endospora es oval, la pared de la espora es gruesa y rígida, la posición de la endospora dentro de la célula madre es central, ésta es distendida por la endospora y su representante es B. polymixa (Stanier, et al. 1986).

Grupo 3: La forma de la endospora es esférica, la posición de la endospora dentro de la célula vegetativa es terminal, la endospora distiende a la célula vegetativa. Por ejemplo: B. pasteurii (Stanier, et al., 1986).

Bacillus thuringiensis (Berliner) es una bacteria gram positiva, aeróbica, esporoformadora, patógena facultativa, tiene forma de bastón, productora de una inclusión proteica cristalina conocida también como cuerpo paraesporal, durante la fase de esporulación, pertenece al grupo 1 de la familia Bacillae. B. thuringiensis se distingue de B. cereus y B. anthracis, que son especies muy relacionadas, por la producción de una inclusión cristalina o cuerpo paraesporal o alfa-endotoxina durante la fase de esporulación. Esta inclusión es sintetizada por numerosas subespecies de B. thuringiensis (Stanier, et al., 1986)

La subespecie más conocida es B. thuringiensis Berl., fue aislada en 1911 por Berliner, de larvas muertas de la palomilla de la harina del mediterráneo, Anagasta kuhniella (Zell) recibidas de un molino de harina de Thuringia, Alemania. (De Bach, 1968).

Por lo general, cada esporangio contiene un cristal, éste puede tener forma bipiramidal, romboide o cuboide, el cristal representa del 20 al 30% del peso seco del esporangio (Andrews, et al., 1976), está compuesto aproximadamente de 95% de proteínas y 5% de carbohidratos, los aminoácidos más abundantes son el ácido glutámico y aspártico, contiene 3.8% de glucosa y 1.8% de manosa. (Bullá, 1976).

El peso molecular del cristal es de aproximadamente  $1.34 \times 10^6$  y puede ser solubilizado con tratamiento alcalino. (Andrews, et al., 1976). Este cuerpo paraesporal es formado fuera del exosporio y se separa de la spora después de la lisis de la célula madre. B. thuringiensis ha sido dividida en base a antígenos-H, en serotipos y variedades que se distinguen por sus propiedades bioquímicas y patógenas (William, et al., 1974).

#### 6.1.- ACTIVIDAD ENTOMOPATOGENA DE Bacillus thuringiensis (Berliner)

Los conocimientos que se tienen acerca de esta especie los revisó De Bach, (1968) y se iniciaron por los años de 1906 y 1915 con científicos japoneses (Ishiwata, Aoki y Chigasaki) que observaron que cultivos viejos (esporulados y con formación de cristales) de Bacillus thuringiensis var. sotto contenían una sustancia tóxica para el gusano de seda. Tanto Berliner en 1915 como Mattes en 1927 observaron el cristal en Bacillus thuringiensis var. thuringiensis, pero no lo asociaron con la toxicidad del bacilo. Esto fue sugerido por Hannay en 1953, y Fitz-James en 1955 quienes establecen una relación entre la toxina cristalina de B. thuringiensis y la parálisis que le ocurre a larvas de lepidópteros después de la ingestión del cristal (De Bach, 1968). La proteína cristal posee una elevada toxicidad específica para las larvas de muchos lepidópteros (cerca de 100 especies) (Falcon, 1971). Sin embargo, recientemente se aislaron las subespecies israelensis y kyushuesis que matan larvas de Culex pipiens y Aedes aegypti (Insecta:Diptera) entre otros. (Erickson, 1974).

La proteína cristal es soluble en soluciones alcalinas, una característica importante de los insectos susceptibles es, el pH del intestino, que es extremadamente alcalino (9-10.5); el cual es óptimo para la solubilización y degradación del cristal, al producir metabolitos tóxicos que causan a la larva los siguientes síntomas: Separación lateral de las células epiteliales del intestino y desprendimiento de la membrana basal, disminución de la actividad secretora de las células epiteliales, decremento en el número de microvellosidades observadas en las células columnares del epitelio intestinal, desintegración celular, mezcla de líquidos del hemocele y la hemolinfa (aumento del pH de la hemolinfa, que es ácida), parálisis intestinal y algunas veces parálisis general del cuerpo, necrosis celular, deshidratación y muerte (Andrews, *et al.*, 1976). Si bien la protoxina cristalina es el principio activo responsable de la parálisis y otros síntomas del hospedero susceptible, en muchos casos el bacilo invade los tejidos y la cavidad del cuerpo y produce una septicemia al acelerar el proceso letal (De Bach, 1968).

De acuerdo al insecto parece que hay por lo menos tres formas diferentes de acción por la cuales B. thuringiensis puede matar al insecto hospedero. Las diferencias entre éstas formas fueron aclaradas en el trabajo de Hemipel y Angus (1958), quienes les designaron como tipos I, II y III (Burgerjon, *et al.*, 1971).

En el tipo I de insectos, a los pocos minutos (5 a 20) después de la ingestión del complejo espóra-cristal, hay una parálisis del intestino medio. Posteriormente se presenta una parálisis general, de una a siete horas. La cual es acompañada por un incremento en el pH de la hemolinfa de una a dos unidades lo cual indica que hay una infiltración del material alcalino del intestino hacia la hemolinfa, existe una destrucción del epitelio intestinal y una alteración en la regulación de los iones de potasio. Este modo de acción se ha visto en insectos tales como Bombyx, Protoparce y Antheraea (Burgerjon, *et al.*, 1971).

En el tipo II, los insectos por ejemplo Malacosoma, Anisotota y Nimphalis no sufren un incremento en el pH de la hemolinfa, pero hay parálisis del intestino y muerte a los 4 días con una parálisis que impide la ingestión de alimentos y una septicemia generalizada. Este tipo de acción es probablemente el más común de los tres (Burgerjon, *et al.*, 1971).

El tipo III sólo se conoce en un insecto, Anagasta kuniella, el cual muere a los dos o cuatro días con síntomas de parálisis general. Este organismo no muere por la toxina cristalina en ausencia de esporas como en el caso de los tipos I y II. Parece ser que para causar la muerte la espóra debe germinar y crecer

en el intestino medio. Sin embargo, al administrar esporas libres de cristales la muerte no ocurre, por lo tanto se concluye que se requiere la acción combinada de cristales y esporas para provocar la muerte a este tipo de organismos. (Burgerjon, et al., 1971).

## II.-OBJETIVOS

1.- Demostrar si el medio Holmberg. A. (1980) modificado por Rivera (1986) permite un rápido desarrollo y una abundante esporulación de las cepas bacterianas de Bacillus thuringiensis HD-27, HD-125, HD-199 y HD-1.

2.- Probar experimentalmente si las cepas bacterianas de B. thuringiensis HD-27, HD-125, HD-199 y HD-1 pueden ser utilizadas como insecticida biológico para el control de dos especies de Lepidópteros plaga de granos almacenados: Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

3.- Determinar la dosis óptima para el control de Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

4.- Identificar la cepa más tóxica para el control de las dos especies plaga.

5.- Probar diferentes cantidades de la dosis óptima de la cepa más tóxica, para encontrar la cantidad mínima necesaria para el control de las dos especies plaga.

### III.- MATERIALES Y METODOS

#### 1.- CEPAS DE Bacillus thuringiensis

Las cepas de B. thuringiensis con las cuales se trabajó fueron:

- a) B. thuringiensis HD-27 var. thuringiensis.
- b) B. thuringiensis HD-125 var. tolwortii.
- c) B. thuringiensis HD-199 var. darmastadiensis.
- d) B. thuringiensis HD-1 var. kurstaki.

Las cepas a, b y c fueron donadas por los Drs. Holmberg, A. y Carlber, G. del Departamento de Microbiología de la Universidad de Helsinki, Finlandia.

La cepa d, fue aislada a partir de una formulación comercial llamada DIPEL (Abbott Laboratories North Chicago). El proceso de aislamiento se describirá más adelante.

#### 2.- MEDIO DE CULTIVO:

El medio de cultivo en el cual fueron crecidas las cepas bacterianas consiste de las siguientes sustancias:

Medio Holmberg, A. 1980 modificado (Rivera, 1986)  
Composición en gm por ls

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	5.0 gm	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0043 gm
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5 gm	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 gm
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001 gm	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.08 gm
Harina de soya	5.0 gm	Melaza	5.0 ml

### 3.- CONDICIONES DE CULTIVO

El cultivo de las cepas bacterianas se llevó a cabo en un biofermentador con capacidad para 20 litros construido por el Centro de Instrumentos, UNAM. Condiciones de cultivo: temperatura: 30°C, flujo de aire burbujeado a través del medio de 12 ls por minuto, agitación de 250 rpm.

### 4.- PREPARACION DEL INOCULO Y SIEMBRA

El inóculo se preparó en un matraz Erlenmeyer de 2 litros el cual contenía 1 litro de medio Holmberg, A. modificado. A partir de un vial se tomó un inóculo con ayuda de un asa de siembra y se inoculó el matraz; todo esto se llevó a cabo en condiciones estériles; el matraz ya con el inóculo se mantuvo en un cuarto de temperatura constante (30°C) y sometido a una agitación constante de 250 rpm durante 12 horas. Después de este tiempo dicho matraz fue usado como inóculo para el biofermentador que previamente fue esterilizado junto con el medio. Este procedimiento se llevó a cabo de igual manera para las 4 cepas de B. thuringiensis.

### 5.- CRECIMIENTO Y COSECHA

El crecimiento se siguió espectrofotométricamente a 540 nm.

La formación de esporas se observó periódicamente en microscopio de contraste de fases (100x), una vez que se observó la espora y el cristal libres, se procedió a la cosecha. Durante el crecimiento se observó la formación de espuma, problema que se solucionó al aplicar antiespumante (Antifoam A. Sigma Chemical Co.) .

La cosecha se llevó a cabo mediante centrifugación a 7500 rpm durante 10 min a 4°C empleando una centrifuga Sorvall RC-2B.

## 6.- RECUPERACION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL

El sedimento después de haber sido lavado con agua se procedió a secarlo en una liofilizadora Labconco modelo 4451F, la pastilla resultante se trituró en mortero hasta que se obtuvo un polvo fino color crema. El complejo espora-cristal ya en forma de polvo puede almacenarse a 20°C por varios años y mantiene su virulencia. (Mortimerp, et al., 1981).

## 7.- AISLAMIENTO DE LA CEPA Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki

La cepa B. thuringiensis HD-1 var, kurstaki fue aislada a partir de una formulación insecticida comercial llamada DIFEL, el procedimiento fue el siguiente: se colocó un poco del polvo insecticida en un tubo de ensayo con agua estéril y se sometió a baño María a 80°C durante 20 min, después de esto se puso el tubo en hielo (choque térmico), con el fin de activar la germinación de las esporas (Mortimerp, et al., 1981), se tomó un inóculo del tubo y se sembró en cajas Petri con agar nutritivo, (Bioxon) las cajas se colocaron en una estufa a temperatura de 30°C durante 24 hrs. A partir de las colonias crecidas se sembraron viales con agar nutriente para su conservación y futura utilización. Después de este procedimiento la cepa aislada fue sometida a los tratamientos que se les aplicaron a las otras cepas.

## 8.- FORMULACIONES BACTERIANAS

Una vez obtenido el complejo espora-cristal en forma de polvo, se procedió a preparar las formulaciones bacterianas. Estas se hicieron a diferentes concentraciones del complejo espora-cristal con el fin de encontrar la dosis óptima a la cual se obtuviera el mayor número de larvas muertas en menor tiempo, las concentraciones fueron las siguientes: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10%, como acarreador se utilizó harina de maíz estéril. Las cantidades tanto del polvo de esporas como la de la harina fueron pesadas en balanza analítica y las mezclas fueron homogenizadas por agitación en vortex.

## 9.- CULTIVO DE Ephestia cautella y Sitotroga cerealella

Para llevar a cabo los bioensayos se hizo necesario tener un abastecimiento más o menos regular de material de prueba (larvas). Esto se logró al instalar un insectario en el que se cultivaron las dos especies. Estos lepidópteros fueron proporcionadas por el M. en C. Mario Ramírez, encargado del Insectario del Instituto de Biología de la UNAM. La dieta con la cual se alimentaron a las dos especies, es una mezcla de salvado, glicerina y extracto de levadura en una proporción 10:3:1, respectivamente (Lecato, 1976)

El alimento se preparó de la siguiente manera: el salvado se mezcló con el extracto de levadura en un recipiente con la ayuda de una espátula, después se agregó poco a poco y sin dejar de mezclar la glicerina, una vez que se homogenizó completamente, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, y se esterilizó durante 15 min a 120°C.

Los frascos de cultivo fueron de 2.5 litros y se llenaron a la mitad con la dieta ya preparada. Estos frascos se inocularon con un promedio de 100 larvas. Las tapas de los frascos estaban perforadas para permitir el paso del aire, y forradas con papel estrasa por la parte interna para evitar la fuga de las pequeñas larvas y al mismo tiempo permitir el intercambio gaseoso. Los frascos de cultivo se instalaron en un cuarto de temperatura constante, cuyas condiciones eran las siguientes: temperatura: 30°C y humedad relativa de 65-70%, que son las condiciones óptimas para su desarrollo. (Junko, et al., 1981).

## 10.- PRUEBAS DE TOXICIDAD

Se realizaron en frascos de 250 ml de boca ancha, con las tapas perforadas y forradas por dentro. En estos frascos se colocaron 20 gm de maíz, 200 mg de formulación y 15 larvas, aproximadamente de la misma edad y procurando que fueran las más pequeñas. Cada bioensayo constó de 5 lotes experimentales y un lote testigo. Esto se realizó para cada una de las cepas bacterianas, con larvas de las 2 especies. El conteo de larvas muertas se realizó diariamente con la ayuda de una lupa.

#### IV.-RESULTADOS Y DISCUSION

##### 1.- Producción del complejo espora-cristal.

El medio Holmberg, A (1980) modificado por Rivera (1986), propició un rápido crecimiento y una abundante esporulación de las cuatro cepas bacterianas de Bacillus thuringiensis con las que se trabajó (curvas de crecimiento).

En las gráficas 1, 2, 3 y 4 se observa que el poder amortiguador del medio no permitió el descenso del pH por debajo de 5.6, ya que si esto hubiera sucedido, la esporulación se habría inhibido y para los fines del presente trabajo esto no era conveniente, ya que debido a la actividad metabólica de las células bacterianas, en el medio se van acumulando ácidos orgánicos, que producen una acidificación mortal para las bacterias.

Otra ventaja del medio de cultivo fue los rendimientos del complejo espora-cristal que se obtuvieron, al ser los siguientes:

ESPECIE	PESO SECO (gm)litro
<u>B. thuringiensis</u> HD-27	3.30
<u>B. thuringiensis</u> HD-125	2.13
<u>B. thuringiensis</u> HD-199	2.55
<u>B. thuringiensis</u> HD-1	2.50

En resumen las ventajas que ofrece el medio Holmberg, A. (1980), modificado por Rivera (1986) son las siguientes:

a) Permite un rápido crecimiento y una abundante esporulación de las 4 cepas bacterianas de Bacillus thuringiensis.

b) Está constituido por nutrientes baratos y las cantidades utilizadas son mínimas.

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

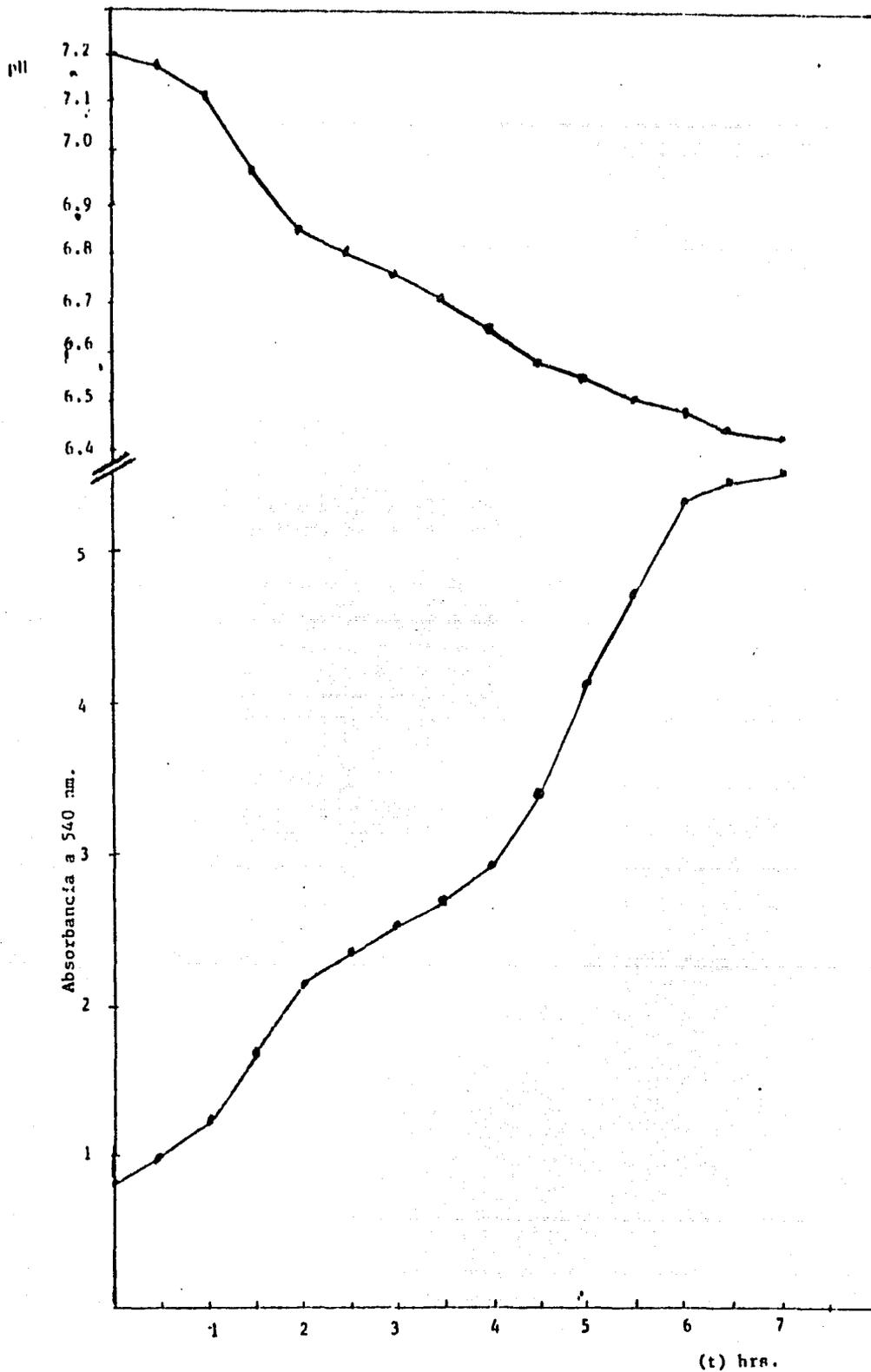
d) Las características de este medio pueden permitir la producción industrial nacional del insecticida biológico, ya que a la fecha se importa principalmente de los Estados Unidos, lo que representa una fuga importante de divisas.

Tabla III.- Resultados obtenidos durante el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* HD-27 variedad *thuringiensis* en medio de cultivo Holmberg, A. (1980) modificado por Rivera (1986).

T* hrs	D.O.+ 540 nm	pH
0	0.83	7.20
0.5	1.00	7.17
1.0	1.20	7.10
1.5	1.66	6.97
2.0	2.13	6.85
2.5	2.33	6.80
3.0	2.50	6.76
3.5	2.66	6.70
4.0	2.93	6.65
4.5	3.40	6.58
5.0	4.13	6.55
5.5	4.73	6.50
6.0	5.33	6.48
6.5	5.43	6.43
7.0	5.50	6.41

\* tiempo

+ Densidad Optica

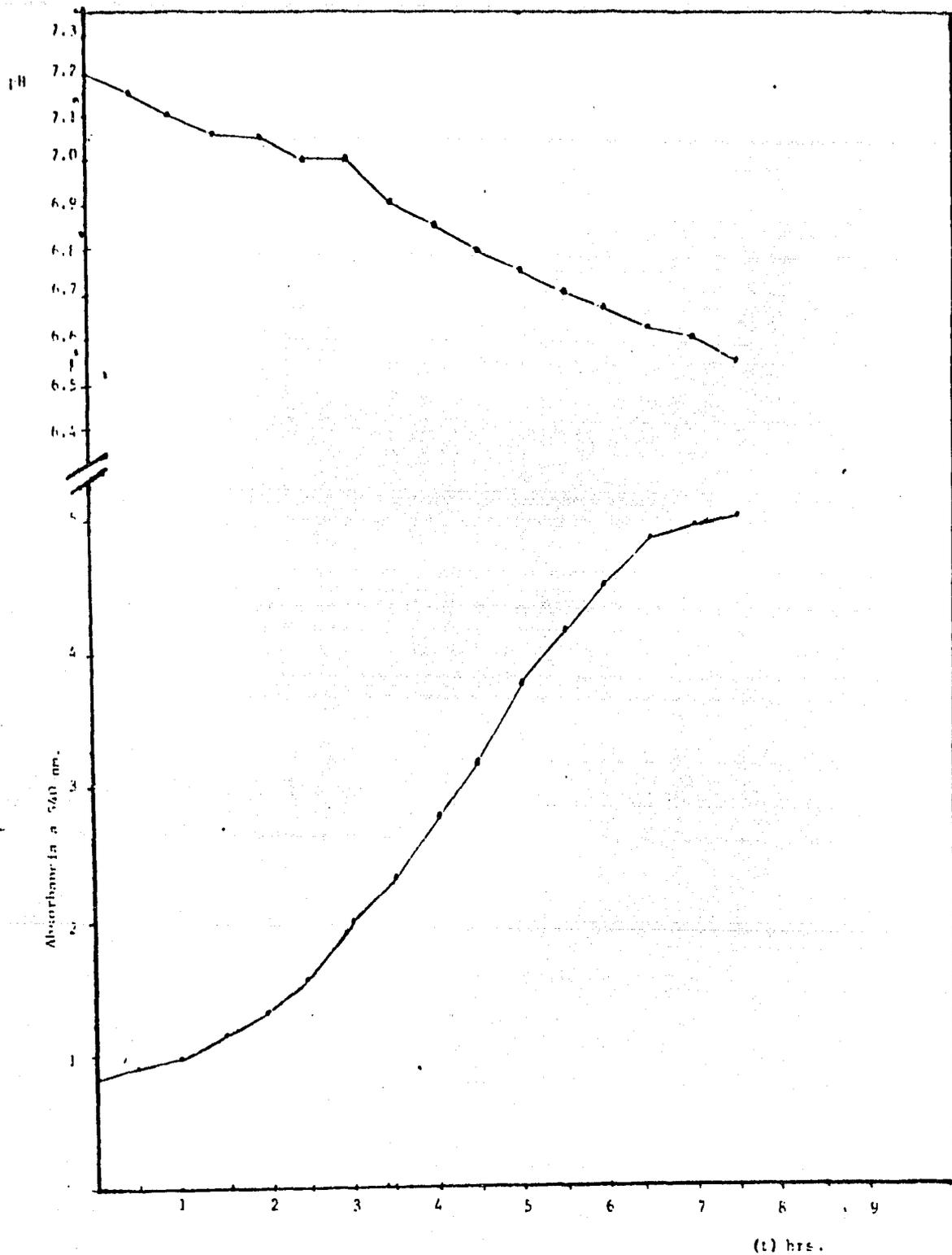


Gráfica 1: Curva de crecimiento de Bacillus thuringiensis HD- 27 variedad thuringiensis en medio Holmberg modificado, en la que se indica la variación de pH.

Tabla IV.- Resultados obtenidos durante el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* HD-125 variedad *tolwortii* en medio de cultivo Holmberg, A. (1980) modificado por Rivera (1986).

T* hrs	D.O.+ 540 nm	pH
0	0.83	7.20
0.5	0.93	7.15
1.0	1.00	7.10
1.5	1.16	7.05
2.0	1.33	7.05
2.5	1.60	7.00
3.0	2.00	7.00
3.5	2.33	6.90
4.0	2.76	6.85
4.5	3.16	6.80
5.0	3.76	6.75
5.5	4.20	6.70
6.0	4.50	6.67
6.5	4.83	6.62
7.0	4.96	6.60
7.5	5.00	6.55

\* tiempo  
+ Densidad Optica



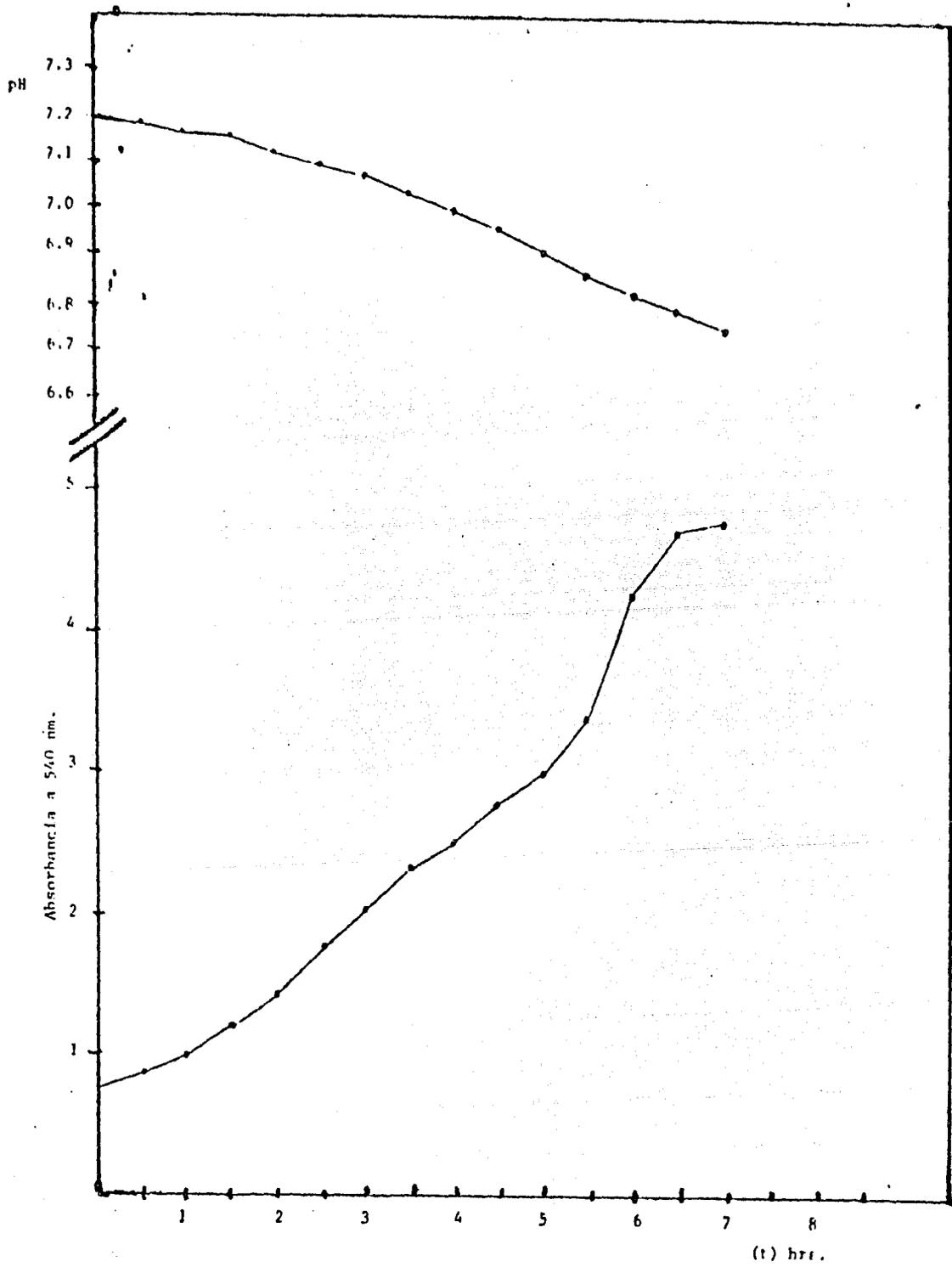
Gráfica 2: Curva de crecimiento de Bacillus thuringiensis HD-125 variedad tolwortii en medio Holberg modificado, en la que se indica la variación de pH.

Tabla V.- Resultados obtenidos durante el crecimiento de Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis en medio de cultivo Holmberg, A. (1980) modificado por Rivera (1986).

T* hrs	D.O.+ 540 nm	pH
0	0.72	7.20
0.5	0.86	7.19
1.0	1.00	7.17
1.5	1.18	7.16
2.0	1.45	7.13
2.5	1.72	7.10
3.0	1.95	7.08
3.5	2.27	7.04
4.0	2.45	7.00
4.5	2.68	6.95
5.0	2.90	6.90
5.5	3.32	6.87
6.0	4.13	6.82
6.5	4.59	6.79
7.0	4.62	6.75

\* tiempo

+ Densidad Optica



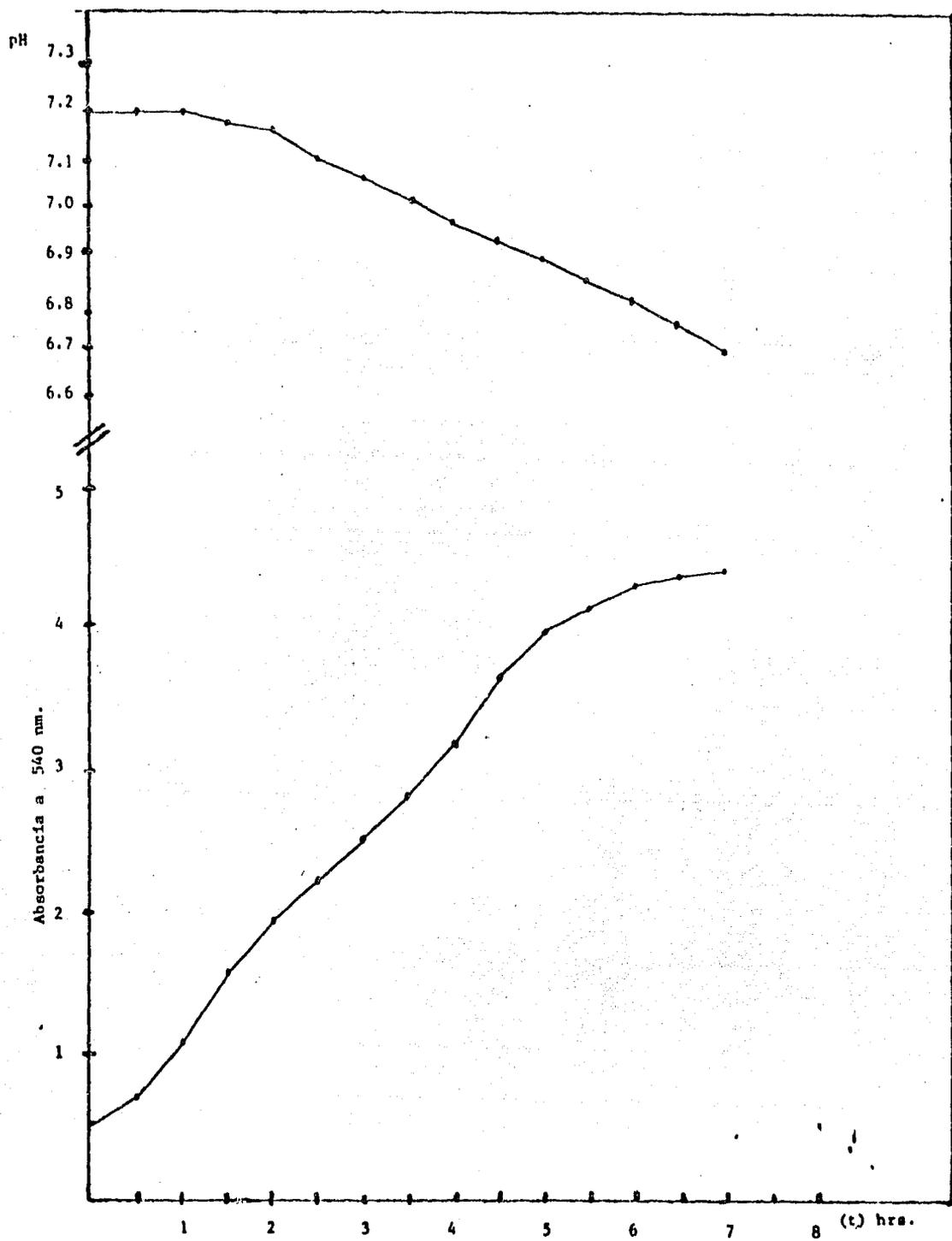
Gráfica 3: Curva de crecimiento de Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis en medio Holmberg modificado, en la que se indica la variación de pH.

Tabla VI.- Resultados obtenidos durante el crecimiento de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki en medio de cultivo Holmberg, A. (1980) modificado por Rivera (1986).

T* hrs	D.O.+ 540 nm	pH
0	0.52	7.20
0.5	0.68	7.20
1.0	1.04	7.20
1.5	1.54	7.18
2.0	1.90	7.17
2.5	2.13	7.10
3.0	2.45	7.06
3.5	2.77	7.00
4.0	3.13	6.96
4.5	3.54	6.92
5.0	3.86	6.88
5.5	4.08	6.85
6.0	4.18	6.80
6.5	4.27	6.75
7.0	4.31	6.70

\* tiempo

+ Densidad Optica



Gráfica 4: Curva de crecimiento de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki en medio Holmberg modificado, en la que se indica la variación de pH.

## 2.- Pruebas de Toxicidad:

Bioensayo 1: Prueba de toxicidad de Bacillus thuringiensis HD-27 var. thuringiensis sobre Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

En la gráfica 5 se observan las curvas de sobrevivencia vs. tiempo correspondiente a cada lote. La línea (0) se refiere al lote testigo, muestra que en los primeros 6 días del desarrollo larvario existe una mortandad natural que corresponde al 20% , después del día 7 el número de larvas permaneció constante, en este lote alcanzaron a llegar al estado adulto 11 organismos y a los 50 días se observaron pequeñas larvas pertenecientes a la segunda generación. Este comportamiento se repitió de manera semejante en los lotes testigos de todos los bioensayos. En el lote que contenía la dosis de 0.1% del complejo spora cristal, en 11 días mueren el 73.3% de los organismos que correspondían a 11 larvas, 3 llegaron al estado adulto y quedó una pupa sin emerger. En este lote no se presentó segunda generación, esto quizá se debió porque al nacer las pequeñas larvas y tener contacto con el complejo spora-cristal murieron rápidamente, quedando protegido el maíz contra el ataque de estas larvas aún cuando la concentración del complejo fuera tan baja. En el lote con la concentración de 0.5% el total de las larvas murieron en un lapso de 11 días. La dosis de 1% mata al 100% de las larvas en 9 días, la de 5% en 8 días y la de 10% en 7 días.

Como se puede observar, al aumentar la concentración del complejo spora-cristal disminuye el tiempo en que mueren las larvas, siendo las dosis más eficaces la de 10, 5 y 1%, en cuanto al tiempo que utilizan para matar a las 15 larvas, sin embargo se pueden utilizar las concentraciones más bajas (0.1 y 0.5 %) como medida profiláctica.

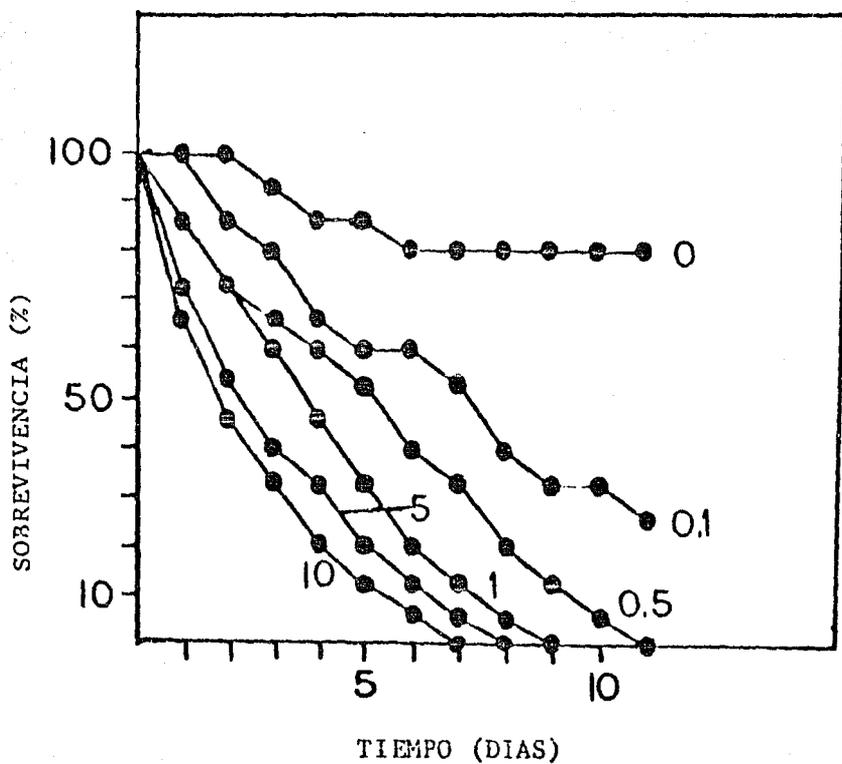
En lo que se refiere a las pruebas hechas de Bacillus thuringiensis HD-27 variedad thuringiensis con Sitotroga cerealella la gráfica 6 muestra que en el lote testigo (0) hay a los 10 días una mortandad de sólo el 20%, en este lote llegaron a estado adulto 11 organismos a los 25 días y a los 45 días se presentaron larvas de la segunda generación. El lote con la dosis de 0.1% a los 10 días tiene una mortandad del 73.3% (que corresponde a 11 larvas), 4 organismos llegan al estado adulto, pero no hay segunda generación. En el lote que contenía la dosis de 0.5% el 100% de las larvas mueren en 8 días. La dosis de 1% mata a las 15 larvas en 7 días al igual que la dosis de 5%. La dosis de 10% mata al 100% de las larvas en 6 días. Si se compara

Tabla VII.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-27 variedad thuringiensis sobre Ephestia cautella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	100	100	86.6	86.6	73.3	66.6
2	100	86.6	73.3	73.3	53.3	46.6
3	93.3	80.0	66.6	60.0	40.0	33.3
4	86.6	66.6	60.0	53.3	33.3	20.0
5	86.6	60.0	53.3	33.3	20.0	13.3
6	80.0	60.0	40.0	20.0	13.3	6.6
7	80.0	53.3	33.3	13.3	6.6	0
8	80.0	40.0	20.0	6.6	0	
9	80.0	33.3	13.3	0		
10	80.0	33.3	6.6			
11	80.0	26.6	0			

\* Lote testigo



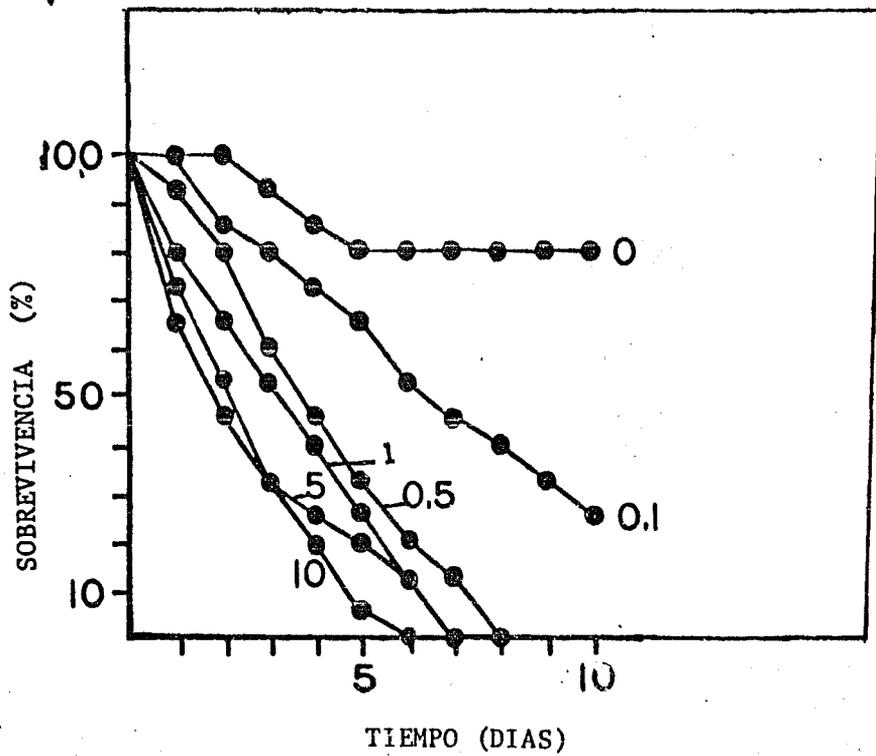
Gráfica 5 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-27  
 VARIEDAD thuringiensis SOBRE Ephestia cautella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

Tabla VIII.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-27 variedad thuringiensis sobre Sitotroga cerealella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	100	100	93.3	80.0	73.3	66.6
2	100	86.6	80.0	66.6	53.3	46.6
3	93.3	80.0	60.0	53.3	33.3	33.3
4	86.6	73.3	46.6	40.0	26.6	20.0
5	80.0	66.6	33.3	26.6	20.0	6.6
6	80.0	53.3	20.0	13.3	13.3	0
7	80.0	46.6	13.3	0	0	
8	80.0	40.0	0			
9	80.0	33.3				
10	80.0	26.6				

\* Lote testigo



Gráfica 6 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-27  
 VARIEDAD thuringiensis SOBRE Sitotroga cerealella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

la susceptibilidad de las dos especies plaga a la acción entomopatógena de Bacillus thuringiensis HD-27 variedad thuringiensis se observa que las larvas de Ephestia cautella son ligeramente más resistentes que las larvas de Sitotroga cerealella.

Bioensayo 2.- Prueba de toxicidad de Bacillus thuringiensis HD-125 variedad tolwortii sobre Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

En la gráfica 7 observamos que en el lote testigo (0) se presentó una mortandad del 13.4% en los primeros 8 días, a los 32 días se observaron 12 adultos y a los 46 días se presentaron larvas de la segunda generación. La dosis de 0.1% mata al 80% de las larvas de Ephestia cautella en 16 días, y el 20% que corresponde a 3 larvas llegan al estado adulto, en este lote no se observaron larvas pertenecientes a la segunda generación. En el lote con la dosis de 0.5% el 100% de las larvas mueren en 16 días. La dosis de 1% mata a las 15 larvas en 10 días, al igual que la dosis de 5%, aunque en este lote la población desciende más rápido que en el lote con la dosis de 1%, la dosis del 10% mata al 100% de las larvas en 8 días.

Al hacerse las pruebas de toxicidad de Bacillus thuringiensis cepa HD-125 variedad tolwortii con Sitotroga cerealella se obtuvieron los resultados mostrados en la gráfica 8. En el lote testigo (0) en los primeros 6 días se presentó un 20% de mortandad, a los 28 días se observaron 12 adultos y a los 36 días se observaron larvas pertenecientes a la segunda generación. La dosis de 0.1% mata a 13 larvas en un lapso de 5 días, las dos larvas restantes llegaron al estado adulto y no se observó segunda generación. La dosis de 0.5% mata al 100% de las larvas en 6 días. En el lote con la dosis de 1% el total de las larvas mueren en 5 días, lo mismo que en el lote que contenía la dosis de 5%, pero la población desciende más rápido en el lote con la dosis más concentrada (5%). La dosis del 10% mata al 100% de las larvas en 3 días. Los resultados antes mencionados muestran que Ephestia cautella es más resistente al control con Bacillus thuringiensis HD-125 que Sitotroga cerealella.

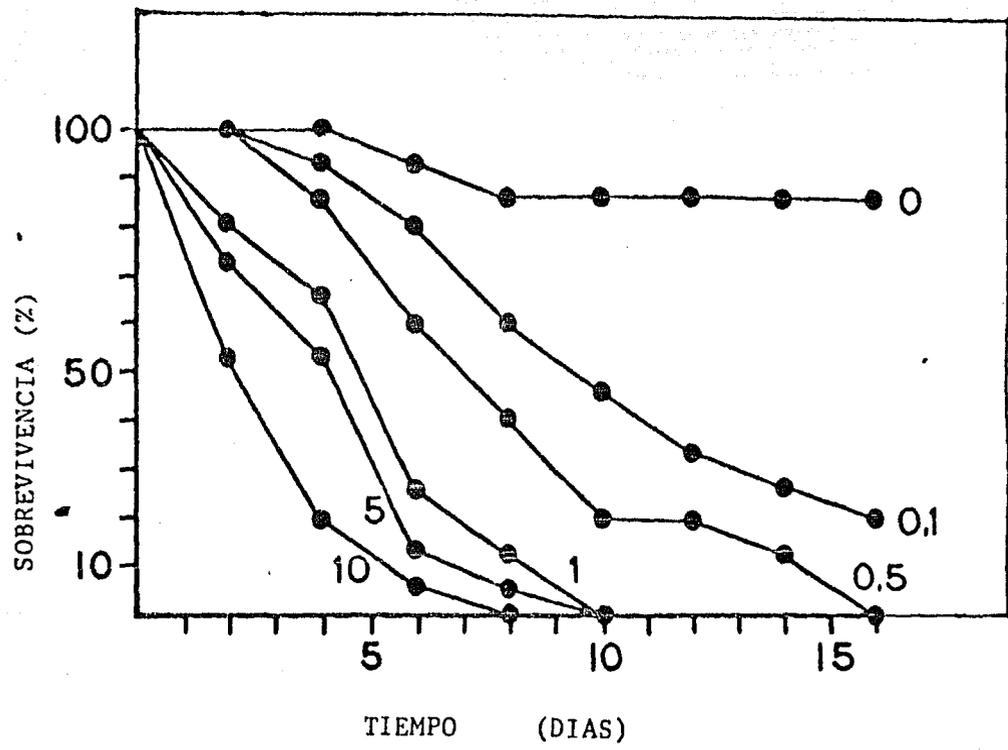
Comparativamente la cepa HD-125 es menos eficaz para el control de Ephestia cautella que la cepa HD-27 ya que la cepa HD-125 requiere más tiempo para surtir efecto.

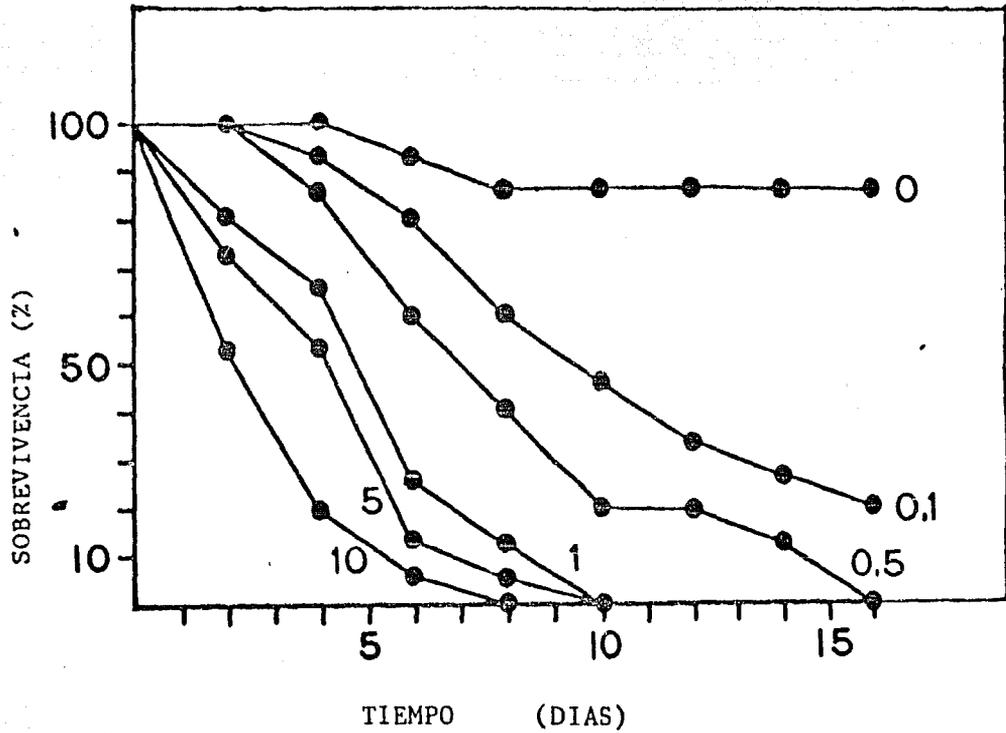
Tabla IX.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-125 variedad tolwortii sobre Ephestia cautella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
2	100	100	100	80.0	73.3	53.3
4	100	93.3	86.6	66.6	53.3	20.0
6	93.3	80.0	60.0	26.6	13.3	6.6
8	86.6	60.0	40.0	13.3	6.6	0
10	86.6	40.0	20.0	0	0	
12	86.6	33.3	20.0			
14	86.6	26.6	13.3			
16	86.6	20.0	0			

\* Lote testigo





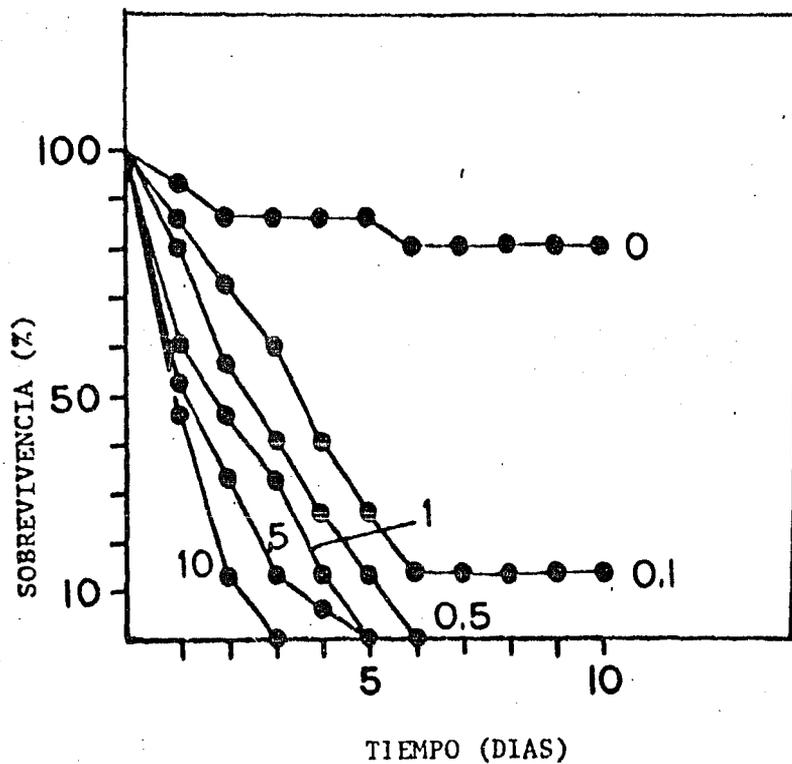
Gráfica 7 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-125  
 VARIEDAD tolwortii SOBRE Ephestia cautella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

Tabla X.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-125 variedad tolwortii sobre Sitotroga cerealella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	93.3	86.6	80.0	60.0	53.3	46.6
2	86.6	73.3	56.3	46.6	33.3	13.3
3	86.6	60.0	40.0	33.3	13.3	0
4	86.6	40.0	26.6	13.3	6.6	
5	86.6	26.6	13.3	0	0	
6	80.0	13.3	0			
7	80.0	13.3				

\* Lote testigo



Gráfica 8 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-125  
 VARIEDAD tolwortii SOBRE Sitotroga cerealella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

Bioensayo 3: Prueba de Toxicidad de Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis sobre Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

La gráfica 9 muestra gráficamente el descenso de la población en cada lote. En el lote testigo (0) en los primeros 5 días hay una mortandad del 20 %, a los 30 días se observaron 10 adultos y a los 39 días se observaron larvas de la segunda generación. En el lote con la dosis de 0.1% murieron 10 larvas en 11 días y a los 40 días se observó una pupa que no terminó de desarrollarse y 4 palomillas, este lote se siguió observando para ver si aparecían pequeñas larvas de la segunda generación, pero esto no sucedió. La dosis de 0.5% mata al 100% de las larvas en 9 días, la dosis de 1% mató a las 15 larvas en 8 días, la de 5% en 6 días y la de 10% en 5 días.

En el caso de Sitotroga cerealella los resultados de la prueba hecha con Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis se observan en la gráfica 10, en ella se observa que en el lote testigo a los 7 días existe una mortandad del 13.4%, en este lote se observaron 9 adultos a los 28 días y a los 45 días se presentaron larvas de la segunda generación. La dosis de 0.1% llega a matar a 10 (66.6%) larvas en 11 días, de las 5 larvas que quedaron 3 llegaron al estado adulto y 2 quedaron en estado pupal, no se presentó segunda generación. La formulación de 0.5% mata al 86.7% de las larvas en 10 días y no se presentó segunda generación. En el lote que contenía la formulación de 1% el total de las larvas mueren en 8 días. La dosis de 5% mata al 100% de las larvas en 6 días y la dosis de 10% en 5 días.

La susceptibilidad de las dos especies plaga de lepidópteros es semejante ante la acción entomopatógena de Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis.

Bioensayo 4: Prueba de toxicidad de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki sobre Ephestia cautella y Sitotroga cerealella.

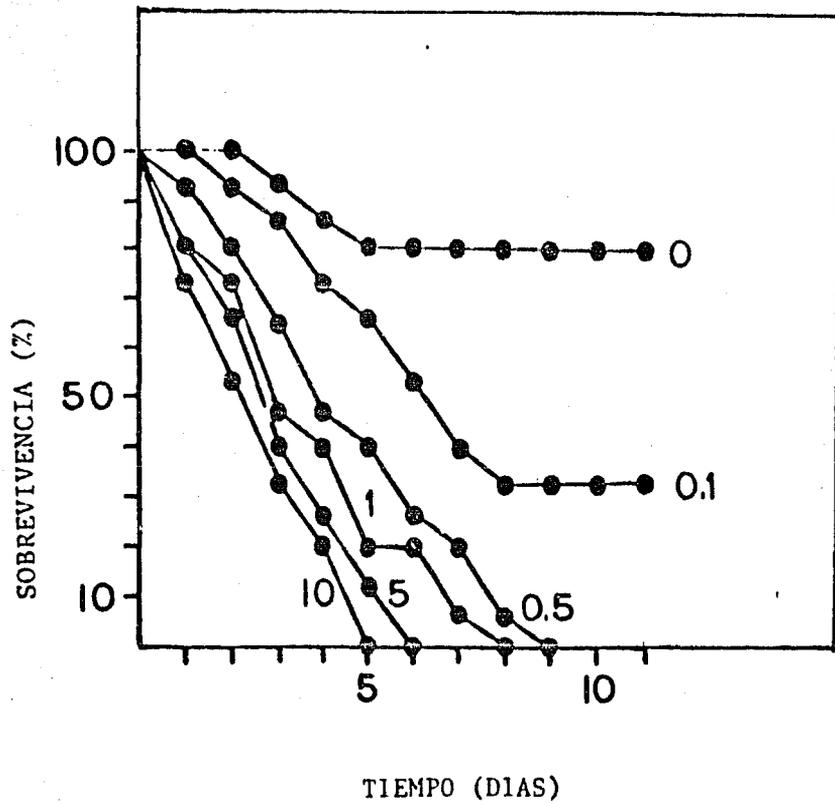
La gráfica 11 muestra el descenso de la población en cada lote. En el lote testigo (0) a los 8 días existe una mortandad del 13.4%, a los 32 días se observaron 12 organismos adultos y a los 50 días se presentaron larvas de la segunda generación, la dosis de 0.1% mata al 100% de las larvas en 8 días, la dosis de 0.5% en 6 días, la de 1% en 4 y la de 5 y 10% en 3 días.

Tabla XI.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis sobre Ephestia cautella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	100	100	93.3	80.0	80.0	73.3
2	100	93.3	80.0	73.3	66.6	53.3
3	93.3	86.6	66.6	46.6	40.0	33.3
4	93.3	73.3	46.6	40.0	26.6	20.0
5	86.6	66.6	40.0	20.0	13.3	0
6	80.0	53.3	26.6	20.0	0	
7	80.0	40.0	20.0	6.6		
8	80.0	33.3	6.6	0		
9	80.0	33.3	0			
10	80.0	33.3				

\* Lote testigo



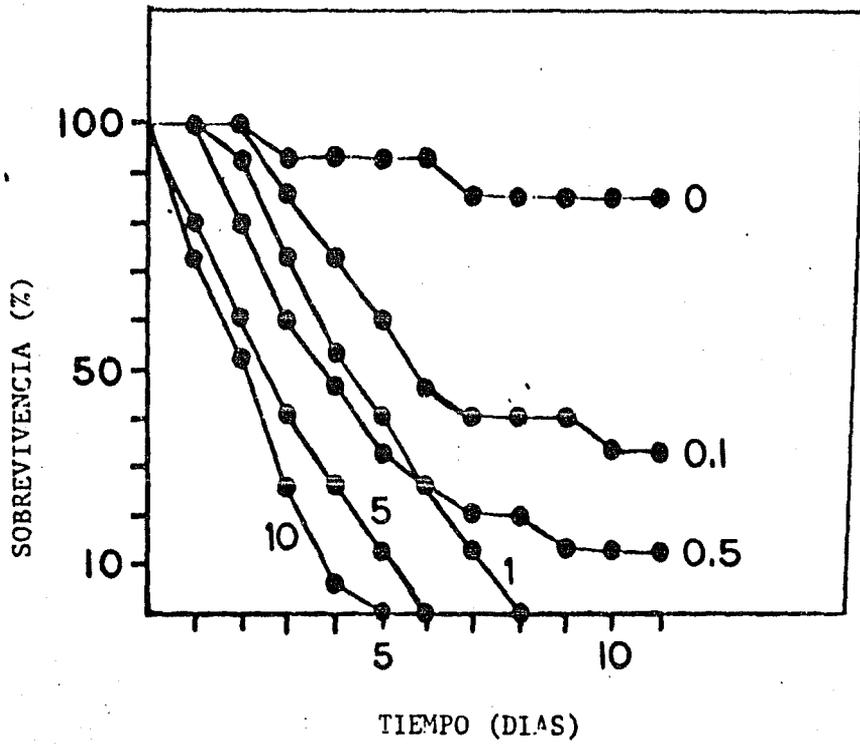
Gráfica 9 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-199  
 VARIEDAD darmastadiensis SOBRE Ephestia cautella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

Tabla XII.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-199 variedad darmastadiensis sobre Sitotroga cerealella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	100	100	100	100	80.0	73.3
2	100	100	93.3	80.0	60.0	53.3
3	93.3	86.6	73.3	60.0	40.0	26.6
4	93.3	73.3	53.3	46.6	26.6	6.6
5	93.3	60.0	40.0	33.3	13.3	0
6	93.3	46.6	26.6	26.6	0	
7	86.6	40.0	20.0	13.3		
8	86.6	40.0	20.0	13.3		
9	86.6	40.0	13.3	0		
10	86.6	33.3	13.3			
11	86.6	33.3	13.3			

\* Lote testigo



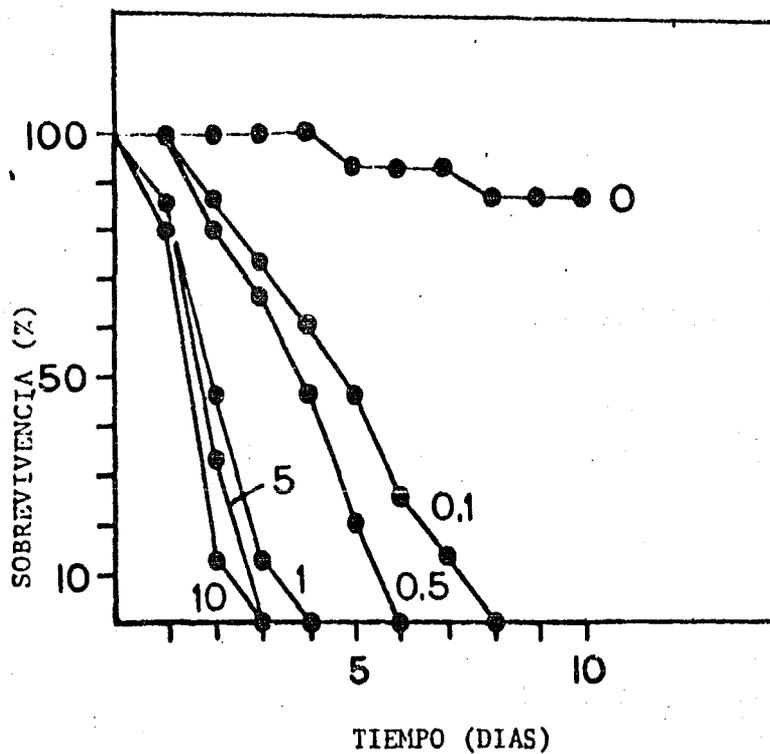
Gráfica 10 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-199  
 VARIEDAD darmastadiensis SOBRE Sitotroga cerealella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

Tabla XIII.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki sobre Ephestia cautella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	100	100	100	86.6	86.6	86.6
2	100	86.6	80.0	46.6	33.3	13.3
3	100	73.3	66.6	13.3	0	0
4	100	60.0	46.6	20.0		
5	93.3	46.6	20.0			
6	93.3	26.6	0			
7	93.3	13.3				
8	86.6	0				
9	86.6					

\* Lote testigo



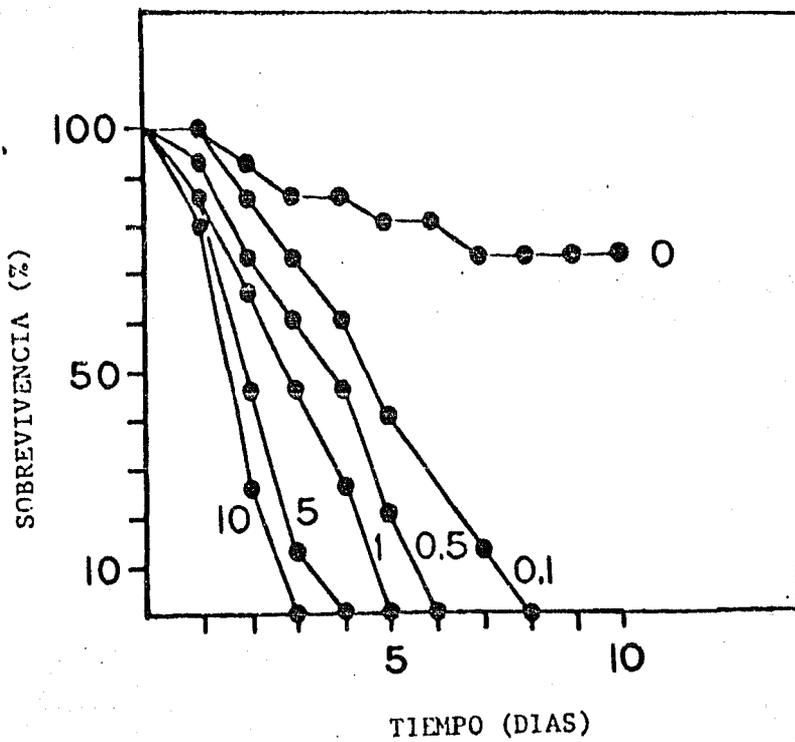
Gráfica 11 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-1  
 VARIEDAD kurstaki SOBRE Ephestia cautella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

Tabla XIV.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes concentraciones del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki sobre Sitotroga cerealella; se reporta % de sobrevivencia.

Concentración del complejo espora-cristal

Días	0*	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%	10.0%
1	100	100	93.3	86.6	86.6	80.0
2	93.3	86.6	73.3	66.6	46.6	26.6
3	86.6	73.3	60.0	46.6	13.3	0
4	86.6	60.0	46.6	26.6	0	
5	80.0	40.0	20.0	0		
6	80.0	13.3	0			
7	73.3	0				

\* Lote testigo



Gráfica 12 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-1  
 VARIEDAD kurstaki SOBRE Sitotroga cerealella.  
 SE PROBARON 5 DOSIS DIFERENTES.

En el caso de la prueba hecha con Sitotroga cerealella con Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki, la gráfica 12 representa los resultados, en la cual se observa como en el lote testigo (0) a los 7 días muere el 26.7% de las larvas, a los 30 días se observaron 10 adultos y a los 40 días se presentaron larvas de la segunda generación. La dosis de 0.1% llega a matar al 100% de las larvas en 8 días, la dosis de 0.5% en 6 días, la de 1% en 5 días, la de 5% en 4 y la de 10% en 3 días.

Al hacer una comparación de la susceptibilidad de las dos especies plaga de lepidópteros, a la acción entomopatógena de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki se nota que es semejante, al ser esta cepa la más potente para controlar las dos especies plaga, ya que aún con la concentración más baja de 0.1% se mata al 100% de las larvas de las dos especies. Debe hacerse notar que esta cepa fué aislada a partir de una preparación comercial DIPEL que actualmente México importa de los Estados Unidos y que con materia prima nacional se ha logrado cultivar en el laboratorio.

Una vez que se encontró la cepa más potente para el control de Ephestia cautella y Sitotroga cerealella, el siguiente paso fue encontrar la cantidad mínima necesaria de dosis para el control de las dos especies, de manera que fuera el bioinsecticida más económico. Como se mencionó anteriormente la cepa más potente para el control de ambas especies plaga, fue Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki y la dosis de 0.1% fué suficiente para proteger a 20 gs de maíz del ataque de 15 larvas. La prueba que se realizó para obtener la cantidad mínima necesaria de la dosis de 0.1% fué al variar la cantidad de la dosis, como se mencionó en los bioensayos anteriores se utilizaron 200 mg de dosis, en este último bioensayo se utilizaron las siguientes cantidades: 20, 40, 80, 160, 320, y 640 mg en cada lote experimental respectivamente.

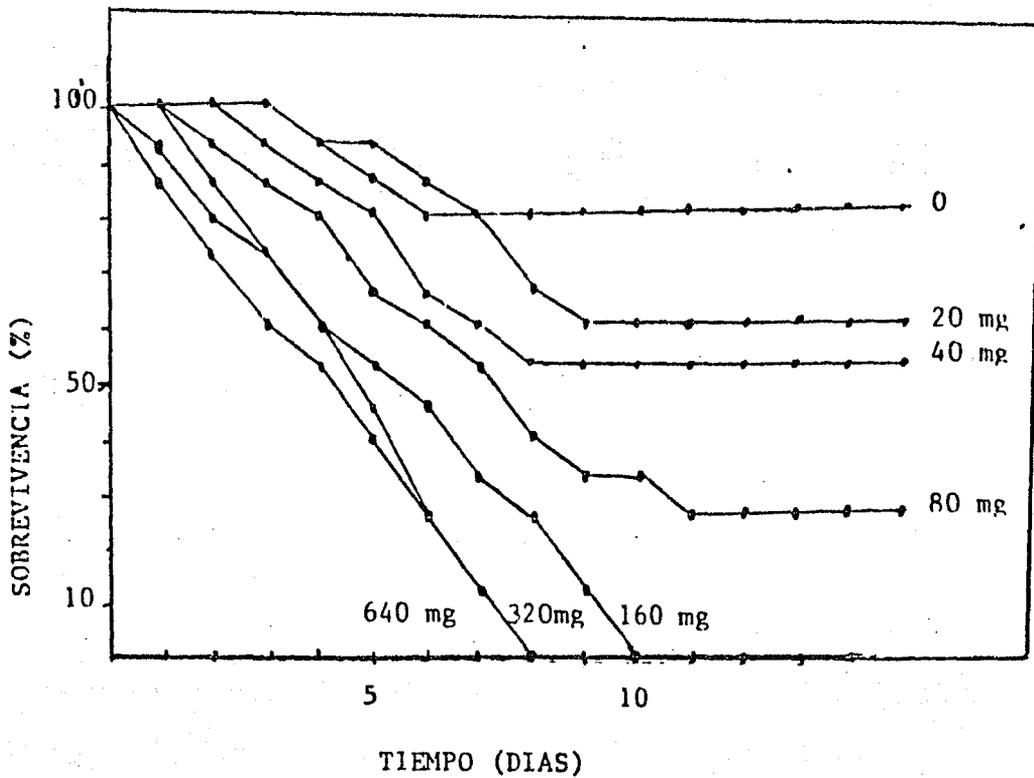
Esta prueba se realizó con larvas de Ephestia cautella y los resultados se muestran en la gráfica 13, en ella se observa el porcentaje de sobrevivencia respecto al tiempo, en el lote testigo (0) hay una mortandad del 20% a los 6 días, a los 30 días se observaron 10 adultos y a los 43 días se observaron larvas de la segunda generación. En el lote con la cantidad de 20 mg solo muere el 40% de de las larvas, en este lote quedaron 9 larvas de las cuales 8 llegaron al estado adulto y se encontraron larvas de la segunda generación. En el lote con 40 mg de la dosis de 0.1% murió el 47% de las larvas que corresponde a 7 organismos, los 8 restantes llegaron a estado adulto, en este lote también hubo

Tabla XV.- Resultados obtenidos en la prueba de toxicidad hecha con diferentes cantidades de la dosis 0.1% del complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki sobre Ephestia cautella; se reporta % de sobrevivencia.

Cantidades de la dosis 0.1% del complejo espora-cristal

Días	0*	20 mg	40 mg	80 mg	160 mg	360 mg	640 mg
1	100	100	100	100	100	93.3	86.6
2	100	100	100	93.3	86.6	80.0	73.3
3	93.3	100	93.3	86.6	73.3	73.3	60.0
4	86.6	93.3	86.6	80.0	60.0	60.0	53.3
5	80.0	93.3	80.0	66.6	53.3	46.6	40.0
6	80.0	86.6	66.6	60.0	46.6	26.6	26.6
7	80.0	80.0	60.0	53.3	33.3	13.3	13.3
8	80.0	66.6	53.3	40.0	26.6	0	0
9	80.0	60.0	53.3	33.3	13.3		
10	80.0	60.0	53.3	33.3	0		
11	80.0	60.0	53.3	26.6			
12	80.0	60.0	53.3	26.6			

\* Lote testigo



Gráfica 13 TOXICIDAD DE Bacillus thuringiensis CEPA HD-1  
 VARIEDAD kurstaki SOBRE Ephestia cautella.  
 SE PROBARON 6 CANTIDADES DIFERENTES DE LA  
 DOSIS 0.1%.

segunda generación como en el caso anterior. En base a esto se puede decir que 20 y 40 mg de la dosis de 0.1% son cantidades que no son suficientes para proteger 20 gm de maíz de la infestación de 15 larvas de Ephestia cautella.

En el lote que tenía 80 mg de formulación de 0.1% murieron 11 larvas en 11 días, y las 4 restantes llegaron a estado adulto, en este lote no hubo segunda generación. Esta cantidad es recomendada a usarse en lugares donde no haya infestación o está sea mínima o bien como medida profiláctica.

La cantidad de 160 mg de la dosis 0.1% fue la suficiente para proteger 20 gm de maíz del ataque de 15 larvas de Ephestia cautella ya que en 10 días murió el 100% de las larvas.

Las cantidades de 320 y 640 mg actuaron de manera semejante que en el caso anterior, al matar al 100% de las larvas en 8 días.

## V.-CONCLUSIONES

- 1.- El medio Holmberg, A. (1980) modificado por Rivera (1986), es favorable para la producción del complejo espora-cristal de las 4 cepas bacterianas de Bacillus thuringiensis utilizadas en la presente tesis.
- 2.- El complejo espora-cristal de las 4 cepas bacterianas probadas puede ser utilizado como bioinsecticidas para el control de Ephestia cautella y Sitotroga cerealella en granos almacenados.
- 3.- La cepa de Bacillus thuringiensis HD-1 variedad kurstaki es la que en menos tiempo mata un mayor número de larvas de las dos especies plaga al utilizar concentraciones muy bajas (0.1%).
- 4.- La cantidad mínima necesaria de dosis de Bacillus thuringiensis HD-1 para proteger una tonelada de maíz está al rededor 8 Kg en una concentración de 0.1%, lo que corresponde a 8 gm de complejo espora cristal.
- 5.- La producción del complejo espora-cristal de las 4 cepas utilizadas de Bacillus thuringiensis es factible a partir de materias primas nacionales de bajo costo.

## VI.-SUGERENCIAS

- 1.- Probar la eficacia de Bacillus thuringiensis para el control de Ephestia cautella y Sitotroga cerealella a gran escala.
- 2.- Investigar si Ephestia cautella y Sitotroga cerealella no desarrolla resistencia al control con Bacillus thuringiensis.
- 3.- Probar si Bacillus thuringiensis es capaz de controlar otras especies de lepidópteros plaga.
- 4.- Investigar otras especies del género Bacillus que puedan ser usadas como posibles bioinsecticidas.
- 5.- Probar Bacillus thuringiensis junto con dosis muy bajas de insecticida químico como control integrado de plagas.

## VII.-LITERATURA CITADA

- Andrews, E. R. and Bulla, A. L. (1976). Toxin of Sporeforming Bacteria. J. Invertebrate Path. 38:220-229.
- Aranda, H. E. (1987). Modelos de Predicción de Eventos Biológicos Para Plagas de Insectos. Problemas de Contaminación en México 2:4 p.8-10.
- Brian, L. (1981). Pests Control: but what price? New Scientist January 15:150-152.
- Brock, D.T. 1986. Basic Microbiology. Prentice-Hall USA p. 488-499.
- Bullá, L. A. (1976). Characterization of the Entomocidal Paraesporal Crystal of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol 130:(1): 375-383.
- Bugerjon, A. and Martouret, D. (1971). Determination and Significance of the Host Spectrum of Bacillus thuringiensis. In "Microbiol Control of the insects and mites" Burges, H. D. and Hussey. N.Y. Academic Press inc. London. p 305-326.
- Cotton, R. T. (1963). Pests of Stored Grain and Grain Products. Burgess Publishing Co. Minneapolis Minn. EUA. 318 pp.
- De Bach, P. (1968). Control Biológico de Plagas de Insectos y Malas Hierbas. CECSA. México. p.480-520.
- Dubnau, D. A. (1985). Molecular Biology of Bacilli. Academic Press Inc. 2:319-335.
- Erickson, J. R. (1974). Industrial Application of the Bacilli: A Review and Prospectus. Microbiol. Inmunol. 53:149-199.

- Falcon, L.A. (1971). Use of Bacteria for Microbial Control. In: Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press Inc. p.67-90.
- Fitz-James, F.C. (1960). Participation of the cytoplasmic membrane in growth and spore formation of Bacilli. J. Biophysic. Citol. 8:507-528.
- Guarino, R. G. (1980). Aspectos sobre el almacenamiento de granos en el medio rural en México. Memorias del Coloquio Internacional Sobre Conservación de Semillas y Granos Almacenados. Oaxtepec, Morelos.
- Hemipel, A. M., and Angus, T. A. (1958). The Taxonomy of insect pathogens related to Bacillus thuringiensis Franklan and Frankland. Can. J. Microbiol. 4:531-541.
- Hinton, H. E. and Corber, H. S. (1972). Common Insect Pests of Stored Food Products. A Guide to their Identification British Museum (Natural History). Economic Sciences. 15:61.
- Junko Nishiitsutzuji-Uwo and Yasuhisa Endo. (1981) Mode of Action of Bacillus thuringiensis, alfa-endotoxin. Appl. Ent. Zoo. 16(2):79-87.
- Kenword, M. (1981). Croop Protection without Chemical warfare. New Scientis, 2:312-322.
- Klug, M. S. (1984). Microbial Ecology. American Society for Microbiology. p. 397-410.
- Krebs, J. Ch. (1985). Ecología: Estudio de la Distribución y Abundancia. Harla, México, D.F. p. 397-410.
- Lecato, G. L. (1976). Yield Development and Weight of Cadra cautella (Walker) and Plodia interpuctella (Hubner) on Twentyone Diets Derived from Natural Products. J. Stored Prod. Res. 12:43-47.

- Lechtman, W. (1980). Microbiology. Macmillan Publishing Co. Inc. New York. p. 745-748.
- Loaiza, M. V. (1962). Biología y Pruebas Preliminares en el Combate de Ephestia cautella Naturaleza 3(5):22-35.
- Martínez, J. M. (1985). Los Plaguicidas y su uso en la conservación de granos. Memorias de las Conferencias del FUAL sobre granos almacenados. Universidad Nacional Autónoma de México.
- McLaughlin, A. (1971). Use of protozoos for Microbial Control of insects and Mites. Academic Press. p. 151-170.
- Mortimerp, S. R., Stolp, H., Trüper, G. H., Balows, A., Schlegel, G. H. (1981). The Procarvates: A Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Morfimer, Berlin: springer 2:1749-1751.
- Morales, C. B. y Magiola-Mundet, L. D. (1977). Efecto de cuatro pesticidas sobre la nitrificación del suelo en condiciones del altiplano boliviano. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 19:217-222.
- Ortiz, J. M. (1986). Las bacterias como una alternativa en el control de insectos en México. Tesina, especialidad en Biotecnología. Biomedicas UNAM.
- Poinar, G. O. (1971). Use of Nematodes for Microbial Control of Insects. In: Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press p. 181-201.
- Ramírez, M. M. (1980). Programa de investigación del insectario del Instituto de Biología de la UNAM sobre los sistemas de almacenamiento en México. Instituto de Biología de la UNAM. p. 30.

- Ramírez, M. M. (1981). Insectos y Almacenamiento de Granos. Naturaleza 12(2):92-102.
- Ramírez, M. M. (1986). Biología e Identificación de plagas de Granos Almacenados. Memorias del Programa Universitario de Alimentos (PUAL) UNAM.
- Rivera, J. L. (1986). Producción y ensayo de Bacillus thuringiensis como agente entomopatógeno. Tesis Licenciatura Facultad de Ciencias UNAM.
- Stairs, G. R. (1971). Use of Virus for Microbial Control of insects. In: Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, N.Y. p. 91-122.
- Stanier, Y. R., Ingraham, L. J., Wheelis, L. M., Painter, R. F. (1986). The Microbial World. Prentice-Hall New Jersey p. 475-485.
- Turk, A. T. y Wittes, J. R. (1976). Tratado de Ecología. Interamericana. México. p 209-230.
- Velázquez, C. A. (1983). Almacenamiento y Conservación de Productos Agrícolas en Almacenes Nacionales de Depósito, S. A. (ANDSA). Memorias del Coloquio Internacional Sobre Conservación de Semillas y Granos Almacenados. Instituto de Biología UNAM. México. México, p. s/numerar.
- Wilkinson, L. F. (1976). Insecticide Biochemistry and Physiology. Plenum Press N.Y. and London p. 682-683.
- William and Wilkins. (1974). Bergey's Manual of determinative Bacteriology. Waverly Press, Inc. Baltimor USA. p. 330-335.
- Yendol, G. W. and Roberts, D. W. (1971). Use of Fungi for Microbial Control of insects and Mites. Academic Press. p. 488-499.