

40
207

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

Bacillus thuringiensis EN EL CONTROL BIOLÓGICO
DE INSECTOS: FITOPATOGENOS Y VECTORES
DE AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSANTES DE
ENFERMEDADES HUMANAS

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA:
ALICIA FLORES BANDA**



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



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.

Jurado asignado:

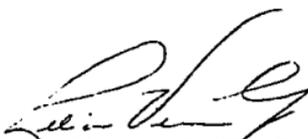
Presidente	Prof. LILIA VIERNA GARCIA
Vocal	Prof. JORGE SOTO SORIA
Secretario	Prof. BEATRIZ LUNA MILLAN
1er. suplente	Prof. MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA
2do. suplente	Prof. HORTENSIA EUGENIA LEMUS DIAZ

Sitio donde se desarrolló el tema.

Diversas bibliotecas:

Facultad de Química, UNAM;
Instituto de Biología, UNAM;
Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados, IPN; y
Biblioteca Agrícola Nacional.

Asesor.



Q. LILIA VIERNA GARCIA

Sustentante.



ALICIA FLORES BANDA



DEDICATORIA

A mi hija

Yael Alejandra

**¡ Por ser el mensaje viviente mas hermoso que
Dios me ha dado, inspirado en el amor, en la
alegría, en la paz y en la fuerza que me
impulsa a lograr mis metas !**

AGRADECIMIENTOS

A Dios

¡ Por haberme permitido llegar a una de las metas más anheladas en mi vida !

A mis padres

Enrique y Carlota

¡ Por el gran apoyo que me dieron durante mi formación profesional !

A mis hermanos

Enrique
Jesús Manuel
Luis Emilio
Oscar
Carlos Erick
Teresa
Martha Patricia
y
Silvia Elena

¡ Por todos los momentos felices que hemos vivido, por su apoyo, por nuestra amistad y porque mis logros son también de ustedes !

A mis maestros

Q. Lilia Vierna García
Q. F. B. Beatriz Luna Millan
Q. B. P. Jorge Soto Soria

¡ Por su colaboración en la revisión de este trabajo; a ellos con admiración y respeto; y a todos los que me han dado la oportunidad de aprender y saber un poco más!

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Historia.....	2
2. GENERALIDADES	4
2.1. Ubicación taxonómica.....	4
2.2. Hábitat.....	4
2.3. Modelo fenotípico general de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.3.1. Características comunes.....	6
2.3.2. Características diferenciales.....	7
3. CLASIFICACION DE LAS CEPAS.....	10
3.1. Algunos aislamientos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.....	15
4.1. Caracterización de las protoxinas y de los cristales polipeptídicos..	15
4.2. Modo de acción de la δ -endotoxina.....	21
4.3. Susceptibilidad de las larvas a la δ -endotoxina.....	21
5. PLASMIDOS ASOCIADOS A LA PRODUCCION DE DELTA-ENDOTOXINA	27
6. PRODUCCION MASIVA DEL <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
6.1. Principales factores a controlar en el proceso de fermentación.....	35
6.2. Inconvenientes que se presentan en el periodo de fermentación.....	36
6.3. Algunos medios de cultivo propuestos para una mejor producción..	37
6.4. Evaluación de toxicidad.....	39
6.5. Agentes ambientales que afectan la efectividad y persistencia de la bacteria.....	40

7.	USOS Y APLICACIONES.....	46
7.1.	Aspecto agrícola.....	49
7.1.1.	Importancia de las plagas agrícolas.....	49
7.1.2.	Toxicología de <i>Bacillus thuringiensis</i> y su interacción con otros agentes de control de insectos plaga.....	51
7.2.	Aspecto forestal.....	57
7.2.1.	Importancia de las plagas forestales.....	57
7.2.2.	Toxicología de <i>Bacillus thuringiensis</i> y su interacción con otros agentes de control de insectos plaga.....	61
7.3.	Aspecto médico.....	67
7.3.1.	Importancia de los artrópodos de interés médico.....	67
7.3.2.	Toxicología de <i>Bacillus thuringiensis</i> y su interacción con otros agentes de control de insectos vectores de enfermedades humanas.....	69
8.	DISCUSION.....	75
9.	CONCLUSIONES Y COMENTARIOS.....	83
10.	LITERATURA CONSULTADA.....	85

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Identificación de <i>Bacillus</i> Spp.....	5
2	Caracterización bioquímica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8 - 9
3	Clasificación de las cepas del <i>Bacillus thuringiensis</i>	11-12
4	Morfología de inclusiones cristalinas de algunas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
5	Propiedades de los cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
6	Correlación entre plásmidos específicos y producción de δ -endotoxina en varias cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
7	Usos del <i>Bacillus thuringiensis</i>	47 - 48
8	Plagas de lepidópteros y coleópteros más comunes y de gran importancia en el país.....	50
9	Superficies forestales afectadas por descor- tezadores y defoliadores.....	59
10	Complejo de descortezadores de gran importancia en el país.....	60
11	Distribución de la superficie forestal.....	60
12	Insectos fitopatógenos controlados con el insecticida biológico Dipel (<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> variedad <i>kurstaki</i>).....	65-66
13	Enfermedades importantes en el país transmitidas al hombre por insectos vectores.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Micrografía electrónica del <i>Bacillus thuringiensis</i> Subespecie <i>kurstaki</i>	20
2	Micrografía electrónica del <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>finitimus</i>	20
3	Secuencia de eventos asociados al control de larvas con <i>Bacillus thuringiensis</i> (Dipel).....	25
4	Diagrama de flujo para fermentaciones sumergidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34

RESUMEN

La bacteria Bacillus thuringiensis es capaz de sintetizar durante el periodo de esporulación, un gran cristal parasporal que contiene uno o más polipéptidos. Este cristal proteínico, llamado δ -endotoxina, es letal para muchas larvas de insectos; razón por la cual es usado comercialmente como un pesticida ; considerado de tipo biológico , al producir proteínas tóxicas siendo un organismo vivo; pero debido a su modo de acción, se relaciona con los insecticidas químicos, representando la aplicación de un insecticida no vivo con efectos de veneno estomacal, así como falta de persistencia y dependencia en el campo. Sin embargo las proteínas tóxicas del Bacillus thuringiensis presentan ciertas ventajas sobre los insecticidas químicos, debido a que son altamente específicas para larvas de lepidópteros, dípteros, y algunos coleópteros; no producen efectos nocivos en otras formas de vida y son biodegradables.

Con base en lo anterior y considerando los reportes de la actividad nociva de las plagas agrícolas, forestales, y de los insectos vectores causantes de enfermedades humanas, así como el empleo intensivo y desmedido de los insecticidas químicos, los cuales ocasionan graves problemas, como son: acumulación de residuos tóxicos en los alimentos, en los suelos, y en algunas aguas expuestas a su aplicación; generando un fuerte impacto ecológico al afectar: la flora, la fauna, la microfauna del suelo, la vida acuática, y como consecuencia al hombre; además de contribuir al incremento de la contaminación ambiental. Se sitúa por lo tanto, al control biológico mediante Bacillus thuringiensis, como una opción más en la búsqueda de soluciones a estos problemas.

El objetivo del presente trabajo, consiste en describir algunos avances en el control biológico utilizando al Bacillus thuringiensis en los aspectos: agropecuario, forestal. y médico; con el fin de conocer nuevas metodologías que permitan contribuir a la extensión de su aplicación en nuestro país como una alternativa en el control de insectos plaga.

I. INTRODUCCION

Bacillus thuringiensis es una bacteria patógena para larvas de más de 100 especies de lepidópteros y algunas subespecies son tóxicas para ciertos dípteros y coleópteros (Whiteley y Schnepf, 1986). Dentro de las bacterias entomopatógenas el Bacillus thuringiensis ocupa un lugar muy importante ya que fue seleccionado por la industria como el primer patógeno para ser ampliamente explotado y como un agente manipulado del control biológico debido a sus características que lo hacían ser aceptable para la adaptación en un gran número de programas de control de insectos (Hall, 1975).

El control biológico desde el punto de vista de su aplicación, es la utilización de aquellos organismos que en forma natural regulan la población de insectos que constituyen potencialmente una plaga (DeBach, 1964 citado por Rodríguez, 1990). Cuando se utilizan dos o más métodos de control de especies plaga (biológico, químico, mecánico, etc.) en forma conjunta, se habla de un control integral (Morón y Terrón, 1988).

La importancia del control biológico con el Bacillus thuringiensis. se basa en las ventajas que presenta sobre el uso de insecticidas químicos: no contribuye a la contaminación ambiental, los insectos plaga no adquieren resistencia a este método. no inhibe el crecimiento de las plantas, no origina acumulación de residuos tóxicos en alimentos y no produce efectos adversos en el hombre, y otros mamíferos, es inofensivo para aves, peces, e insectos polinizadores. Presentando el récord de seguridad más extenso en cuanto a salud pública (De Barjac, 1984; Valenzuela, 1980).

El Bacillus thuringiensis, es producido a gran escala en muchos países; y ha sido presentado con diferentes nombres comerciales, tales como: Dipel, Thuricide, Biotrol, Biospor, Bactospeine, etc ; (Bulla y Yousten, 1979). El ingrediente activo de estos productos comerciales, está basado en toxinas polipeptídicas, designadas como δ -endotoxina, producidas por la bacteria como inclusiones cristalinas amorfas (Hernstadt et al., 1988).

1.1. Historia

Pasteur (1878), observó que la bacteria Bacillus bombycis, producía la flacheria del gusano de seda; con base en datos obtenidos posteriormente por algunos científicos, se ha supuesto que se trataba de una bacteria cristalífera.

A Ishiwata (1901), Japón., se le atribuye el descubrimiento del Bacillus thuringiensis, a partir de larvas enfermas del gusano de seda, al aislar un bacilo cristalífero; al cual se le nombró: Bacillus sotto Ishiwata.

Berliner (1911), en Thuringia; Alemania. Realiza la primera descripción válida de una bacteria cristalífera obtenida de larvas enfermas de la palomilla de la harina del mediterráneo (Anagasta kuehniella). Esta bacteria fue llamada: Bacillus thuringiensis Berliner.

Toumanoff y Vago (1951), reportaron una bacteria a la cual llamaron Bacillus cereus alesti, mencionando que era el agente causante de la flachería del gusano de seda. Posteriormente se comprobó que se trataba de una bacteria cristalífera.

Steinhaus y Jerrel (1954), observaron que estas tres especies de bacterias formadoras de esporas presentaban relación entre sí; distinguiéndose de Bacillus cereus, por la inclusión cristalina en su esporangio.

Heimpel y Angus (1958), propusieron que las bacterias cristalíferas se designaran como variedades de Bacillus thuringiensis: Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis, Bacillus Thuringiensis variedad sotto, y Bacillus thuringiensis variedad alesti.

2. GENERALIDADES

Bacillus thuringiensis es una bacteria formadora de endosporas, Gram-positiva, semejante a Bacillus cereus, distinguiéndose por su habilidad de sintetizar inclusiones cristalinas durante la esporulación, por su patogenicidad característica hacia los insectos y por otras diferencias físicas menores (DeBach, 1975; Whiteley *et al.*, 1984).

2.1. Ubicación taxonómica

La especie Bacillus thuringiensis está clasificada dentro de la familia Bacillaceae, e incluida en el género Bacillus del grupo 1, citado en la octava edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Gibson y Gordon, 1974).

2.2. Hábitat

El hábitat natural de las cepas de Bacillus thuringiensis es el medio ambiente y diferentes tipos de suelos, incluyendo de estanques o riberas de corrientes, encontrándose también en larvas infectadas; su distribución es cosmopolita (De Barjac, 1984; Howard 1987).

Cuadro 1. Identificación de *Bacillus* Spp

5

GRUPO I	Diámetro celular (μm)	Pericelina (10 unidades)	Movilidad	Extensión de la zona de lecitinas	Hemólisis Beta	Dilatación de las esporas celulares	Voges-Proskauer	Reducción de nitrato	Almidón	Características diferenciales
<i>B. anthracis</i>	≥ 0.9	S	O	27	-	-	85	100		Produce cápsula
<i>B. cereus</i>	≥ 0.9	R	99	100	+	-	84	89		
<i>B. mycoides</i>	≥ 0.9	R	63	100	-	-	50	100		Colonias rizoides
<i>B. megaterium</i>	≥ 0.9	V	42	0	-	-	0	10		
GRUPO II										
<i>B. subtilis</i>	< 0.9	S	84	-	V	-	71	89	80	
<i>B. pumilus</i>	< 0.9	S	100	-	V	-	78	0	6	
<i>B. teichiniformis</i>	< 0.9	S	80	-	+	-	83	100	100	
<i>B. firmus</i>	< 0.9	S	90	-	V	-	0	70	50	
<i>B. coagulans</i>	< 0.9	S	+	-	V	-	V	0		Crece a 55 y 35°C
GRUPO III										
<i>B. circulans</i>	< 0.9		+	-	-	+	6	76		Colonias emigrantes sobre agar.
<i>B. sphaericus</i>	< 0.9		+	-	-	+	0	26		Produce esporas esféricas
<i>B. laterosporus</i>	< 0.9		+	V	-	+	0	90		Produce esporas en forma de conos.
<i>B. brevis</i>	< 0.9		+	-	-	+	-	26		
<i>B. polymyxa</i>	< 0.9		+	-	-	+	100	0		
<i>B. alvei</i> (H,S+Bacillus)	< 0.9		+	-	V	+	V	+		
<i>B. stearothermophilus</i>	< 0.9		+	-	-	+	V	0		Crece a 65°C; no crece a 35°C.

Howard (1987).

Pruebas con resultados mayores a 90% de positividad se consideran positivas (+); pruebas con resultados menores al 10% de positividad se consideran negativas (-); pruebas entre 10 y 90% de positividad se consideran variables (V); S = sensible; R = resistente; los porcentajes mencionados han sido determinados.

2.3. Modelo fenotípico general de cepas de *Bacillus thuringiensis*

2.3.1. Características comunes

- ◊ Anaerobios facultativos, crecen en agar nutritivo a pH de 6, sobre caldo nutritivo + 7% de NaCl W/V (peso/volumen), y sobre medios de KCN (Brown);
- ◊ no crecen en medios de citrato (Simmons);
- ◊ producción de ácido en caldos anaeróbicos + 1% de glucosa W/V;
- ◊ producción de gas a partir de nitratos en condiciones anaeróbicas;
- ◊ producción de nitritos a partir de nitratos en caldos aeróbicos (Tipo nitrato reductasa);
- ◊ rojo de metilo positivo, pruebas de hemólisis y RNAsa positivas;
- ◊ reacción de fermentación sobre medio de Hugh-Leifson's + glucosa;
- ◊ producción de ácido en medios base + ribosa, glucosa, fructosa, maltosa, trealosa, glicerol, ó almidón soluble;
- ◊ no presentan producción de: indol, H₂S, oxidasa, tetrionato-reductasa, fenilalanina-deaminasa, triptofano-deaminasa, ornitina-descarboxilasa, lisina-descarboxilasa, fenilalanina-descarboxilasa, β -xilosidasa, α - fucosidasa, α -manosidasa;
- ◊ no actúan sobre pectina, no producen ácidos en medios conteniendo arabinosa, o xilosa, galactosa, ramosa, sorbosa, lactosa, rafinosa, melibiosa, critritol, adonitol, manatol, dulcitol, sorbitol, m-inositol, amigdalina, inulina, ó α -metil-glucósido.

2.3.2. Características diferenciales

De acuerdo a las cepas, existen diferencias de reacción sobre:

- ◊ Producción de acetilmetilcarbinol, lecitinasa, ureasa, β -galactosidasa, DNAsa, lipasa, arginina-dihidrolasa;
- ◊ hidrólisis de esculina, quitina, agar almidón, agar caseína, agar gelatina, capacidad de coagulación de proteínas en el medio litmus milk;
- ◊ formación de película en la superficie de caldos y pigmentos sobre papas;
- ◊ producción de ácidos en medio base con manosa, o sacarosa, o celobiosa, o salicina;
- ◊ producción de una exotoxina estable al calor;
- ◊ especificidad de los antígenos flagelares (H).

Cuadro 2. Caracterización bioquímica de *Bacillus thuringiensis*

		Serovariedades				
AMC+ Lecitinasa +	Ureasa+ ADH+	Manosa+	Entre esterasas+	THO, COR		
			Entre esterasas -	TOU		
		Manosa-	Citrato+	JAP		
			Citrato -	KUR, KEN, AIZ.		
	Ureasa - ADH -	DNAsa (a) Agar almidón (b) Película (a)		FIN	
			DNAsa - Agar almidón + Película -	Celobiosa+		
				Celobiosa (b)	SOT	
		Manosa+ Sacarosa+	Película+	THU, SHA		
			Película -	IND, KUM, MEX		
		Manosa+ Sacarosa -		OST	
			Salicina -	DAK		
		Ureasa - ADH +	Manosa - Sacarosa+	Salicina+	β-Gal+	NEO
					DNAsa+	PON
					Entre esterasas -	
			DNAsa+	TOC		
			Entre esterasas (a)			
		β-Gal-	TOL			
		DNAsa -	TOL			
		Película (a)				
		DNAsa -	NIG, CAN,			
		Película -	PAG, COL.			
		Coagulación de suero+ Pigmento (b)	ISR			
		Entre esterasas+ Salicina (b) Coagulación de suero- Pigmento (a)	ALE			
		Manosa- Sacarosa (b)				
		Entre esterasas+ Salicina (b) Coagulación de suero+ Pigmento -	KIU, SIL			
		Entre esterasas (b) Salicina+				

Cuadro 2. Continuación ...

				Serovariedades	
AMC+ Lecitinasa-	Ureasa+	ADH+	Salicina+ Oxidasa+ Pigmento+ Salicina (b) Oxidasa- Pigmento-GAL	
			DAR	
	Ureasa -			ADH-YUN
				MOR
AMC- Lecitinasa-	ADH+ Pellicula+ Celobiosa -		THO	
	ADH- Pellicula- Celobiosa+		ENT	
AMC (b) Lecitinasa (a)	ADH+ Pellicula (a)		SUIB	

De Barjac y Frachon (1990)

Las serovariedades son designadas por sus tres primeras letras: THU = thuringiensis, FIN = finitinus; (revisar el cuadro 3).

AMC = acetil-metil-carbinol; ADH = arginina-dihidrolasa.

Resultados entre 0 y 9% de positividad se consideran negativos (-); entre 10 y 49% de positividad se consideran bajos (b); entre 50 y 89% de positividad se consideran moderados (a); entre 90 y 100% de positividad se consideran positivos (+).

3. CLASIFICACION DE LAS CEPAS

La clasificación de las cepas del *Bacillus thuringiensis* se apoya en criterios fenotípicos y serológicos. Las caracterizaciones morfológicas y bioquímicas se han usado en paralelo con la serotipificación, como técnicas auxiliares; mediante un análisis computarizado de 80 características fenotípicas de 1600 aislamientos de *Bacillus thuringiensis*; se pudo demostrar la existencia de obvias faltas de correlación entre las características bioquímicas de los 27 serotipos H ó 34 serovariedades, en algunas reacciones que difirieron por alguna variable característica. Por lo cual se ha determinado que las pruebas bioquímicas comunes no tienen valor como un criterio exclusivo para la diferenciación de cepas del *Bacillus thuringiensis*.(De Barjac y Frachon, 1990).

Otros accesos a la clasificación de las cepas del *Bacillus thuringiensis*, son citados por los mismos autores:

- ◊ Tipificación por fagos: basada en la susceptibilidad de las cepas del *Bacillus thuringiensis* a diferentes bacteriófagos;
- ◊ Modelo de esterasas de células vegetativas (Norris, 1964);
- ◊ Serología del cristal (Pendleton y Morrison, 1967; Krywiencyky y Angus, (1985);
- ◊ Modelo de plásmidos (Lereclus et al., 1982);
- ◊ Multilocus de electroforesis enzimática (Selander et al., 1986),
- ◊ Secuenciación de DNA: estudios basados en la caracterización de diferentes tipos de

Cuadro 3. Clasificación de las cepas del *Bacillus thuringiensis*

Antígeno H	Serovariedad	Abreviación	Primera identificación y primera descripción válida
1	thuringiensis	THU	Berliner, 1915; Heimpel y Angus 1958;
2	finitimus	FIN	Heimpel y Angus, 1958;
3a	alexii	ALE	Toumanoff y Vago, 1951; Heimpel y Angus, 1958;
3a3b	kurstaki	KUR	De Barjac y Lemille, 1970;
4a4b	sotto	SOT	Ishiwata, 1905; Heimpel y Angus, 1958;
4a4c	kenyae	KEN	Bonnefoi y De Barjac, 1963;
5a5b	galleriae	GAL	Shvetsova, 1959; De Barjac y Bonnefoi, 1962;
5a5c	canadensis	CAN	De Barjac y Bonnefoi, 1972;
6	entomocidus	ENT	Heimpel y Angus, 1958;
7	aizawai	AIZ	Bonnefoi y De Barjac, 1963;
8a8b	morrisoni	MOR	Bonnefoi y De Barjac, 1963;
8a8c	ostrinae	OST	Gaixin, Ketian, Minghua y Wingmin, 1975;
8b8d	nigeriensis	NIG	De Barjac, Frachon, Rajagopalan y Cosmao, no publicado;
9	totivorthi	TOL	Norris, 1964; De Barjac y Bonnefoi, 1968;
10	damstadiensis	DAR	Krieg, De Barjac y Bonnefoi, 1968;
11a11b	toumanoffi	TOU	Krieg, 1969;
11a11c	kyushuensis	KYU	Ohba y Aizawa, 1979;
12	thompsoni	THO	De Barjac y Thompson, 1970;
13	pakistanii	PAK	De Barjac, Cosmao y Shaik y Viviani, 1977;
14	israelensis	ISR	De Barjac, 1978;
15	dakota	DAK	De Lucca, Simonson y Larson, 1979;
16	indiana	IND	De Lucca, Simonson y Larson, 1979;

Cuadro 3. Continuación ...			
Antígeno H	Serovariedad	Abreviación	Primera identificación y primera descripción válida
17	tohokuensis	TOH	Ohba, Aizawa y Shimizu, 1981;
18	kumamotoensis	KUM	Ohba, Ono , Aizawa e Iwanami, 1981:
19	tochigiensis	TOC	Ohba, Ono, Aizawa e Iwanami, 1981;
20a20b	yunnanensis	YUN	Wan-yu, Qui-fang, Xue-ping y You-wei, 1979;
20a20c	pondicheriensis	PON	De Barjac, Franchon , Rajagopalan y Cosmao, no publicado.
21	colmeri	COL	De Lucca, Palmgren y De Barjac, 1984;
22	shandongensis	SHA	Ying, Jie y Xichang, 1986;
23	japonensis	JAP	Ohba y Aizawa, 1986;
24	neoleonensis	NEO	Rodriguez-Padilla, Galan-Wong, De Barjac, Dulmage, Tamez-Guerra y Roman Calderon, 1988;
25	coreanensis	COR	De Barjac y Lee, no publicado.
26	silu	SIL	De Barjac y Lecadet, no publicado.
27	mexicanensis	MEX	Rodriguez-Padilla y Galan-Wong , 1988.

De Barjac y Frachon (1990)

genes del cristal proteínico (Kronstand y Whiteley, 1986); y

o uso de pruebas de DNA específico (Visser, 1989) o de anticuerpos monoclonales (Hoffe et al. 1988), para la identificación de genes semejantes en los nuevos aislamientos.

Mencionando finalmente que estas técnicas proporcionan comparación de cepas y patogenicidad relativa; situando por lo tanto a la determinación serológica, como alto dato prioritario para una práctica estable en la clasificación de las cepas del *Bacillus thuringiensis*.

Bagci et al. (1991) en Ankara, Turquía, reportan un estudio de susceptibilidad con 27 variedades de *Bacillus thuringiensis* a 22 diferentes antibióticos; mencionando que en conformidad con los métodos de clasificación numérica taxonómica se determinaron 27 serovariedades de *Bacillus thuringiensis* clasificadas dentro de 9 grupos.

3.1. Algunos aislamientos de *Bacillus thuringiensis*

Ordaz et al. (1992) citan un nuevo serotipo de *Bacillus thuringiensis* tóxico para mosquitos: *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, *Aedes aegypti*, y *Anopheles stephensi*; aislado a partir de larvas; con gran similitud a las referencias del *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*, con producción negativa de exotoxina estable al calor, con resultados positivos para la producción de enzimas como: catalasa, ureasa, arginina-dihidrolasa, amilasa, lecitinasa, y gelatinasa; así como de acetil-metil-carbinol. Presentando hemólisis- α , en agar sangre de carnero; sometido a pruebas de sensibilidad a antibióticos y aglutinación flagelar, así como especificidad al antígeno H-30; por lo cual la cepa se individualizó con el nombre de Medellín para la subespecie.

Ohba *et al.* (1992) reportan el aislamiento de una bacteria formadora de esporas, a partir del suelo en Japón; identificada como *Bacillus thuringiensis* serovariedad *japonensis* (antígeno flagelar 23). Mencionando que las inclusiones parasporales de este aislamiento, fueron de forma esférica y ovoide. Presentando alta actividad larvicida contra determinadas especies de coleópteros; señalando también que esta bacteria no fue tóxica para larvas de lepidópteros, dípteros, y orthópteros.

Cidaria *et al.* (1991) mencionan el aislamiento en Novara, Italia; de una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* (codificada como: NCIMB 40162). A partir de larvas muertas de la especie de insecto *Tenebrio molitor*, con actividad insecticida para coleópteros, indicando que el cultivo fué diferenciado de otras cepas de *Bacillus thuringiensis* activas contra la misma especie de insectos mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas, serotipo flagelar, y modelo electroforético de toxinas.

Whitlock *et al.* (1990) reportan dos nuevos aislamientos de *Bacillus thuringiensis* patógenos para *Spodóptera litura* (gusano cortador del tabaco) en Taipei, Taiwan.

Asimeg y Mutinga (1991) reportan el aislamiento de una bacteria tóxica para mosquitos, en Kenia. Mencionando que las bacterias aisladas presentaron características estructurales comunes: Gram-positivas, formadoras de esporas, bacilos productores de inclusiones parasporales con actividad larvicida contra mosquitos: *Anopheles*, *Culex*, y *Aedes*; identificando a estos aislamientos como variedades de *Bacillus thuringiensis*.

4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Los mecanismos de patogenicidad de *Bacillus thuringiensis* están basados en la producción de más de una sustancia tóxica (Aronson et al., 1986). Las cuales son liberadas en el medio de cultivo durante el ciclo de crecimiento (De Barjac, 1984).

Entre estas sustancias, las de mayor potencial tóxico son mencionadas a continuación:

◊ α -exotoxina, es soluble en agua y termosensible; conocida como: C-lecitinasa, exotoxina termosensible ó factor ratón por su patogenicidad característica;

◊ β -exotoxina, también llamada thuringiensina, es soluble en agua, termoestable, químicamente ha sido definida como un nucleótido de adenina análogo al ATP; excretada dentro del medio durante el crecimiento exponencial pero no producida por todos los cultivos. Presenta algunos efectos tóxicos sobre aves y mamíferos, así como en insectos especialmente cuando son inyectados;

◊ δ -endotoxina, es la toxina de mayor interés que confiere la actividad larvicida al *Bacillus thuringiensis*, se encuentra contenida en el cristal proteínico parasporal, es sensible a la temperatura y soluble en soluciones alcalinas.

(Aronson et al., 1986; Roth, 1990)

4.1. Caracterización de las protoxinas y de los cristales polipeptídicos

Los cristales del tipo K-1 del *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*, contienen dos distintas protoxinas, una mayor (δ -endotoxina o P1) con actividad tóxica para lepidópteros; y una protoxina menor (P2) activa sobre dípteros y lepidópteros. Este tipo

de cristales (K-1) pueden estar presentes en otras subespecies de *Bacillus thuringiensis*. Las inclusiones cristalinas con polipéptidos de 130 a 140 Kilodaltons (δ -endotoxina o P1) predominan en la mayoría de las subespecies del *Bacillus thuringiensis*; presentando variaciones en el número, forma, y composición química; en la mayoría de los casos, el cristal proteínico se localiza en el exterior del exosporio, con excepciones como en el caso de la subespecie *finitimus*, donde el cristal, parece tener una estrecha asociación al exosporio; en otros casos la formación del cristal, no ocurre precisamente cerrada al exosporio. Una clase distinta de inclusiones parasporales se fundamenta en el *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*, presentando generalmente 2 ó 4 inclusiones por célula que varían en su forma, con un tamaño relativamente pequeño (Aronson et al., 1986).

Haider y Mahmood (1990) realizaron un análisis comparativo de la actividad de espectro de 13 cepas pertenecientes a 7 serotipos tóxicos para tres especies de insectos. Los cristales de la δ -endotoxina de estas cepas fueron purificados y su composición polipeptídica fué analizada mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio). La δ -endotoxina de cada una de las cepas estudiadas consistió en una variedad de cristales proteínicos con un tamaño entre 60-144 Kilodaltons (KDa). Sobre las bases de masa molecular (M_r), las endotoxinas fueron agrupadas en dos clases: la primera, fué compuesta por proteínas de alta M_r (125-144 KDa, P1) y por proteínas de M_r media (60-66 KDa, P2); la segunda se integró únicamente por polipéptidos de alta M_r . El análisis inmunoabsorbente con el antisuero del *Bacillus thuringiensis* variedad *aizawai*, P1; reveló reacciones cruzadas con los polipéptidos de 125- 144 KDa de todas las cepas estudiadas. El antisuero del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*, P2; no presentó reacciones cruzadas con las proteínas P1 de las cepas; pero sí, con aquellas de

estructura homóloga a la clase de polipéptidos P2 (66 KDa). Sugiriendo este análisis, que las proteínas P1 Y P2 no están estructuralmente relacionadas.

Los estudios de toxicidad revelaron que las proteínas de alta Mr, P1; de todas las cepas estudiadas, fueron activas contra larvas de lepidópteros (*Pieris brassicae* y *Diacrisia obliqua*). Las cepas del *Bacillus thuringiensis aizawai*, presentaron una doble toxicidad asociada a las proteínas de alta Mr (130-135 KDa, P1); los cristales proteínicos, P2 (60-66 KDa) también presentaron doble actividad tóxica contra larvas de lepidópteros y dípteros. Concluyendo que estos dos tipos de proteínas (P1 y P2), difieren: en forma estructural e inmunológicamente.

Cuadro 4. Morfología de inclusiones cristalinas de algunas cepas de *B. thuringiensis*

Cepa	Antígeno H	Cristal		
		Forma	Largo aprox. (μm)	Sitio de deposición
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , P1 (δ -endotoxina)	$\beta\text{a}, \beta\text{b}$	Bipiramidal	1-1.5	Fuera del exosporio
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , P2 (Factor mosquitocida)	$\beta\text{a}, \beta\text{b}$	Cuboidal	0.1-0.4	Fuera del exosporio
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	14	Cuboide, bipiramidal, ovoide o amorfo	0.1-0.5	Fuera del exosporio
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	2	Bipiramidal	1-1.5	Dentro del exosporio

Aronson et al (1986)

Cuadro 5. Propiedades de los cristales de *Bacillus thuringiensis*

	Lepidópteros	Dípteros	"Factor mosquitocida"	Coleópteros
Forma del cristal	Bipiramidal	Amorfo multicomponente	Cuboidal	Cuadrado plano
Números de péptidos	1, 2 6 3	3 más péptidos menores	I	I
Tamaño de los péptidos en KDa	~130 a 160	-130, 65, 27	- 65	- 64
Toxicidad larval	Muchos Lepidópteros	Mosquitos y voladores negros	Mosquitos y lepidópteros	Coleópteros
Subespecies	Varias subespecies	<i>israelensis</i>	<i>kurstaki</i> <i>thuringiensis</i> <i>kenyae</i> <i>tolworthi</i>	<i>Tenebriones</i> <i>san diego</i>
Descubrimiento	1901	1977	1979, 1981	1983, 1986

Whiteley et al (1988)

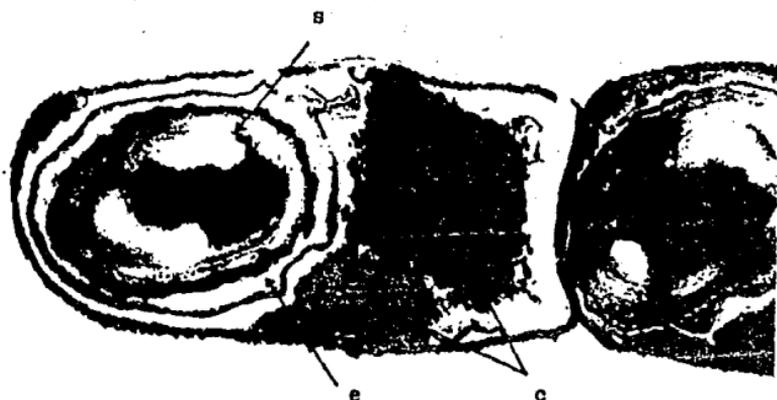


FIGURA 1. Micrografía electrónica del *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*, presentando inclusiones fuera del exosporio, con forma ovoide y bipiramidal.

s = espora; c = cristal proteínico; e = exosporio.

Aronson et al (1986)

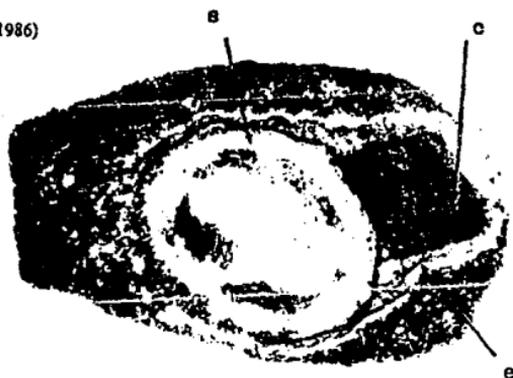


FIGURA 2. Micrografía electrónica del *Bacillus thuringiensis* subespecie *finitimus*, con el cristal asociado al exosporio, presentando una forma bipiramidal.

s = espora; c = cristal proteínico; e = exosporio

Norris (1973)

4.2. Modo de acción de la δ -endotoxina

El mecanismo de acción de la δ -endotoxina resulta difícil de generalizar debido al gran número de insectos de diferentes especies y variedades que son susceptibles a las diversas subespecies de bacterias cristalíferas (Aronson *et al.*, 1986).

El uso de líneas celulares de insectos facilita el estudio del modo de acción de la δ -endotoxina, permitiendo caracterizar la histopatología de la intoxicación con el cristal proteínico (Whiteley y Schnef, 1986).

4.3. Susceptibilidad de las larvas a la δ -endotoxina

La susceptibilidad de las larvas a la δ -endotoxina se debe al alto grado de alcalinidad (pH: 9 a 10.5) presente en su intestino medio (organo digestivo); necesario para solubilizar los cristales proteínicos, que mediante la acción de proteasas son convertidos en toxinas. Y probablemente a la presencia de centros receptores en la superficie de las células epiteliales del intestino medio, relacionados con el inicio de la actividad tóxica (De Barjac, 1984; Huber y Lüthy, 1981).

Knoweles *et al.* (1991) reportan que el azúcar N-acetilgalactosamina es parte del receptor del epitelio intestinal del insecto que reconoce a las proteínas tóxicas del *Bacillus thuringiensis*; mencionando que a nivel de laboratorio, las toxinas lisan ciertas

líneas celulares de insectos y presentan afinidad de unión a los bordes de las membranas vesiculares del intestino medio. Observando que la molécula de N-acetilgalactosamina disminuye específicamente la actividad citolítica de la subclase de cristal denominado: CryIA (c), en células de *Choristoneura fumiferana* (gusano del pinabete), susprimiendo completamente la unión de toxinas en *Manduca sexta* (gusano de cuerno del tabaco), y parcialmente en *Heliothis virescens* (gusano de la yema del tabaco).

Oddou et al. (1991) realizaron un estudio de identificación y caracterización de las proteínas de las membranas del intestino medio del insecto *Heliothis virescens*, capaces de unirse a la δ -endotoxina del *Bacillus thuringiensis*; para investigar la especificidad de las proteínas del cristal insecticida del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* cepa HD-1, se usaron preparaciones de membranas obtenidas del intestino medio de larvas de *Heliothis virescens* (gusano de la yema del tabaco); separando y relacionando a cada proteína del epitelio intestinal, unida a la δ -endotoxina; con las tres actividades del cristal CryIA: los cristales CryIA (a) y CryIA (b) se enlazaron muy probablemente a sitios diferentes con proteínas de la misma masa molecular de 170 KDa (Kilodaltons); los cristales CryIA (c) se enlazaron a dos tipos de proteínas de masa molecular de 140 y 120 KDa. También se demostró en este experimento que el enlace de las proteínas de las membranas con cada cristal del *Bacillus thuringiensis*, no formó parte de un complejo covalente. Señalando que las proteínas de las membranas con masa molecular de 170 KDa, constituyen glucoproteínas y pese al tratamiento de éstas con la enzima endoglucosidasa, no se impidió la unión de las subclases de cristales, CryIA (a) y CryIA (b), lo cual indicó que los azúcares no son importantes para el enlace de estas toxinas; por lo tanto mencionan que estos resultados apoyan la idea de que las proteínas

de las membranas celulares del epitelio intestinal de las larvas del insecto Heliothis virescens, son importantes para la especificidad de las toxinas del bacilo.

Bulla, Jr. (1990) menciona que la actividad tóxica del Bacillus thuringiensis subespecie kurstaki, y subespecie berliner (serotipo 1) contra insectos lepidópteros, se localiza en el grupo amino-terminal medio de las moléculas del cristal proteínico, mientras que el grupo carboxil-terminal medio de estas moléculas no es requerido para la toxicidad.

Honec et al. (1991) señalan que las proteínas del Bacillus thuringiensis presentan un alto grado de especificidad; mencionando que estudios de laboratorio con varios cristales proteínicos, mostraron una correlación entre toxicidad y relación a receptores de células epiteliales del intestino medio de la larva. Los estudios revelaron que la parte carboxil-terminal-media del fragmento tóxico de proteínas híbridas construidas a partir de los cristales CryIA (b) y CryIC, presentó afinidad de unión a receptores relacionados con la especificidad insecticida.

Slaney et al. (1992) reportan diferencias a nivel de toxicidad del Bacillus thuringiensis cepa: EGM2158, para los coleópteros: Leptinotarsa decemlineata (Say) y Diabrotica undecimpunctata Howardi. Barber. Señalando que la cepa EGM2158 productora del cristal CryIIIA, es más activa contra L. decemlineata, siendo esta 2000 veces más sensitiva a la cepa que D. undecimpunctata Howardi. Por lo que se dice que uno de los pasos en el modo de acción del CryIIIA es alterado por D. undecimpunctata Howardi; sin embargo análisis de ingestión, solubilidad y digestión proteolítica del

CryIIIA por *D. undecimpunctata* Howardi, mostraron poca habilidad del CryIIIA para unirse a los receptores de la membrana.

Heimpel y Angus (1986) relacionan la susceptibilidad de las larvas a la δ -endotoxina con tres tipos diferentes de acción:

- ◊ Tipo I, los insectos mueren por acción de la δ -endotoxina, las esporas de la bacteria no incrementan su toxicidad;
- ◊ Tipo II, los insectos son susceptibles a la δ -endotoxina pero los efectos aumentan por la presencia de esporas;
- ◊ Tipo III, los insectos solo mueren por acción de mezclas espóra-endotoxina.

Los laboratorios Abbott (1970) reportan la acción del producto comercial Dipel, compuesto por esporas- δ -endotoxina del *Bacillus thuringiensis* cepa HD-I; indicando dos formas diferentes de control larval:

- ◊ Parálisis intestinal, causada por los cristales tóxicos que actúan sobre la pared del intestino medio de la larva, produciendo desrupción en el balance osmótico, y abrasión en la pared estomacal, permitiendo el escape de las esporas contenidas en el intestino; las graves lesiones en la pared estomacal conducen a la muerte del insecto;
- ◊ Septicemia, originada por la invasión de esporas del *Bacillus thuringiensis* al hemocelo del insecto, en el cual se desarrollan y dividen rápidamente, señalando que en

solo 12 horas una sola espora puede producir 69 millones de nuevas bacterias que compiten por los nutrientes contenidos en la sangre, causando un debilitamiento total en el insecto y finalmente la muerte.

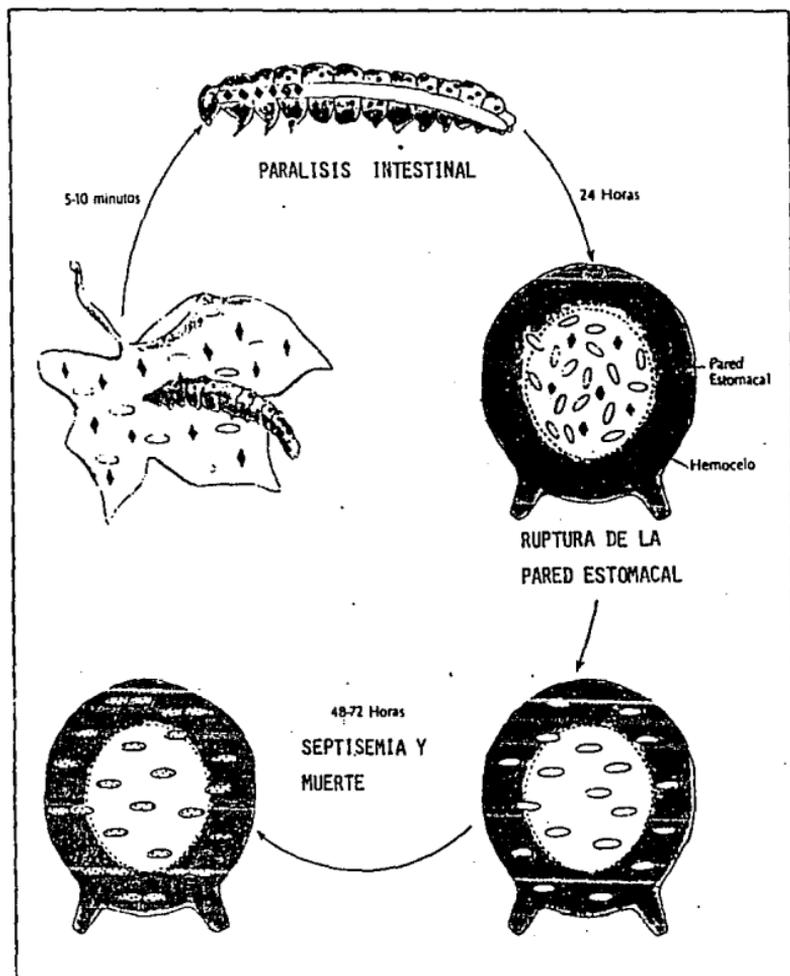


FIGURA 3. Secuencia de eventos asociados al control de larvas con *Bacillus thuringiensis*. (Dipel),

Laboratorios Abbott, (1970).

Wang y Sha (1991) observaron los procesos patológicos causados por el *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* cepa HD-1, sobre células epiteliales del intestino medio del quinto estadio larvario del insecto *Mythimna separata*; mediante microscopía electrónica, observaron que los organelos inicialmente afectados, fueron las mitocondrias, las cuales presentaron daño a nivel de membrana basal; también se observaron altas proporciones de células hinchadas con proyecciones citoplasmáticas, indicándose que en estas regiones hubo un decrecimiento en la densidad electrónica; y daño en cierto grado en otros organelos, finalizando con la destrucción e inactivación de la membrana basal de las células del epitelio del intestino medio.

Lee et al. (1991) reportan la ultraestructura celular del intestino medio de larvas de tercer estadio de mosquitos *Culex pipiens* infectados por el *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* cepa HL-75. Mencionando que los cristales de la δ -endotoxina indujeron la destrucción citoplásmica de los tejidos celulares del intestino medio del mosquito; causando deformaciones de las microvelocidades así como de su organización interna, y ruptura de microfilamentos.

English y Slatin (1992) señalan que la δ -endotoxina del *Bacillus thuringiensis* interactúa sobre la bicapa planar lipídica de las células epiteliales del intestino medio del insecto, ocasionando un cambio en la selección de cationes, que se manifiesta por la ruptura de la capacidad de regulación iónica del intestino medio; sugiriendo que estos cambios son responsables del flujo de sustancias tóxicas y iones al hemocelo. Indicando que los requerimientos de interacción de la δ -endotoxina con el epitelio del intestino medio, deben crear una serie de eventos fisicoquímicos necesarios para formar

una estrecha asociación con la membrana, intercalación con esta, y formación de un acceso abierto en el transporte de cationes.

5. PLASMIDOS ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE DELTA-ENDOTOXINA

Carlton y González (1984) reportan que la producción de δ -endotoxina en la bacteria *Bacillus thuringiensis*, está asociada a la presencia de plásmidos; mencionando un estudio realizado con enfoque en dos técnicas:

◊ Técnica I, comprende el análisis de plásmidos obtenidos a partir de cepas de *Bacillus thuringiensis* mutantes en la producción de cristal, clasificadas como: Cry+ (cristal positivo) o Cry- (cristal negativo), mediante microscopía de contraste de fases; con el fin de correlacionar la producción de toxina-cristalina con plásmidos de alto peso molecular en varias diferentes subespecies de *Bacillus thuringiensis* (González et al., 1981).

◊ Técnica II, usan el proceso natural de transferencia de plásmidos entre cepas de *Bacillus thuringiensis* (González y Carlton, 1982) para demostrar que la producción del cristal se correlaciona con la transferencia de plásmidos de algunas cepas donadoras implicadas en los estudios de investigación de la técnica I; señalando que los cristales producidos por células transcripientes Cry+ (células recipientes que han adquirido plásmidos de DNA de una cepa donador) exhibieron las propiedades inmunológicas e insecticidas de la cepa donador; estas cepas al perder sus plásmidos no presentaron toxicidad en los bioensayos realizados (González et al., 1982).

En el cuadro 6 que se muestra a continuación, se resume el estudio realizado por Carlton y González; en el cual se indica que las cepas HD-2, HD-73 y HD-567, exhibieron transmisión de plásmidos a cepas recipientes Cry-, convirtiéndolas en cepas productoras de toxina.

La suposición de que el tamaño de los plásmidos codificadores de toxina es diferente en cada cepa examinada y similar en cepas relacionadas, se justifica a partir de los resultados obtenidos con las cepas del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*, las cuales presentaron similitud en la medida de sus plásmidos (50, 55, ~110 y 44 Megadaltons; MDa), con algunas variaciones producidas por factores espontáneos; así como las cepas del serotipo H-14: HD-500 y HD-567, que exhibieron plásmidos codificadores de toxina con un tamaño de 75 MDa, probablemente por la descendencia de su aislamiento.

Los plásmidos implicados en la producción de toxina, presentaron una medida de 44 a ~110, y 44 Megadaltons (MDa), considerándose por lo tanto de gran tamaño. Se hace referencia a un estudio de 40 a 50 cepas productoras de cristal, comprendiendo 20 serotipos y 25 serovariaciones de *Bacillus thuringiensis*, las cuales presentaron un contenido de plásmidos eminentemente mayores a 20 Megadaltons (MDa). Por lo que esta evidencia sugiere que los genes de la δ -endotoxina solo residen en plásmidos grandes en medida (44 a ~110 MDa).

Cuadro 6. Correlación entre plásmidos específicos y producción de δ -endotoxina en varias cepas de *Bacillus thuringiensis*

29

Cepa prototipo Número ^a	Serotipo-H y nombre de la variedad	Número de plásmidos	Medida de plásmidos implicados en la producción de toxina	Tipo de implicación
H-2	1, <i>thuringiensis</i>	10	75 MDa	A, T
HD-73	3ab, <i>kurstaki</i>	6	50 MDa	A, T
HD-74	3ab, <i>kurstaki</i>	7	55 MDa	A
HD-1	3ab, <i>kurstaki</i>	12	- 110 MDa	A, D
HD-263	3ab, <i>kurstaki</i>	11	44 MDa	T
HD-4	3a, <i>alesti</i>	10	- 105 MDa	A
HD-8	5ab, <i>galleriae</i>	4	- 130 MDa	D
HD-536	8ac, <i>ostriniae</i>	4	68 MDa	A
HD-542	12, <i>thompsoni</i>	4	- 100 MDa	A
HD-567	14, <i>israelensis</i>	9	75 MDa	A, T
HD-500	14, <i>israelensis</i>	9	75 MDa	A

Carlton y González (1984)

a = referencia al número de cepa de la colección de H. T. Dulmage;

A = cepas mutantes Cry-

T = transferencia de plásmidos dentro de células Cry- convertidas en células productoras de cristal Cry+;

D = supresión (disminución) en el tamaño de los plásmidos.

MDa = Megadaltons.

Los mismos autores indican que el estudio de transferencia de plásmidos, insinúa que el criterio taxonómico basado en la producción de cristal tóxico para separar al *Bacillus thuringiensis* del *Bacillus cereus* en dos especies distintas, es inconstante ya que las cepas del *Bacillus thuringiensis* pueden perder sus plásmidos productores de toxina y convertirse en Cry-, y cepas de *Bacillus cereus* pueden adquirir plásmidos productores de toxinas y de este modo convertirse en Cry+.

Jarret y Stephenson (1990) mencionan que la transferencia de plásmidos entre cepas de *Bacillus thuringiensis* ocurre en forma natural como resultado de la producción de nuevas combinaciones de δ -endotoxina dentro de poblaciones de la bacteria.

Brown y Whiteley (1992) citan la clonación y secuenciación de dos genes codificadores de cristales cuboides polipeptídicos del *Bacillus thuringiensis* subespecie *thompsoni* en la bacteria *E. coli*; señalando que los polipéptidos presentaron movilidad electroforética de 40 y 34 Kilodaltons (KDa), y secuenciación de aminoácidos con masa molecular de 35, 38.4 y 37.505 Daltons, respectivamente. El cristal proteínico de 34 Kilodaltons tuvo actividad insecticida contra larvas de lepidópteros (*Manduca sexta*). El polipéptido de 40 KDa. no tuvo actividad insecticida pero puede tener un papel funcional en la estructura del cristal.

Krieg et al. (1990) indican que los plásmidos que contienen DNA que expresa proteínas tóxicas del *Bacillus thuringiensis* tienen un peso molecular de aproximadamente 65 a 70 Kilodaltons con toxicidad para coleópteros.

Maramorosch (1991) señala que los recientes éxitos en las modificaciones genéticas del *Bacillus thuringiensis* representan promesas de nuevos insecticidas para el control de numerosas plagas producidas por lepidópteros, dípteros y coleópteros.

6. PRODUCCION MASIVA DEL *Bacillus thuringiensis*

La producción a gran escala del *Bacillus thuringiensis* se realiza mediante fermentaciones sumergidas utilizando una variedad de cultivos de cepas, que se conservan mediante liofilización, o por congelamiento con nitrógeno líquido, o por secado de esporas en soportes inertes. Las producciones de los cultivos deben ser optimizadas para producir una buena esporulación así como una buena formación de cristales. Las formulaciones implican el ajuste de la producción a un valor preseleccionado de unidades internacionales por miligramo (UI/mg), y la adición de agentes preservativos, dispersantes y adherentes (Bulla y Yousten, 1979).

Valenzuela (1987) menciona un método para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* y la obtención del complejo esporas- δ -endotoxina:

Aislamiento de la bacteria

a partir del suelo:

◊ Tratar las muestras de

suelo con sulfato de po-

limixina B y penicilina

◊ a una concentración

Aislamiento de la bacteria

a partir de larvas infecta-

das:

◊ Macerar las larvas y se-

carlas;

de 5 partes por millón (ppm) y 4 ppm respectivamente,

◊ Preparar diluciones con las larvas maceradas y secas.

◊ A partir de las diluciones obtenidas por cualquiera de los dos procedimientos, sembrar en agar nutritivo;

◊ incubar durante 48 horas, a temperatura de 37°C;

◊ caracterizar macroscópica y microscópicamente las colonias obtenidas;

◊ aislar e identificar la bacteria;

◊ obtención del cultivo puro;

◊ inocular la bacteria en un medio líquido de triptosa fosfato (esterilizado a 121°C por 35 minutos);

◊ agitación rotatoria del cultivo a temperatura 32°C y 340 revoluciones por minuto (rpm) durante 18 a 24 horas, para obtener el inóculo para el medio de producción masiva;

◊ inocular el medio de cultivo seleccionado para la producción masiva en fermentadores de capacidad y volumen creciente;

◊ controlar la aireación, la agitación, la temperatura y el pH;

◊ efectuar un muestreo secuencial del cultivo cada 6 a 8 horas para cuantificar la existencia y proporción del complejo esporas- δ -endotoxina, y la detección de microorganismos indeseables;

◊ finalmente, ajustar la biomasa obtenida, a un pH de 7;

- ◊ concentrar y lavar el producto, mediante centrifugación a temperatura de 25 a 26°C, y a una velocidad de 500 rpm durante 30 minutos;
- ◊ suspender la mezcla en lactosa al 5%, en cantidades equivalentes a 1/10 de volumen por cada volumen de biomasa obtenido; agitando la suspensión y agregando paulatinamente acetona;
- ◊ el precipitado (pp) obtenido, se deja reposar 30 minutos y se filtra al vacío;
- ◊ lavar el pp con acetona y secarlo con papel absorbente;
- ◊ conservar el microorganismo producido en recipientes sellados y a temperatura de 20°C aproximadamente.

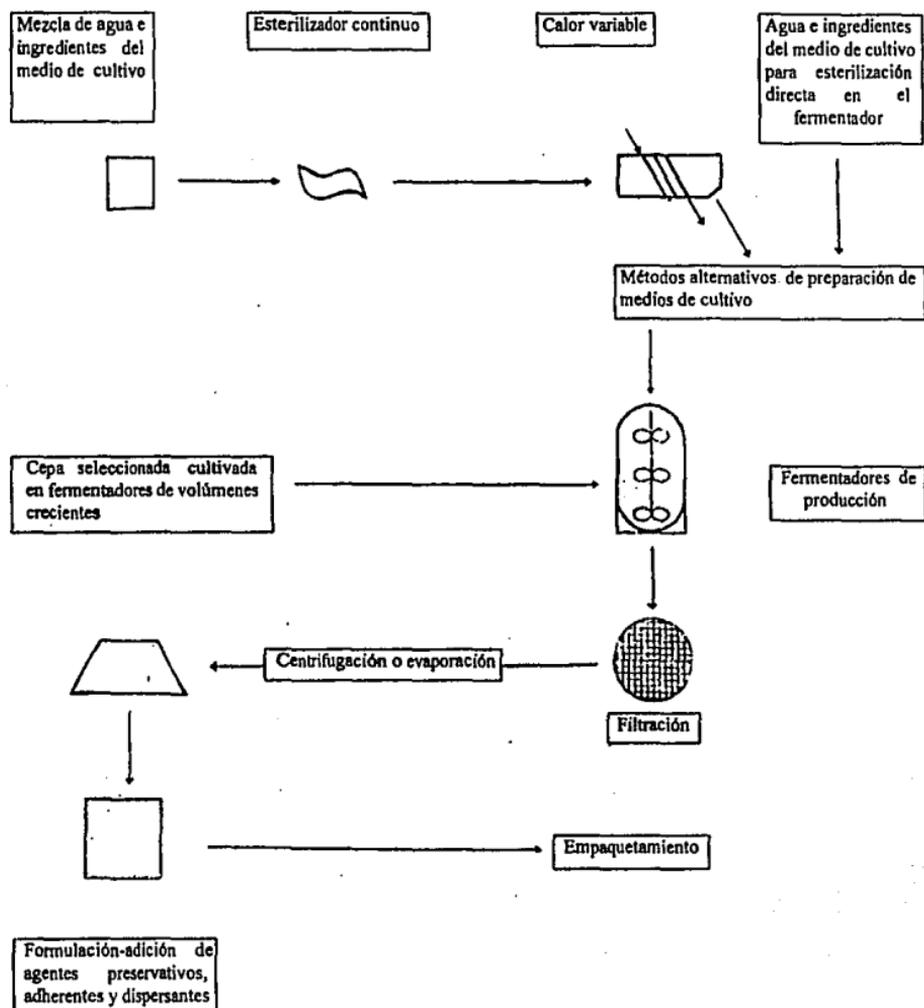


FIGURA 4. Diagrama de flujo para fermentaciones sumergidas de *Bacillus thuringiensis*. Bulla y Yousten (1979).

Los productos no formulados (polvos primarios) obtenidos a partir de las biomásas de las diferentes cepas o variedades de Bacillus thuringiensis, deben provenir de líneas de serotipos puros y describirse de tal forma en sus especificaciones; así como la identificación de la cepa, su potencia en unidades tóxicas internacionales, contenido de humedad, rango de dimensión de las partículas, pruebas de control de calidad realizadas y los requisitos para empacar y rotular.

Las especificaciones para los productos formulados deben describir al polvo primario utilizado para su preparación e incluir las propiedades físicas relevantes (polvos rociables, humectables, concentrados, líquidos o granulados); así como las pruebas de estabilidad de almacenaje acelerado (De Barjac, 1984).

Los requisitos y sugerencias de aplicación aérea o terrestre, también se deben describir en las especificaciones del producto comercial, al igual que los agentes diluyentes y surfactantes apropiados para potenciar la eficacia del Bacillus thuringiensis. Los diluyentes pueden ser líquidos, como: agua y melazas; sólidos como: harinas, talco, y salvado. Entre los surfactantes más utilizados se tienen: Triton B 1956, Producto Coloidal X-77, Biofilm y el spray Sticker de Chevron (Laboratorios Abbott, 1970)

6.1. Principales factores a controlar en el proceso de fermentación

Entre los principales factores sujetos a control en el proceso de fermentación importantes para la obtención de un máximo de crecimiento, se tienen: la aireación y la agitación, así como el pH y la temperatura (De Bach, 1975).

Osadchaya et al. (1990) reportan condiciones óptimas de aireación para el cultivo de *Bacillus thuringiensis* mediante fermentaciones sumergidas, usando un método en el que se establece que el aire favorece un incremento de la biomasa bacilar y de la actividad insecticida al término del periodo completo de cultivo; mencionando que el incremento de la velocidad de agitación del medio es negativo; por lo que se recomienda un suministro de aire de 0.5 litros por minuto para las primeras 12 horas, con un incremento a 1.0 l/min en las siguientes horas de fermentación, manteniendo constante la velocidad de agitación del medio de 500 revoluciones por minuto (rpm).

La temperatura de cultivo, debe mantenerse usualmente entre 28 a 35°C, aunque muchas cepas de *Bacillus thuringiensis* crecen a temperaturas de 41°C (Bulla y Yousten, 1979).

El pH de cultivo debe tener un rango entre 6.5 a 7.5 para obtener una mayor producción del complejo esporas-cristal.
(Valenzuela, 1987).

6.2. Inconvenientes que se presentan en el periodo de fermentación

La intensa formación de espuma en los fermentadores, originada por los sistemas de agitación y aireación e incrementada por la desnaturalización de proteínas y alta viscosidad en el medio de cultivo. Entre los métodos convencionales para el control de espuma se tienen: la adición de agentes antiespumantes y el empleo de espas mecánicas que descomponen la espuma que se adhiere al agitador.

La prevención de la formación de espuma hace posible que los recipientes de cultivo, puedan llenarse casi completamente a toda su capacidad. Para la producción del *Bacillus thuringiensis*, la manteca de cerdo ha sido usada como agente antiespumoso (DeBach,1975).

La infección de *Bacillus thuringiensis* por bacteriófagos líticos, es un continuo problema para algunas manufacturas; por lo cual la prevención por fagos ha incluido una extrema higiene en plantas fermentadoras (Bulla y Yousten, 1979).

6.3. Algunos medios de cultivo propuestos para una mejor producción

Abdel et al. (1991) citan un medio de cultivo para fermentaciones con la siguiente composición:

Productos de soya 3%, melazas 1%; además de aireación de 0.37 a 6.62 volúmenes por cada volumen de medio de cultivo por minuto (v/v/min); pH de 6.5 a 7.5; y temperatura de 30°C. Reportando un buen crecimiento de biomasa y buenas producciones de esporas y δ -endotoxina del *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14, cepa aislada en Egipto con actividad insecticida contra *Culex pipiens* (Díptero:Culicidae) mencionando que esta investigación sugiere la producción de larvicidas de mosquitos en los países donde sean disponibles estos ingredientes del medio de cultivo.

Ejiofor (1991) reporta un medio de cultivo para fermentaciones, compuesto de restos cervceros de levadura y desperdicios de almidón de yuca; usando aceite de palma como

antiespumante; para la producción del Bacillus thuringiensis serotipo H-14 como bioinsecticida, con un rendimiento en la producción de esporas y cristales de 95%.

Kuppusamy (1991) cita la utilización de forraje como medio de cultivo para el proceso de fermentación, aplicando una técnica basada en el control de glucosa para mejorar la producción de células y toxicidad del Bacillus thuringiensis serotipo H-14.

Khovrychev *et al.* (1990) reportan el crecimiento y desarrollo de Bacillus thuringiensis en tres etapas de cultivo continuo en quimiostato, indicando que el crecimiento de la bacteria ocurrió en la primera etapa de la fermentación, y la formación de esporas y cristales en la segunda y tercera etapa. Con un rendimiento en la producción de esporas entre 30% en la segunda etapa y arriba de 80% en la tercera; determinando bajas condiciones de rendimiento y un largo tiempo requerido para la formación de esporas y cristales.

Muratov *et al.* (1991) mencionan un estudio morfométrico de células, esporas, y cristales de Bacillus thuringiensis mediante una tinción fluorescente (fluoresceína) seleccionada para usarse en la determinación de la concentración de biomasa viable durante el crecimiento de la bacteria en medios nutritivos heterogéneos.

Moser (1991) describe el caso de un bioreactor para la producción de etanol con bacterias del género Zymomonas, y biopesticidas con Bacillus thuringiensis, mencionando que la aplicación de bioreactores para la producción industrial y para fines

científicos, está siendo muy usada; y que el diseño de bioreactores modelo es una poderosa contribución para el diseño óptimo de bioreactores en escala técnica.

6.4. Evaluación de toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad se utiliza la técnica del bioensayo, basada en la comparación de la mortalidad larval entre la preparación de referencia con la mortalidad resultante de las fórmulas de potencia desconocida; la tecnología inmunoquímica, como: el análisis inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), entre otros, también está siendo aplicada para la evaluación de las formulaciones (De Barjac, 1984).

El mismo autor anterior señala que la proporción de cristales que contienen esporas- δ -endotoxina de una preparación de *Bacillus thuringiensis* fluctúa con la cepa del bacilo y su modo de producción, por lo que el conteo de esporas viables como cálculo de la toxicidad, no provee una medida real de la actividad insecticida.

Bulla y Yousten (1979) indican que el resultado de la toxicidad de las cepas de *Bacillus thuringiensis* debe ser reportado en unidades internacionales (UI), y la actividad debe ser comparada con una preparación estandar internacional basada en la cepa E-61, preparada en el Instituto Pasteur en París, Francia; a la cual se le asignó una potencia de 1000 unidades internacionales por miligramo (UI /mg); mencionando que se ha establecido, que cada fabricante prepare individualmente su propia fórmula estandar primaria basada en la cepa E-61. La fórmula de la preparación estandar primaria es la siguiente:

$$\text{UI/mg de muestra} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ de la estandar}}{\text{DL}_{50} \text{ de la muestra}} \times 1000 \text{ UI/mg.}$$

Valenzuela (1986) aclara que desde 1961 se adoptó la cepa E-61 como la primera estandar internacional. Y debido a que la toxicidad de una misma especie de Bacillus thuringiensis puede variar de una formulación a otra, la División de Regulación de Plaguicidas de los Estados Unidos, acordó la necesidad de preparar una fórmula estandar primaria para ese país, a partir de la cepa HD-1; codificada oficialmente como: HD-1-S-1971; con una potencia de 18000 UI/mg. Y haciendo uso del mismo serotipo anterior (3a, 3b) se elaboró otra fórmula reconocida oficialmente como: HD-1-S-1980 con una potencia de 16000 UI/mg; a consecuencia del agotamiento de la estandar primaria.

6.5. Agentes ambientales que afectan la efectividad y persistencia de la bacteria

Las preparaciones de esporas y cristales de Bacillus thuringiensis aplicadas al follaje, son afectadas por diversos agentes como son: radiación ultravioleta de la luz solar, temperatura y lluvia.

Jones et al. (1991) mencionan que las técnicas de obtención de mutantes con la luz ultravioleta (UV), pueden ser aplicadas a cepas que son frecuentemente usadas en la producción industrial de toxinas de Bacillus thuringiensis.

Salama et al. (1991) citan ensayos para desarrollar cepas de Bacillus thuringiensis Berliner resistentes al calor y a la luz ultravioleta a partir del tratamiento de plásmidos por incubación a 40°C o mediante la introducción de DNA ajeno; mencionando que las cepas resistentes a la luz ultravioleta presentaron "alta toxicidad" y algunas alteraciones estructurales en sus plásmidos, causadas por la acción de la radiación; a diferencia de las cepas resistentes al calor obtenidas experimentalmente, que presentaron "gran reducción de su potencial tóxico".

Cohen et al. (1991) mencionan que la irradiación del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki cepa HD-1, a 300 - 350 nanómetros (nm) durante más de 12 horas usando un reactor fotoquímico, resultó en una rápida pérdida de la toxicidad de la bacteria contra larvas del insecto Heliothis armigera; y que mediante la adsorción de cationes cromóforos como: acriflavina (AF), verde de metilo y rodamina B, en el Bacillus thuringiensis, se obtuvo la fotoprotección del componente tóxico; señalando que la AF presentó la mejor protección de esta bacteria; la cual fué altamente tóxica después de 12 horas de irradiación ultravioleta; especulándose qué residuos de triptofano fueron esenciales para los efectos tóxicos del Bacillus thuringiensis al lograrse la fotoprotección mediante la energía de transferencia de moléculas excitadas de triptofano a moléculas cromóferas.

Dunkley y Shasha (1989) mencionan un ensayo de efectividad de fotoprotectores, utilizando encapsulados de Bacillus thuringiensis dentro de una matriz de almidón conteniendo rojo congo, ácido fólico o ácido paraminobenzoico como pantalla;

señalando que el colorante rojo congo fué el más efectivo, seguido del ácido fólico y ácido paraminobenzoico.

Shakoori y Mansha (1991) estudiaron las condiciones óptimas de crecimiento y los efectos de hipertemia sobre la síntesis de proteínas del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*, con referencia especial al choque térmico, utilizando las proteínas de la bacteria *Escherichia coli* después de un choque térmico como base de comparación. Las células del *Bacillus thuringiensis* fueron expuestas a diferentes temperaturas (40, 42, 45, 48, 50 y 55°C) con diferente tiempo de duración (5, 8, 15, 20, 30, 40 y 50 minutos), el análisis y cuantificación de las proteínas efectuado después del choque térmico para todos los microorganismos, mostró en *Escherichia coli* la presencia de tres tipos de proteínas con peso molecular aproximado de 76, 73 y 74 Kilodaltons (KDa) a 50°C; mientras que en el *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* se presentaron siete tipos de proteínas con un peso molecular de 18 a 54 KDa.

Akiba (1991) cita la evaluación de la dispersión de *Bacillus thuringiensis* sobre el suelo, bajo condiciones de irrigación naturales y artificiales. La prueba se realizó sobre plantaciones de moras en condiciones lluviosas de verano, con irrigación continua de los cultivos durante un mes. Señalando que a una profundidad de 10 cm del suelo, no hubo traslocación del *Bacillus thuringiensis*; y que en condiciones artificiales de irrigación con una caída de lluvia equivalente a 450 mm el *Bacillus thuringiensis* fué detectado a una profundidad de 3-6 cm. del suelo. En pruebas de irrigación usando columnas con suelo de ceniza volcánica el *Bacillus thuringiensis* no fué capaz de penetrar pero se detectaron algunas de estas bacterias en el flujo de agua de una corriente que pasaba a

través de arena de aluvión. Indicando, a partir de los resultados, que el mayor factor causante del decrecimiento en la población del *Bacillus thuringiensis*, no se debe a una disgregación física efectuada por el agua de lluvia al dispersar la bacteria dentro del suelo.

Se han reportado otros factores que afectan la efectividad del *Bacillus thuringiensis*, entre estos se conocen: ciertos bacteriófagos propios de larvas de mosquitos que actúan inhibiendo la potencia de la bacteria. Hussein et al., (1991) mencionan que estos fagos son específicos para las cepas de *Bacillus thuringiensis*; también las propiedades adhesivas de la bacteria sobre el follaje, que se correlacionan con el tipo de hoja; así como con el tipo de formulación y concentración utilizadas.

Smimova et al. (1991) reportan un estudio relativo a las propiedades adhesivas que tienen las esporas de dos subespecies de *Bacillus thuringiensis*, mencionando que al usar la técnica de microscopía fluorescente, se observó que las esporas del *Bacillus thuringiensis* subespecie (ssp) *galleriae*, presentaron mejor adhesión al follaje que las esporas del *Bacillus thuringiensis* ssp. *dendrolimus* (serotipo: 4a 4b); y mediante la microscopía electrónica, se reveló la presencia de tres tipos de apéndices filamentosos sobre la superficie de las esporas de *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*, con semejanzas funcionales con las fimbriac de las bacterias gram-negativas, que intervienen en la adhesión de las células bacterianas a otras células o partículas, y como medio de fijación en ambientes acuosos; mencionando finalmente que las esporas fimbriadas presentaron pruebas de hemaglutinación no características de *Bacillus thuringiensis* ssp. *dendrolimus*, que se correlacionaron con el serotipo flagelar correspondiente. Por lo que

se considera que los modelos de hemaglutinación y fimbriación de esporas pueden tener un posible valor auxiliar taxonómico.

McGuire y Shasha (1990) reportan el análisis de varios agentes adherentes y adyuvantes, utilizados como encapsuladores en formulaciones rociables de *Bacillus thuringiensis* Berliner subespecie *kurstaki* señalando que estos materiales fueron suspendidos en agua y sujetos a prueba de factores físicos, así como viscosidad y adhesión sobre la superficie de las plantas, observando que todas las formulaciones tuvieron aceptable viscosidad y al aplicarlas sobre hojas de algodón algunas permanecieron 4 días, y otras 2 semanas; una de estas formulaciones contenía partes iguales de Mira-spense (un pregelatinizado utilizado como adherente disponible comercialmente) así como sacarosa (6% de sólidos totales), y fue seleccionada como testigo de persistencia de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* contra larvas neonatales de *Ostrina nubilalis* Hubner; los resultados indicaron que en presencia de los agentes encapsuladores adherentes, la actividad insecticida disminuyó significativamente entre 2 semanas.

De Barjac (1984) menciona ciertos estudios de laboratorio en los cuales se indica que la clase de agua, los sedimentos de estanques, y la precipitación de las esporas- δ -endotoxina del *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14, pueden reducir la actividad tóxica de la bacteria contra larvas objetivo.

Yousten et al. (1992) llevaron al cabo un estudio para definir el destino de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis* en el medio acuático,

mencionando que las esporas de estas bacterias fueron suspendidas por separado en botellas de filtrados y en bolsas de diálisis con agua dulce y agua de mar; bajo varias condiciones de temperatura, pH y salinidad; indicando que la resistencia de las esporas al calor decreció lentamente con el tiempo, y ocurrió más rápidamente en las esporas contenidas en las bolsas de diálisis que en las contenidas en las botellas. Señalando también que mediante los estudios de laboratorio se pudo calcular la longevidad de las esporas en el medio ambiente, así como su velocidad de precipitación que se estableció en relación con el material de las partículas contenidas en el agua de una columna. Indicando que las parasporas (tal vez esporas y toxinas) del *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis* pudieron adherirse y fijarse excelentemente a los sedimentos suspendidos en el medio. Concluyendo que las observaciones realizadas minimizan parcialmente la explicación de la gran persistencia de la actividad larvicida de *Bacillus sphaericus* en el campo de prueba que la de *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis*.

Reséndiz (1993) cita un estudio relacionado con la persistencia de los cristales tóxicos del *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis*, realizado por Dupont et al., (1986) mencionando que se utilizaron para ello, cámaras ambientales llenas con una formulación comercial de *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis* y sustratos naturales de suelos; y otras cámaras conteniendo únicamente, a la formulación comercial del bacilo. Señalando que las cámaras fueron mantenidas casi en el fondo de un pequeño lago oligotrófico, y en esas condiciones la toxicidad se conservó estable durante 21 días; alcanzando un bajo índice entre los días 43 y 69 e incrementándose después de ese tiempo, excepto para las muestras que contenían sedimentos orgánicos;

indicando también que a temperaturas frías el Bacillus thuringiensis serovariedad israelensis esporula y libera nuevos cristales.

7. USOS Y APLICACIONES

El renovado interés en el desarrollo de bioinsecticidas a base de Bacillus thuringiensis ha estimulado el descubrimiento de nuevas alternativas para el control de plagas de insectos; las proteínas tóxicas de esta bacteria ofrecen un gran potencial en la protección natural, así como un extenso rango de actividad al utilizarse individualmente contra larvas objetivo, y también en forma conjunta con otros organismos entomopatógenos, o con productos químicos insecticidas así como en la tecnología del DNA recombinante, que provee los medios para su mejoramiento y estabilización, ampliando de este modo sus usos y aplicaciones (Gelernter, 1990).

Entre los principales problemas entomológicos a resolver en México, citados por Morón y Terrón (1988), se indican algunos de los cuales pueden ser susceptibles de biocontrol con Bacillus thuringiensis:

Control del complejo de insectos del género Heliothis, que afecta a más de 12 cultivos básicos o industriales en casi todas las áreas del país; control del complejo en sus etapas larvarias de plagas de Agrotis-Diabrotica, que afecta principalmente al maíz y al frijol; control del complejo de descortezadores del género Dendroctonus, que afecta a las coníferas maderables en todo el país; y control del complejo de dípteros involucrados en la transmisión del dengue, el paludismo y la oncocercosis, en el sureste de la República.

BACILLUS THURINGIENSIS

INGESTA DIARIA ADMISIBLE: NO DETERMINADA

CATEGORIA TOXICOLOGICA DEL PRODUCTO TECNICO:	USO: AGRICOLA, FORESTAL Y URBANO. IV
TIPO DE PLAGUICIDA:	INSECTICIDA BIOLÓGICO DE INGESTION
INCOMPATIBILIDAD:	NO MEZCLARLO CON PRODUCTOS DE FUERTE REACCION ALCALINA.
CONTRAINDICACIONES:	NO DEJAR REMANENTES DE LA MEZCLA EN LOS TANQUES POR MAS DE 12 HORAS.
PERSISTENCIA:	POCO PERSISTENTE
EFFECTOS ADVERSOS AL AMBIENTE:	NINGUNO.
EFFECTOS ADVERSOS A LA SALUD:	LIGERAMENTE PELIGROSO.
PRECAUCIONES:	NO ALMACENARLO A MAS DE 32 GRADOS CENTIGRADOS.
TRATAMIENTO EN CASO DE INTOXICACION:	SINTOMATICO.

USO AGRICOLA

PRESENTACION	EQ. en g. I.A. /KG. o L.	CATEGORIA TOXICOLOGICA	USO AUTORIZADO	L.M.R p.p.m	INTERVALO DE SEGURIDAD (DIAS)
APLICACION AL FOLLAJE:					
POLVO HUMECTABLE	32.00	IV	AJONJOLI	EXENTO	SIN LIMITE
POLVO HUMECTABLE	93.6	IV	ALFALFA	EXENTO	SIN LIMITE
POLVO HUMECTABLE	100.00	IV	ALGODONERO	EXENTO	SIN LIMITE
SUSPENSION ACUOSA	8.40	IV	APIO	EXENTO	SIN LIMITE
SUSPENSION ACUOSA	35.00	IV	ARBOLES FORESTALES	EXENTO	SIN LIMITE
SUSPENSION ACUOSA	275.00	IV	BERENJENA	EXENTO	SIN LIMITE
			BROCOLI	EXENTO	SIN LIMITE
			CACAHUATE	EXENTO	SIN LIMITE
			CALABACITA	EXENTO	SIN LIMITE
			CARTAMO	EXENTO	SIN LIMITE
			CAÑA DE AZUCAR	EXENTO	SIN LIMITE
			CHICHARO	EXENTO	SIN LIMITE
			CHILE	EXENTO	SIN LIMITE
			CITRICOS	EXENTO	SIN LIMITE
			COL	EXENTO	SIN LIMITE
			COL DE BRUSELAS	EXENTO	SIN LIMITE
			COLIFLOR	EXENTO	SIN LIMITE
			ESPINACA	EXENTO	SIN LIMITE
			FRESA	EXENTO	SIN LIMITE
			FRIJOL	EXENTO	SIN LIMITE
			GARBANZO	EXENTO	SIN LIMITE
			GIRASOL	EXENTO	SIN LIMITE
			JITOMATE	EXENTO	SIN LIMITE
			LECHUGA	EXENTO	SIN LIMITE
			MAIZ	EXENTO	SIN LIMITE
			MELON	EXENTO	SIN LIMITE
			NABO	EXENTO	SIN LIMITE
			NARANJO	EXENTO	SIN LIMITE

Bacillus thuringiensis

USO AGRICOLA

PRESENTACION	EQ. en g. I.A./KG. o L.	CATEGORIA TOXICOLOGICA	USO AUTORIZADO	L.M.R. p.p.m.	INTERVALO DE SEGURIDAD (DIAS)
			ORNAMENTALES	EXENTO	SIN LIMITE
			PAPA	EXENTO	SIN LIMITE
			PEPINO	EXENTO	SIN LIMITE
			PEREJIL	EXENTO	SIN LIMITE
			PIÑA	EXENTO	SIN LIMITE
			PLATANO	EXENTO	SIN LIMITE
			SANDIA	EXENTO	SIN LIMITE
			SORGO	EXENTO	SIN LIMITE
			SOYA	EXENTO	SIN LIMITE
			TABACO	EXENTO	SIN LIMITE
			TOMATE DE CASCARA	EXENTO	SIN LIMITE
			VID	EXENTO	SIN LIMITE
PLANTAS FORMULADORAS EXCLUSIVAMENTE:					
POLVO	1000.00		IV		
GRANULADO	2.00		IV	URBANO	
SUSPENSION ACUOSA	6.00		IV	URBANO	

7.1. Aspecto agrícola

7.1.1. Importancia de las plagas agrícolas

La gran importancia que tienen los insectos como organismos perjudiciales en el proceso de la producción agrícola hacen indispensable el empleo de medidas de combate que logren reducir al máximo sus poblaciones y consecuentemente los graves daños ocasionados en los cultivos, que implican una reducción en la producción y cuantiosas pérdidas económicas (Carrillo, 1983).

Morón y Terrón (1988) señalan que los daños causados por los insectos en México, son cuantiosos, y no existen cifras absolutas de éstos pero se pueden encontrar datos parciales que dan idea sobre las pérdidas sufridas, como el reporte de Guevara y Calderón, donde se cuantifican las pérdidas de: maíz, frijol, arroz, sorgo, trigo, soya y algodón; basados en un promedio de diez años, indicando que el daño atribuible a estas plagas superaba el 17% del total de las pérdidas equivalentes a un promedio de más de 275,608 hectáreas de cultivo deterioradas anualmente, con un valor asegurado de más de 152 millones de pesos. Mencionando también que el *Bacillus thuringiensis* (conocido como: Thuricide, o Dipel) es uno de los microorganismos más utilizados en el control biológico de plagas agrícolas.

Cuadro 8. Plagas de lepidópteros y coleópteros más comunes y de gran importancia en el país.

Nombre común	Género	Larva y adulto	Daño causado a los cultivos
Gusano del bellotero	<i>Heliothis</i>		destruye las bellotas del algodón, los elotes del maíz, y la yema del tabaco.
Gusano trozador negro	<i>Agrotis</i>		atacan el follaje de casi todas las plantas, especialmente del algodonero, col, frijol, y maíz.
Mayate rayado	<i>Diabrotica</i>		barrenan las raíces y tallos. Atacan frijol, soya, melón, pepino, sandía, papa y berenjena.

7.1.2. Toxicología de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con otros agentes de control de insectos plaga.

Kuz'min *et al.* (1991) reportan un estudio cuyo propósito es construir genes derivados de las toxinas del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* (HD-1) que puedan ser capaces de codificar proteínas que posean simultáneamente: actividad insecticida y enzimática de kanamicina-fosfotransferasa de β -glucuronidasa, y expresarse normalmente en plantas. Mencionando que el gen VI del virus del mosaico de la coliflor, fue usado para obtener una codificación secuencial completa de la δ -endotoxina. Los resultados del estudio confirmaron la posibilidad de obtener proteínas bifuncionales, señalando que los genes derivados de estas proteínas, son potencialmente capaces de expresarse en plantas y podrán ser usados en la obtención de plantas transgénicas con un incremento de resistencia a insectos.

Molina *et al.* (1991) comentan que la δ -endotoxina producida durante la esporulación por el *Bacillus thuringiensis* de la llamada variedad *berliner* (serotipo 1) y por la variedad *kurstaki*; presenta el mismo poder larvicida contra varias familias de lepidópteros; señalando que la expresión transgénica de la δ -endotoxina en plantas, confiere protección del ataque larval. Por lo tanto describen la incorporación del gen codificador de δ -endotoxina del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* dentro del genoma de *Nicotiana tabacum* variedad *Petit Havana*, usando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como sistema. La reacción de este gen fué analizada

evaluando la actividad biológica de las plantas transgénicas y de su progenie, por medio de pruebas de infestación con larvas de Heliothis virescens (gusano del tabaco).

Benedict *et al.*, (1992) citan la evaluación de la resistencia de seis líneas de algodón, al gusano de los brotes del tabaco Heliothis virescens; mencionando cuatro líneas de algodón conteniendo clones transgénicos de la δ -endotoxina del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki, y dos líneas de control, una marcada con un antibiótico resistente y la otra sin control transgénico: reportando finalmente que las líneas transgénicas de Bacillus thuringiensis no hicieron expresión de la δ -endotoxina a nivel suficiente para ser relativamente de gran influencia sobre la conducta larval, crecimiento, supervivencia, o daño de la planta.

Merryweather *et al.*, (1990) mencionan que el gen codificador de la δ -endotoxina del Bacillus thuringiensis subespecie kurstaki HD-73, fué insertado en el genoma del baculovirus causante de la poliedrosis nuclear en insectos de la especie Autographa californica (gusano medidor): usando dos sistemas de control transgénico para obtener virus negativos y positivos en cuanto a la producción de poliedrina- δ -endotoxina. Las actividades biológicas de los dos virus recombinantes fueron evaluadas mediante pruebas de bioensayos sobre larvas de Trichoplusia ni (gusano falso medidor) infectadas por ingestión de extractos de partículas virales, o mediante lesiones corporales. En el análisis de las células larvales se detectaron protefínas de: 130, 162 y 44 Kilodaltons, con un pico máximo de síntesis a 18 horas post-infección, estas proteínas reaccionaron con el antisuero específico de la bacteria estudiada. El virus transgénico tuvo un valor en

la LD-50 (dosis letal media) dos veces más alto que el de un virus no modificado. Los datos obtenidos indicaron que la expresión del gen de la δ -endotoxina por un baculovirus produce material con actividad insecticida.

Prasad y Kushwaha (1990) citan los resultados de un estudio cuantitativo relacionado con el insecto lepidóptero *Spodoptera litura* en plantíos de col y coliflor durante los años de 1975 y 1976: este estudio reveló una incidencia de enfermedades microbianas diagnosticadas como bacteriosis producidas por: *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Streptococcus* sp: entre larvas, pupas, y adultos del insecto; señalando que el pico de incidencia se suspendió durante Febrero-Marzo y Agosto-October. Para los cultivos de col y coliflor respectivamente.

Gallegos y Sánchez (1992) reportan la evaluación tóxica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra el gusano soldado *Spodoptera frugiperda* y el gusano de los brotes del tabaco *Heliothis virescens*, plagas de lepidópteros de importancia económica en México. Indicando que cada una de las cepas bacterianas aisladas, fué cultivada en medios de melazas suplementados con harina de soya. El complejo esporas- δ -endotoxina de cada cepa fué extraído al final de la fermentación para evaluar su toxicidad: siendo ésta, contra "el gusano soldado", y mayor a la presentada por la formulación estandar internacional: HD-1-S-1980, (concentración letal media, LC-50=6492 mu-g/ml. mili-unidades-gramo por mililitro); estas cepas codificadas como GM-L, GM-8, GM-9, GM-10 y GM-11; tuvieron un valor en su LC-50 de: 92.5, 77.1, 275.1, 59.0 y 185.3 mu-g/ml, respectivamente. La LC-50 de la cepa GM-10, (19.3 mu-g/ml) también excedió a la presentada por la formulación estandar internacional: HD-1-

S-1981, (21.6 mu-g/ml) contra "el gusano de los brotes del tabaco". Comentando finalmente que la cepa GM-10 puede ser considerada como una de las mejores y selectas para el control de lepidópteros en México.

Whitlock *et al.*, (1991) mencionan que los estándares del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* (HD-1) y los productos formulados resultados de esta cepa pueden mostrar limitada patogenicidad al gusano cortador del tabaco (*Spodoptera litura*). Sin embargo reportan dos nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* (K-2074 y K-2173) aisladas en Taiwan, que han sido identificadas como altamente patógenas para el gusano cortador del tabaco.

Ferro y Lyon (1991) reportan los efectos producidos por el *Bacillus thuringiensis* subespecie *san diego* (aislamiento agrupado como biovariedad) sobre larvas de diferente estado del escarabajo colorado de la papa, a concentraciones diversas y condiciones diferentes de temperatura, mencionando que la aplicación de esta bacteria necesita más tiempo de exposición larval para el tratamiento del follaje, por lo menos de 6 a 8 horas cuando la temperatura exceda a 24°C.

Karamanlidou *et al.*, (1991) llevaron al cabo, un estudio de ciertos *Bacillus thuringiensis* recobrados del medio ambiente de plantaciones de olivo, en Grecia. Mencionando que de 80 aislamientos 24 presentaron inclusiones cristalinas parasporales; estas bacterias cristalíferas fueron utilizadas como testigo de toxicidad contra insectos voladores (moscas negras) del olivo (*Dacus oleae*). Los niveles de toxicidad exhibidos por los diferentes aislamientos bacterianos, variaron de 7 a 87%.

Observando altos niveles de mortalidad con mezclas de cristales y esporas; en comparación con la mortalidad resultante de cualquier fracción (cristales o esporas) sola. Señalando que los aislamientos bacterianos más activos, fueron mortalmente específicos para Dacus oleae.

Keill (1991) reporta la evaluación de campo y laboratorio de una formulación de Bacillus thuringiensis variedad israelensis, codificada como: ABG-6193; utilizada como testigo de toxicidad contra larvas de insectos voladores (moscas negras) de zetas: Agaricus biosporus (Lange); señalando que esta formulación o formulaciones similares tienen buen potencial para el manejo de plagas en zetas comerciales.

Walgenbach y Estes (1992) realizaron un estudio en 1988 y 1989, para determinar los beneficios económicos asociados con el uso de varios pesticidas en cultivos de tomate, en el noroeste del estado de Carolina, E.U.A., mencionando que el gusano del tomate Helicoverpa zea (Boddie), fue la plaga de insectos más importante que causó pérdidas en 3,385 y 941.0 hectáreas de cultivo en los años de 1988 y 1989 respectivamente. Reportando también, el daño indirecto causado por el insecto plaga de patatas, y por el gusano de la fruta del tomate; que fueron controlados con el insecticida químico Carbarilo y con el insecticida biológico Bacillus thuringiensis. Señalando que los insecticidas químicos de amplio espectro, como: Endosulfán, Esfenvalerato y Metomilo; fueron por lo general más provechosos que el Carbarilo y el Bacillus thuringiensis; registrándose que en las condiciones del tiempo seco del año de 1988, muchos insecticidas fueron provechosos en un intervalo de 5 a 10 días; y en las condiciones de humedad del año de 1989, el corto efecto residual de los insecticidas

Metomilo y *Bacillus thuringiensis*; fué netamente alto y provechoso incrementándose a 5 días de intervalo.

Bellows *et al.*, (1992) mencionan un estudio relacionado con la toxicidad residual de 14 productos insecticidas comerciales usados para la supresión de *Euseius stipulatus* Athias Henriot (Acarina, Phytoseiidae); en árboles de cítricos. Señalando que varios de los insecticidas estudiados, tuvieron pequeños efectos sobre *Euseius stipulatus* después de 7 días post-tratamiento; entre los que se incluyeron algunos como: Triclorfon, Naled, Paration, Clorpirifos, Mevinfos, y una formulación de *Bacillus thuringiensis*; mencionando también que algunos otros insecticidas como: Carbosulfan, Thiocarb, Metomilo, y dos formulaciones de Carbarilo; causaron una mortalidad por arriba de 30 días. Sin embargo, los insecticidas Fluvarinato y Esfenvalerato causaron la mayor mortalidad por arriba de 60 días post-tratamiento. La mortalidad fué correlacionada con la cantidad de residuos tóxicos depositados por cada producto insecticida testigo; de los cuales algunos presentaron pequeños efectos sobre la fertilidad.

Tabashnik *et al.*, (1990) indican que los insecticidas comerciales, formulados a base del complejo de esporas-cristal del *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*, originaron el desarrollo de resistencia, en poblaciones de campo de una de las plagas de lepidópteros más importantes en vegetales, la palomilla diamante negro: *Plutella xylostella*. Bioensayos de la larva presentaron que la concentración que produce el 50 y el 95% de mortalidad, (LC-50 y LC-95); en el campo de población de la palomilla diamante negro, tratado repetidamente con el *Bacillus thuringiensis*; fué de 25 a 35 veces más prolongado que en las respectivas LC-50'' y LC-95'' para dos poblaciones de

laboratorio susceptibles. El porcentaje de mortalidad en el campo, con el *Bacillus thuringiensis*, fué de 34 a 35% en dos poblaciones resistentes; comparadas con el 90 a 100% en el caso de las poblaciones susceptibles. Mencionando que el resultado sugiere que el potencial para el desarrollo de resistencia en poblaciones de insectos, es una importante consideración para el despliegue de genes tóxicos de *Bacillus thuringiensis* por medio de la ingeniería genética en las plantas, así como el uso de *Bacillus thuringiensis* en tácticas relacionadas con este método.

Song (1991) menciona el descubrimiento de grandes diferencias inter-regionales en la concentración letal media del *Bacillus thuringiensis* Berliner. Indicando que el LC-50 de esta bacteria resultó ser, de 5.5 partes por millón para la palomilla diamante negro perteneciente a la cepa KN-A, otra de estas cepas, la Pyungchang, presentó una resistencia de más de 40 veces comparada con la anterior; y la cepa JMC; susceptible a insecticidas químicos piretroides, también presentó, resistencia de 12 veces más, al *Bacillus thuringiensis*; sugiriendo ésto, diferencias en cuanto a mecanismos de resistencia entre piretroides y *Bacillus thuringiensis*.

7.2. Aspecto forestal

7.2.1. Importancia de las plagas forestales

La importancia de estos insectos plaga, como organismos perjudiciales, se manifiesta por el deterioro de los bosques implicando bajos rendimientos en sus producciones y afectando sus valores estéticos y recreativos; además de los daños que causan al monte, estos insectos se consideran también como productores de molestias y, a veces, de

problemas de salud en los trabajadores forestales y personas que transitan o utilizan el monte (Cadahia y Robredo, 1985).

Rodríguez (1990) menciona que la cuantificación de la diversidad de los daños causados por los insectos, es difícil de medir, y en México se ha dado poca atención al desarrollo de procedimientos para estimar y consignar estos daños en forma más o menos precisa.

El manejo de plagas epidémicas en grandes áreas boscosas, resulta muy difícil a causa de diversos factores como son: condiciones climáticas, topografía del lugar afectado, naturaleza del bosque, tipos de insecticidas químicos o biológicos registrados para su uso y tecnologías disponibles para la aplicación del insecticida (Ecobichon, 1990).

Cuadro 9. Superficies forestales afectadas por descortezadores y defoliadores.

Estados:	Inspección Hectáreas	Descortezadores		Defoliadores	
		Afectadas	Tratadas	Afectadas	Tratadas
AGUASCALIENTES	24.460	250	170		
BAJA CALIFORNIA	184.850	163			
CAMPECHE	117.698				
COAHUILA	171.228	194	32		
COLIMA	16.162	327	44		
CHIAPAS	455.150	3			
CHIHUAHUA	2.043.470	1.287	1.271		
DISTRITO FEDERAL	9.608	350	347	1.200	1.200
DURANGO	1.734.126	32	32		
DURANGO LAG.	15.000				
GUANAJUATO	222.500	51			
GUERRERO	373.250	1.168	331		
HIDALGO	239.712	22	23		
JALISCO	815.296	22	16		
MEXICO	360.784	150	32		
MICHOACAN	1.980.148	876	610		
MORELOS	20.707	356	61		
NAYARIT	327.406	14		6	
NUEVO LEON	515.600	87	104	1.000	70
OAXACA	1.125.069	4.032	711	148	148
PUEBLA	143.756	441	205		
QUERETARO	51.432	84	33		
QUINTANA ROO	500.000				
SAN LUIS POTOSI	309.691	115			
SINALOA	42.089				
SONORA	126.805			20	
TABASCO	19.688				
TAMAULIPAS	329.130	32	14		
VERACRUZ	185.756	227	101		
YUCATAN	485.977				
ZACATECAS	650.324	320		20	
TOTALES	13.576.872	10.603	4.137	2.394	1.418

DSF Departamento de Sanidad Forestal, Dirección General de Protección Forestal y Fauna Silvestre. (1993). SARH.

Cuadro 10. Complejo de descortezadores de gran importancia en el país

Nombre técnico	Especie forestal atacada	Larva y adulto
<i>Dendroctonus</i> sp.	<i>Pinus</i> spp. Pino	

Rodríguez (1990)

Cuadro 11. Distribución de la superficie forestal

	Millones de hectareas
Superficie arbolada	40.5
Vegetación arbustiva	27.4
Matorrales	56.4
Áreas perturbadas	17.0
Vegetación hidrófila	1.5

Reyes y Borja (1980)

7.2.2. Toxicología de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con otros agentes de control de insectos plaga.

Ojeda y Carbajal (1990) mencionan que en México, se han realizado pocos trabajos de control biológico, los cuales se han enfocado hacia el control de insectos defoliadores, donde se incluye la utilización del *Bacillus thuringiensis* Berliner.

Rodríguez (1990) señala que el control biológico no se practica con frecuencia en los insectos descortezadores, porque parece que son más importantes los factores climáticos y de nutrición, en la aparición de estas plagas; mencionando también que en pruebas efectuadas en el año de 1974, aplicando los inoculantes: Dipel y Thuribac (a base de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*), en la región lacustre de Xochimilco sobre árboles de ahuejote *Salix spp.*, para el combate del gusano de Bolsa del Sauce *Malacosoma azteca* Neum., Dipel, proporcionó el mejor control de esta plaga.

Pineda y Canseco (1991) mencionan que en 1986, se detectó en los bosques de Abies religiosa de la parte central del país, un brote explosivo del defoliador del Oyamel *Evita hialinaria blandaria* (Diar), implementándose una campaña para su combate en la cual se utilizó un bioinsecticida formulado a base del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*; y debido a la proximidad de las zonas tratadas con los sitios de invernación de la mariposa monarca (*Danus plexippus*), se llevó al cabo una determinación de susceptibilidad de los adultos de esta especie de mariposa a la bacteria. El estudio fué realizado durante 1988-1989; mediante pruebas de campo y de laboratorio, exponiendo poblaciones de la mariposa a diferentes concentraciones del bioinsecticida. Los resultados obtenidos

indicaron que la mortalidad registrada fue causa de varios factores entre los que se encuentran: el aumento de los requerimientos alimenticios de la monarca, la mortalidad natural que se presenta al finalizar la temporada de invernación, la presencia natural de otros agentes microbianos, y el manejo del que fueron objeto las mariposas. Señalando que en ninguno de los tratamientos empleados, se observaron efectos letales que pudieran atribuirse terminantemente al *Bacillus thuringiensis*.

Novo Biokontrol (1988) comentan que en algunos países como Canadá y algunas provincias de Estados Unidos, los programas de protección forestal, dependen totalmente de los pesticidas formulados con la bacteria *Bacillus thuringiensis*; como el producto llamado Foray™ 48-B, que ha sido desarrollado con base en esta bacteria; presentando efectividad contra el gusano de la polilla, *Lymantria dispar*; y el gusano de píceas, *Choristoneura fumiferana*; plagas de gran importancia forestal.

Bernier et al. (1990) explican que Biodart™ es una preparación de *Bacillus thuringiensis* con base acuosa, relacionada con el desarrollo de bioinsecticidas para el control de *Choristoneura fumiferana* variedad *clemens* (gusano de los brotes del abeto), *Lymantria dispar* (gusano de la polilla), y *Malacosoma disstria* (gusano telarañoso), en bosques. El producto contiene una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *canadensis* (A-20); seleccionada por la alta potencia intrínseca y amplio espectro de actividad.

Ecobichon (1990) comenta que desde 1952, la provincia de New Brunswick, Canadá, ha realizado ensayos en el control de epidemias producidas por el gusano de

los brotes del abeto (*Choristoneura fumiferana* variedad *clemens*), habiéndose desarrollado actualmente un programa de rocío aéreo mediante dos insecticidas químicos (Fenitroion y Aminocarb), y un agente de control biológico (*Bacillus thuringiensis*). Considerando la posibilidad de efectos adversos en el hombre se realizó un estudio extensivo de la toxicología de estos pesticidas, así como de las tecnologías de aspersión aérea, para obtener una mejor protección de las zonas de habitación humana.

Sundaram y Sundaram (1992) citan el desarrollo de un método de bioensayo sobre la mariposa de la polilla (*Lymantria dispar*) a nivel de campo y laboratorio, para determinar la persistencia de las proteínas del *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* en el follaje de robles después de la aplicación aérea de la formulación comercial Foray 48-B.

Van et al. (1992) comparan la actividad insecticida de los cultivos esporulados de las cepas del *Bacillus thuringiensis*: HD-1 y NR-12 de la subespecie *kurstaki*; contra cuatro especies de lepidópteros defoliadores de bosques, usando ensayos de incorporación de dietas. Señalando que no hubo diferencias en la concentración letal media (LC-50) entre las dos cepas patógenas para: larvas del gusano de los brotes del abeto (*Choristoneura fumiferana*), polilla gitana (*Lymantria dispar*), gusano del abeto americano (*Lambdina fiscellaria*) y polilla blanqueadora (*Orgyia leucostigma*). Ambas cepas fueron considerablemente más tóxicas que la formulación estándar internacional: HD-1S-1980, comparadas sobre bases de solubilización de proteínas alcalinas, pero no sobre las bases de actividad tóxica o unidades internacionales. La hibridación del genoma del DNA reveló la presencia de tres genes codificadores del cristal CryIA, en

cada uno de los aislamientos bacterianos usados en este estudio, en el cual se incluyó también a la cepa de la formulación HD-1-S-1980, que exhibió pérdida de los genes codificadores del cristal CryIA productores de toxina.

Cuadro 12. Insectos fitopatógenos controlados con el insecticida biológico Dipel (<i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>kurstaki</i>)		
		Insectos plaga
Cultivos	Nombre común	Nombre técnico
AJONJOLI	Gusano medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Falso medidor	<i>Pseudoplusia</i> sp.
ALCACHOFA	Gusanos	<i>Platyptilia</i> sp.
ALFALFA	Gusano de la alfalfa	<i>Colias</i> sp.
	Gusano medidor	<i>Autographa</i> sp.
ALGODON	Gusanos cortadores	<i>Agrotis</i> sp., <i>Prodenia</i> sp.
	Gusano medidor	<i>Alabama</i> sp.
	Gusano menor de la hoja	<i>Anonis</i> sp.
	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano bellotero	<i>Heliothis</i> sp.
ALMENDRO	Gusano soldado	<i>Spodoptera</i> sp.
	Gusano barrenador	<i>Anarsia</i> sp.
APIO	Medidor del apio	<i>Anagrapha</i> sp.
	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano cogollero	<i>Heliothis</i> sp.
BERENGENA	Gusano del cuerno	<i>Manduca</i> sp.
BANANA	Gusano de la hoja	<i>Ceramidia</i> sp.
CRUCIFERAS		
Col	Gusano de la col	<i>Pieris</i> sp.
Brocoli	Palomilla	<i>Plutella</i> sp.
Coliflor	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusanos cortadores	<i>Agrotis</i> , <i>Prodenia</i>
CUCURBITACEAS		
Melones	Perforador del melón	<i>Diaphania</i> sp.
Pepinos	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
Sandías	Gusano del fruto	<i>Heliothis</i> sp.
	Gusanos cortadores	<i>Agrotis</i> , <i>Prodenia</i>
CANA DE AZUCAR	Gusano de la hoja	<i>Calisto</i> sp.
	Gusano barrenador	<i>Diatraea</i> sp.
CIRUELO	Gusano del cáncer de primavera	<i>Paleacrita</i> sp.
COCOTERO	Gusano listado cabezón	<i>Brassolis</i> sp.
CHILE	Gusano del cuerno	<i>Manduca</i> sp.
ESPINACA	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Palomilla	<i>Plutella</i> sp.
FRESA	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano cogollero	<i>Heliothis</i> sp.
FRIJOL	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Enrollador de la hoja	<i>Eudamus</i> sp.
GARBANZO	Gusano del fruto	<i>Heliothis</i> sp.
GRANOS		
Arroz		
Maiz	Gusanos cortadores	<i>Agrotis</i> , <i>Prodenia</i> sp.
Sorgo	Gusano cogollero	<i>Spodoptera</i> sp.
GIRASOL	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
LECHUGA	Palomilla	<i>Plutella</i> sp.
	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano de la col	<i>Pieris</i> sp.

Cultivos	Insectos plaga	
	Nombre común	Nombre técnico
MANZANO	Gusano del cáncer de primavera	<i>Paleacrita</i> sp.
MANI O CACAHUATE	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
MOSTAZA	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
Y	Palomilla	<i>Plutella</i> sp.
NABO	Mariposa blanca	<i>Pieris</i> sp.
NARANJA	Gusano perro	<i>Papilio</i> sp.
	Tortricido sp.	<i>Argyrotaenia</i> sp.
	Enrollador de la hoja	<i>Archips</i> sp.
	Gusano negro	<i>Papilio</i> sp.
PALMA AFRICANA	Gusano listado	<i>Brassolis</i> sp.
	Gusano cabrito	<i>Opsiphanes</i> sp.
PAPAS	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano del cuerno	<i>Manduca</i> sp.
	Enrollador de la hoja	<i>Eudamus</i> sp.
REMOLACHA	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
PEREJIL	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
TABACO	Gusanos cortadores	<i>Agrotis Prodenia</i> sp.
	Gusano primavera o cachudo	<i>Manduca</i> sp.
	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano cogollero	<i>Heliothis</i> sp.
TOMATES	Falso medidor	<i>Trichoplusia</i> sp.
	Gusano del cuerno o cachudo	<i>Manduca</i> sp.
	Gusano del fruto	<i>Heliothis</i> sp.
VID	Esqueletozador	<i>Harrisina</i> sp.
	Enrolladores	<i>Desmia</i> sp., <i>Tortrix</i> sp.
YUCA	Gusanos de las hojas	<i>Manduca</i> sp.
FORESTALES	Gusano telarañoso	<i>Malacosoma</i> sp.
	Gusano del cáncer	<i>Alsophila</i> sp.
	Gusano del pinabete	<i>Choristoneura</i> sp.
PLANTAS	Gusano cartucho	<i>Thyridopteryx</i> sp.
ORNAMENTALES	Gusano telarañoso	<i>Malacosoma</i> sp.
	Gusano del cáncer	<i>Alsophila</i> sp.

Laboratorios Abbott, (1970).

7.3. Aspecto médico

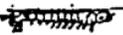
7.3.1. Importancia de los artrópodos de interés médico

La importancia de los artrópodos en medicina humana se puede resumir en cuatro puntos principales:

- ◊ Actúan como transmisores de agentes etiológicos causantes de enfermedades;
- ◊ como productores de enfermedad;
- ◊ como causa de molestias; y
- ◊ ocasionando grandes pérdidas económicas en comunidades o países que sufren la presencia de estas plagas.

El papel principal de estos artrópodos, es el que realizan como transmisores de agentes etiológicos productores de enfermedades. Se les denomina transmisores (vectores) porque durante su vida son capaces de transmitir o transferir los agentes infectantes de los animales al hombre, de productos contaminados al hombre, de hombre a hombre, del hombre hacia animales, etc. La transmisión la pueden realizar en forma mecánica (por ingestión, aplastamiento, y diseminación por contaminación); o biológica (propagativa, cicloevolutiva, y ciclopropagativa). Entre los artrópodos uno de los órdenes más importantes desde el punto de vista médico, es el de los Dípteros (dos alas), nematoceros y ortórrafos, que comprende las familias: Culicidae (mosquitos), Simuliidae (moscas negras), Ceratopogonidae (jejenes), y Muscidae (moscas) entre otras (Tay et al., 1990)

Cuadro 13. Enfermedades importantes en el país transmitidas al hombre por insectos vectores.

Enfermedad	Agente etiológico	Vector	Larva y adulto	
Dengue	Virus ARBO	<i>Aedes</i> sp.		
Paludismo	<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Anopheles</i> sp.		
Oncocercosis	<i>Onchocerca volvulus</i>	<i>Simulium</i> sp.		

7.3.2. Toxicología de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con otros agentes de control de insectos vectores de enfermedades humanas

Rodríguez et al., (1991) presentan los resultados obtenidos en la evaluación de una formulación conteniendo al *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*, como ingrediente activo; explicando que a partir de la formulación estándar internacional codificada como: IPS-82, se obtuvo una bacteria que fue multiplicada en un medio de melazas y extracto líquido de maíz; mencionando que la potencia de las esporas-cristal de esta bacteria, se determinó sobre larvas de mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), dando un resultado de 3571.42 UTI/mg (unidades tóxicas internacionales por miligramo), que comparada con la potencia estándar internacional, fue cinco veces menos potente. La potencia de la formulación obtenida en el laboratorio se probó a nivel de campo sobre los mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex* sp (Diptera: Culicidae), obteniéndose un resultado de : 109.1 UTI/mg y 77.92 UTI/mg respectivamente. Mencionando que estas especies de culcídos, están ampliamente distribuidas en el sureste de México, y son vectores de enfermedades como el Dengue y Encefalitis víricas.

Carmona y Espinoza (1991) comentan que la prevalencia de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae), transmisores potenciales del Dengue clásico, Dengue hemorrágico, y Fiebre amarilla, así como de la Encefalitis de San Luis, Encefalitis equina, y de la Elefantiasis, en el estado de Chiapas; que a pesar de la aplicación de los insecticidas como el Malatión y Abate; hacen de éste, un lugar prioritario para el control integral de los vectores, comprendiendo la unión de métodos

físicos, químicos, y biológicos. En el trabajo realizado, se probó la acción larvicida de cepas chiapanecas de *Bacillus thuringiensis* codificadas como: CTM1 y CTM2, y *Bacillus Sphaericus* clasificados como: 1A, 3A, y 2B; comparando la toxicidad resultante con la presentada por las cepas comerciales: Bactimos H-14, Abbott 2362, y el pesticida químico ABATE, sobre larvas de segundo y tercer estadio de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens quinquefasciatus*. Señalando que los resultados demostraron la alta eficacia de la cepa CTM1 en el control de ambos vectores, siendo *Aedes aegypti* más susceptible ya que con una concentración de 0.0088 mg/l (miligramos por litro) se presentó una mortalidad de 95% mientras que en el caso de *Culex pipiens quinquefasciatus* esta misma mortalidad se obtuvo con 0.137 mg/l. Observándose también la poca toxicidad de las cepas chiapanecas de *Bacillus sphaericus*, puesto que algunas requirieron más de 1 gr/l. para causar menos del 50% de mortalidad. La cepa Abbott presentó considerable toxicidad hacia los vectores sobre todo en el control de *Culex pipiens quinquefasciatus*. Al comparar la respuesta de los vectores hacia el pesticida químico; *Culex pipiens quinquefasciatus* resultó más sensible que *Aedes aegypti* en concentraciones de 0.01 mg/l y 0.03 mg/l, respectivamente para el 95% de mortalidad.

Ortegón y Quiroz (1990) analizan cuantitativamente los efectos de la cepa GM-10 del *Bacillus thuringiensis* en los procesos de predación del hemíptero acuático *Buenoa* sp. sobre larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mencionando que la predación del hemíptero acuático sobre nueve poblaciones de mosquitos, ocurrió rápidamente en tres días; realizándose un conteo de las presas consumidas en 24 horas. Los resultados fueron calculados mediante pruebas de líneas de regresión, coeficiente de

correlación de Pearson, determinación de coeficientes, y respuesta funcional tipo II de Holling's. Al aplicar la concentración letal media (LC-50) de la cepa GM-10, sobre la población larval y el hemiptero, la predación se incrementó presentando un importante efecto sinérgico entre ambos, báculo y predador sobre el control integral de mosquitos.

Karch et al., (1991) mencionan que bajo condiciones de campo en Kinshasa, Zaire, una suspensión acuosa de *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14, Vectobac-G (12-AS); perdió su actividad larvicida después de 48 horas, contra los mosquitos: *Culex pipiens quinquefasciatus*, criados en agua de arroyo; y *Anopheles gambiae*, criados en un estanque irrigado con agua clara. Reportando la obtención de un buen control de *Culex pipiens quinquefasciatus* usando una formulación granular de *Bacillus sphaericus*, Vectolex-G (ABG-6185), a concentraciones de 10 a 30 Kg/ha ; usando altas concentraciones de esta misma formulación, se obtuvo un excelente control de *Anopheles gambiae*. Señalando, que Vectobac-G fué menos activo que Vectolex-G pese a una buena dispersión de sus partículas.

Pipitgool et al., (1991) reportan un bioensayo de laboratorio usando la preparación comercial Skeetal con base en el *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14, contra larvas de tercer estadio tardío y cuarto estadio temprano de *Aedes aegypti*, (Diptera : Culicidae). Las larvas fueron colectadas de áreas municipales de siete provincias del noreste de Tailandia; el rango de la concentración letal media (LC-50) fué de 128 a 151 nlb/l (nanolibras por litro) y el de la concentración letal para el 90% de la población (LC-90) fué de 254 a 298 nlb/l. Los resultados obtenidos en los bioensayos indicaron que el producto comercial Skeetal fué muy efectivo.

Roberts (1991) reporta el uso de un líquido monofásico como propagador de la bacteria *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* sobre la superficie del agua indicando que a nivel de laboratorio se examinaron las propiedades de propagación y transporte de este líquido. Usando gotas con una concentración de 0.5 a 5% de la bacteria, en el líquido propagador, y aplicándose éste sobre un extremo de la superficie de una extensión de agua contenida en un tanque de dos metros de longitud; se pudo observar que en menos de dos minutos, una sola capa molecular cubrió íntegramente los dos metros de superficie, depositando a la bacteria; la cual presentó actividad letal sobre larvas de mosquitos testigo en 24 horas, considerando que no hubo ninguna vegetación presente para la desoxigenación nocturna del agua. Mencionando finalmente que el transportador de la bacteria puede propagarla a más de 15 metros de longitud; por lo que puede ser aplicado sin utilizar ningún equipo de aspersión.

Misch *et al.*, (1992) citan un nuevo sistema de bioensayo para evaluar altas concentraciones de mezclas: espora-cristal del *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* contra larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae); describiendo que las larvas fueron separadas en forma individual para la exposición a la toxina en pequeñas líneas de vidrio a manera de portaobjetos o frascos de cultivo, para evitar la predación entre larvas y poder evaluar libremente la toxicidad del insecticida biológico; considerando que en los bioensayos se utilizan grupos de 25 larvas, como se indica por lo común en la guía de la Organización Mundial de la Salud; este sistema aporta por lo tanto un breve testimonio de incremento de exactitud y mejoramiento, de precisión estadística.

Hougard *et al.*, (1992) mencionan el tratamiento de una sección de 30 km. del río Senega (Camerún) con el insecticida químico Permetrina, para el control de poblaciones larvales de *Simulium squamosum* (Díptera : Simuliidae). Señalando que en el año de 1990, la resistencia a Permetrina ocurrió en una pequeña población de larvas, con un resultado de 2 a 4 veces de incremento en la concentración que produce el 95% de mortalidad (LC-95), por larva muerta (las larvas moribundas fueron consideradas como vivas), y en 1991 después de seis meses sin tratamiento la resistencia de las larvas al insecticida se redujo al nivel inicial, y fué similar a la que presentaron las larvas del *Simulium squamosum* de una sección del río no tratada; por lo que se concluye partiendo del contexto de un programa de control a pequeña escala, que la resistencia a Permetrina puede ser reversible, proponiéndose la alternación con otros tipos de insecticidas, como: *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis*.

Andrade y Branco (1991) reportan la susceptibilidad de *Simulium pertinax* Kollar (Díptera : Simuliidae) a los entomopatógenos: *Temphos* y *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*, proponiendo para la realización de estas determinaciones el establecimiento de canales de madera en ríos o arroyos; siendo éstos, colonizados artificialmente con larvas del volador negro *Simulium pertinax* Kollar. La susceptibilidad larval de esta especie de simúlido fué evaluada en términos de tiempo letal medio (LT-50); en el campo de ensayo las poblaciones larvales del litoral de San Paulo y Río de Janeiro (Brasil) presentaron resistencia a *Temphos*, igualmente cuando fueron sujetas a la acción de altas concentraciones; el producto comercial Vectobac 12-AS, formulado con base en la bacteria *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*, resultó ser más potente contra larvas de estadio tardío y eficiente en concentraciones

altas, tales como: 7.200 UTI/l (unidades toxicas internacionales por intervalo de tiempo, 10 minutos). El LT-50 a una potencia de 3.744 UTI/l (10 minutos) fue calculado dando un resultado de 70.9 minutos.

Barton et al., (1991) desarrollaron un método de laboratorio, para determinar el potencial tóxico de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* contra larvas de simúlidos, volador negro empleando un agitador magnético para crear una corriente de agua en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo a las larvas de prueba. Aclarando que este sistema produjo dosis de mortalidad, relacionadas con parámetros estadísticos aceptables.

De Barjac (1984) reporta un estudio con larvas de tercer y cuarto estadio de *Culicoides mississippiensis* (Diptera : Ceratopogonidae), jejenes mordedores; expuestas a varias diferentes concentraciones de una formulación de polvo humectable de *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14; señalando que no hubo registro de mortalidad. La patogenicidad del *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14 sobre larvas de la mosca casera *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), también fue determinada reportándose como muy baja, y únicamente a concentraciones extremadamente altas de la bacteria se obtuvieron efectos sobre las moscas adultas; explicando que con una concentración de 500 g/l del *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14 en una mezcla de azúcar y leche evaporada, se indujo solamente un 21% de mortalidad.

Osman et al., (1992) reportan estudios sobre la actividad molúcida de diferentes preparaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*, tales como: Thuricide, SAN-401,

y SAN-416 sobre *Biomphalaria alexandrina*, caracol vector de la Schistosomiasis en Arabia Saudita; señalando que los resultados obtenidos con las preparaciones comerciales, exhibieron notable actividad sobre este molusco; siendo la preparación SAN-416 la más efectiva en mortalidad.

8. DISCUSION

Referente a la clasificación de las cepas del *Bacillus thuringiensis*, se conocen actualmente 27 grupos antigénicos y 7 subgrupos que conforman un total de 34 serotipos, subespecies o variedades; de las cuales las más estudiadas, con base en los reportes obtenidos han sido las siguientes: *kurstaki*, *israelensis*, *morrisoni*, *keniae*, *aizawai*, *thompsoni*, *alesti* y *galleriae*.

En estos reportes también se observó el uso de supuestas variedades o serovariedades de la bacteria, como en el caso de : *Bacillus thuringiensis* perteneciente a la llamada "variedad" "*berliner*" (serológicamente conocida como: *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis* , serotipo H-1); *Bacillus thuringiensis* "subespecie" "*dendrolimus*" (correspondiente actualmente a la serovariedad *sotto*, serotipo 4a4b); y de las nombradas "subespecies" "san diego" y "*tenebrionis*"; de las cuales se indica, representan solo patovariedades o biovariedades; muy similares entre sí, en cuanto a sus antígenos H, por lo que se argumenta, no poderse agrupar como aislamientos diferentes. Debido al constante incremento en el número de estos aislamientos patogénicos, se ha creado confusión entre nuevas supuestas variedades de *Bacillus thuringiensis*; por lo que se sugiere emplear la clasificación serológica para restringir el uso de falsas serovariedades.

La información de los trabajos relacionados con la bacteria *Bacillus thuringiensis*, procede de diferentes países como sigue:

En Japón, se identificó una bacteria con características similares al *Bacillus thuringiensis* serovariedad *Japonensis*, con actividad tóxica para determinadas especies de escarabajos.

En Italia, aislaron una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* codificada como: NCIMB 40162 con actividad insectida para coleópteros.

En Taiwan, reportan dos nuevos aislamientos de *Bacillus thuringiensis* patógenos para insectos de la especie *Spodoptera litura*.

En Kenia, se aislaron bacterias tóxicas para los mosquitos, siendo identificadas como variedades de *Bacillus thuringiensis*.

En Colombia, se aisló un nuevo serotipo de *Bacillus thuringiensis*, sugiriéndose el nombre de Medellín para esta subespecie que presenta actividad tóxica para mosquitos.

Se discute la localización de la actividad tóxica en los cristales polipeptídicos del *Bacillus thuringiensis*, así como la presencia de centros receptores en las células epiteliales del intestino medio del insecto relacionados con el inicio de la toxicidad:

En E.U.A., reportan que el azúcar N-acetilgalactosamina, forma parte del receptor del epitelio intestinal del insecto, que reconoce a las proteínas tóxicas del *Bacillus thuringiensis*; en este mismo país, mencionan que el grupo amino terminal medio de las moléculas del cristal proteínico, confiere la actividad tóxica al *Bacillus thuringiensis* de la variedad *kurstaki* y de la llamada variedad *berliner* (serotipo 1); incluyéndose

también el estudio del grupo carboxil terminal medio de las proteínas híbridas de los cristales: CryIA y CryIC, del cual se indica, presentar capacidad para unirse a receptores afines que confieren actividad insecticida.

En cuanto a la histopatología de intoxicación con el cristal proteínico, se utilizan líneas celulares de insectos para poder caracterizar el modo de acción de la δ -endotoxina ; que supone la creación de una serie de eventos fisicoquímicos al interactuar con la membrana del intestino medio del insecto.

Mediante pruebas de laboratorio realizadas en la Universidad de Georgia, E.U.A., se obtuvieron cepas de Bacillus thuringiensis mutantes en la producción de cristal proteínico para demostrar que la síntesis de la δ -endotoxina está asociada a plásmidos de alto peso molecular.

La preparación de medios de cultivo para la bacteria Bacillus thuringiensis, está dirigida a optimizar la producción y el incremento de esporas- δ -endotoxina; por lo que se proponen algunos medios y técnicas que conducen a esta finalidad:

En Nigeria, reportan un medio de cultivo para el Bacillus thuringiensis cepa H-14, compuesto de restos cerveceros; con un rendimiento en la producción de esporas y cristales de 95%:

En Finlandia, describen un medio de cultivo compuesto de productos de soya y melazas: el cual produce buen crecimiento y producción de esporas- δ -endotoxina.

En la India, mencionan la utilización de forraje como medio de cultivo, llevando un control de la glucosa durante el proceso de fermentación para el Bacillus thuringiensis (H-14).

En Rusia, se indican condiciones de aireación favorables para un incremento de la biomasa celular del Bacillus thuringiensis; también en este país mencionan una técnica en la que se usa fluoresceína para determinar la viabilidad del Bacillus thuringiensis durante el proceso de la producción de la biomasa; y en Austria, se hace mención del uso de bioreactores fermentadores para la producción masiva del Bacillus thuringiensis.

La pérdida de efectividad de la δ -endotoxina a causa de los agentes ambientales, ha sugerido la obtención de cepas mutantes resistentes a la luz ultravioleta y al calor. Así como el estudio de la dispersión, adhesión, y destino de las esporas de la bacteria en los suelos y el medio acuático:

En Egipto, se menciona el desarrollo de cepas de Bacillus thuringiensis Berliner, resistentes al calor y a la luz ultravioleta.

En Israel, se ensayan técnicas de fotoprotección del componente tóxico del Bacillus thuringiensis.

En E.U.A., se realizan pruebas de la efectividad de ciertos agentes fotoprotectores.

En Pakistán, reportan los resultados de los efectos de hipertermia sobre la síntesis de proteínas de Bacillus thuringiensis con referencia especial al choque térmico.

En Japón, estudian la dispersión del Bacillus thuringiensis sobre el suelo, ocasionada por la lluvia.

En Rusia realizan una investigación de las propiedades adhesivas de las esporas de dos subespecies de Bacillus thuringiensis.

También en E.U.A., se analizan varios agentes adyuvantes y adherentes, utilizados en algunas formulaciones de Bacillus thuringiensis Berliner, subespecie kurstaki ; así como el efecto de las esporas del Bacillus thuringiensis en el medio acuático.

En Canadá . estudian la persistencia tóxica de los cristales del Bacillus thuringiensis variedad israelensis con relación a la clase de agua, sedimentos orgánicos y bajas temperaturas.

En el aspecto agrícola, se realizan ensayos con el Bacillus thuringiensis Berliner, para obtener plantas transgénicas conteniendo clones de δ -endotoxina, con la finalidad de aumentar la resistencia de éstas, al ataque de los insectos:

En Rusia, utilizan al virus del mosaico de la coliflor como vehículo de clonación de la δ -endotoxina del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki.

En Cuba, transfieren genes de δ -endotoxina del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki en plantas de tabaco.

En E.U.A., estudian: la conducta larval del gusano de los brotes del tabaco Heliothis virescens en líneas de algodón conteniendo clones transgénicos de δ -endotoxina del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki; así como la clonación del gen de la δ -endotoxina del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki en el genoma de baculovirus causantes de la poliedrosis nuclear en el gusano medidor Autographa californica.

La toxicidad de las cepas de Bacillus thuringiensis Berliner se evalúa contra las diferentes especies de larvas de insectos lepidópteros y coleópteros, de importancia económica; probando también las interacciones de estas bacterias junto con otros agentes de control de insectos plaga:

En México, valoran la toxicidad de Bacillus thuringiensis Berliner, contra el gusano soldado Spodoptera frugiperda y contra el gusano de los brotes del tabaco Heliothis virescens.

En la India, estudian el período de incidencia de enfermedades entre: larvas, pupas y adultos del insecto Spodoptera litura ; causadas por bacterias, entre las que se incluye al Bacillus thuringiensis.

En E.U.A., estudian los efectos tóxicos del Bacillus thuringiensis de la llamada variedad san diego, aplicado en diversas concentraciones y bajo condiciones de temperatura variable sobre diferentes estadios larvales del escarabajo colorado de la papa.

En Grecia, aislan cepas nativas de Bacillus thuringiensis a partir del medio ambiente de plantaciones de olivo, con exhibición de rangos de toxicidad entre 7 a 87% contra el insecto volador Dacus oleae.

En E.U.A., comparan los efectos de toxicidad residual de algunos productos químicos insecticidas y del bioinsecticida Bacillus thuringiensis; usados en el control de Euseius stipulatus (Acarina, Phytoseiidae) en árboles de cítricos.

En Honolulu, Hawai., reportan el desarrollo de resistencia de la palomilla diamante negro al Bacillus thuringiensis variedad kurstaki.

En Korea, reportan diferencias inter-regionales en la concentración letal media del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki contra larvas de la palomilla diamante negro.

En el aspecto forestal, y de acuerdo a los reportes obtenidos:

En México, el control biológico mediante el Bacillus thuringiensis Berliner, se ha dirigido hacia insectos defoliadores, tales como: el gusano de Bolsa del Sauce, Malacosoma azteca (Neum); y el defoliador del Oyamel, Evita hialinaria blandaria (Diar).

En Canadá y en algunas provincias de Estados Unidos, los programas de control forestal, dependen totalmente de los insecticidas con base en la bacteria Bacillus thuringiensis; las plagas de insectos más importantes mencionadas por estos países, son las siguientes: Lymantria dispar (gusano de la polilla), Choristoneura fumiferana (gusano del pinabete), Lambdina fuscicollis (gusano del abeto americano), Orgyia leucostigma (polilla blanquedora) y Malacosoma disstria (gusano telarañoso); sobre las cuales se practican ensayos toxicológicos con las diferentes formulaciones del Bacillus thuringiensis variedad kurstaki : utilizándose también, este insecticida biológico en programas de control integral.

Concerniente al aspecto médico: en México, se realizan ensayos de la efectividad tóxica de las formulaciones y de las cepas de Bacillus thuringiensis Berliner, contra los principales vectores de agentes causantes de enfermedades relevantes en el país tales como: el dengue, el paludismo, y la oncocercosis, entre otras.

En Zaire, comparan la actividad tóxica de una formulación comercial a base del Bacillus thuringiensis serotipo H-14, con una formulación granular de Bacillus sphaericus.

En Tailandia la preparación comercial Skeetal, con base en el Bacillus thuringiensis H-14, resultó ser muy efectiva contra larvas de Aedes aegypti (Diptera : Culicidae).

En E.U.A.. desarrollan un nuevo sistema de bioensayo con incremento de exactitud y mejoramiento de precisión estadística para evaluar la toxicidad del Bacillus thuringiensis subespecie israelensis contra larvas de Aedes aegypti.

En Littlehampton, analizan el uso de un líquido propagador del Bacillus thuringiensis variedad israelensis, sobre la superficie del agua.

En Camerún, proponen la utilización del Bacillus thuringiensis variedad israelensis, en forma alterna con insecticidas químicos, usados en el control de simúlidos; para evitar el desarrollo de resistencia de estas especies de insectos.

En Brasil, el producto comercial Vetobac 12-AS, formulado a partir del Bacillus thuringiensis variedad israelensis, fue potente y eficiente en concentraciones elevadas contra simúlidos (volador negro).

En la Universidad de Clemson, presentan un nuevo método de laboratorio para estimar la toxicidad de formulaciones del Bacillus thuringiensis variedad israelensis contra larvas del simúlido volador negro.

En París, Francia, reportan que la efectividad tóxica del Bacillus thuringiensis serotipo H-14, contra jejenes mordedores y moscas caseras, resultó ser negativa.

En Arabia Saudita; la preparación San-416 del Bacillus thuringiensis variedad israelensis fue efectiva en cuanto a actividad molúcida.

9. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS.

◊ La potencialidad del Bacillus thuringiensis para ser usado como agente de control biológico se debe a las características que presenta como insecticida biodegradable de amplia actividad tóxica y específica contra las larvas de una gran variedad de especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros.

Las ventajas que presenta el Bacillus thuringiensis sobre el uso de los insecticidas químicos confieren a esta bacteria un nivel de suma importancia en la protección de cosechas y conservación de alimentos para el hombre; formando parte de la dinámica de aminoramiento de los efectos adversos, registrados entre los organismos y el medio ambiente.

◊ Tomando como base los reportes de los avances en el control biológico usando al Bacillus thuringiensis, se puede decir, que las posibilidades de aplicación de esta bacteria, tienden a aumentar y además se abren a nuevos campos de uso para un futuro exitoso.

Los aislamientos de nuevas cepas y serotipos, así como las caracterizaciones patogénicas del Bacillus thuringiensis, han sido reportados en diversas partes del mundo; lo cual indica la importancia que tiene el estudio de esta bacteria, y su gran relevancia como agente de biocontrol en diferentes áreas de la actividad agropecuaria, forestal y médica.

◊ La inactivación del componente tóxico del Bacillus thuringiensis por agentes ambientales y su corta persistencia en el campo reducen su efectividad; por lo cual la biotecnología y la genética están tratando de superar estos limitantes.

Para aprovechar mejor las aplicaciones del Bacillus thuringiensis, la ingeniería genética ha desarrollado metodologías para la obtención de cepas mutantes resistentes al calor y a la radiación ultravioleta; así como para la obtención de genes de δ -endotoxina capaces de transferirse a plantas de cultivos trascendentes en la alimentación y producción industrial.

◊ La correcta aplicación del Bacillus thuringiensis, puede procurar el éxito del control biológico.

Para lograr un buen control de plagas de insectos con el Bacillus thuringiensis, se deben considerar varios puntos importantes como: el momento de máxima actividad de los primeros estadios larvales; la dosis del bioinsecticida a utilizar, que debe ser equivalente al problema que representa la plaga; la cobertura del follaje que debe realizarse mediante técnicas selectas, aplicando periódicamente el bioinsecticida en plantas de crecimiento rápido y en caso de lluvias, calibrando adecuadamente el equipo necesario para la aspersión.

◊ La efectividad tóxica del Bacillus thuringiensis sobre organismos objetivo, se comprueba por las experiencias obtenidas en los ensayos de campo y de laboratorio, en las cuales se ha reportado amplia actividad tóxica, rapidez y eficacia.

En el campo agrícola los usos del Bacillus thuringiensis sobre insectos plaga, son muy extensos. Y los avances y logros en este aspecto; reportan la mayoría de los resultados como satisfactorios. Sin embargo en el aspecto médico y forestal, la aplicación del control biológico con esta bacteria se dificulta por varias razones, como son: topografía y clima del lugar afectado, ecología del insecto, necesidad de nuevas técnicas, equipo especializado y apoyo financiero. Algunos países que cuentan con los recursos necesarios para el uso y aplicación de este tipo de control, argumentan

resultados efectivos en la aplicación del *Bacillus thuringiensis* sobre algunas plagas de insectos de incumbencia en la economía forestal y en la sanidad pública, señalando la eficacia de esta bacteria, aún bajo condiciones climáticas con temperaturas relativamente bajas, así como en aguas conteniendo altas concentraciones de sal y material orgánico.

◊ El control biológico con el *Bacillus thuringiensis*, significa una alternativa más, para contribuir a la disminución de la perturbación del equilibrio de la naturaleza, utilizándose como opción inmediata sola o en forma conjunta con otros agentes de control de insectos plaga de importancia económica y sanitaria para el hombre.

10. LITERATURA CONSULTADA

- 1.- Abdel, H. A., G. Carlberg y O. M. El-Tayeb. 1991. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt: IV Characterization of fermentation conditions for delta-endotoxin production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 7(2): 231-236.
- 2.- Akiba, Y. 1991. Assessment of rainwater-mediated dispersion of field-sprayed *Bacillus thuringiensis* in the soil. Applied Entomology and Zoology. 26(4): 477-484.
- 3.- Andrade, S-F-SD y A. C. Branco, Junior 1991. Susceptibility of population of *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) to Temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. Revista de Saude Pública 25(5): 367-370.

- 4.- Aronson, A. I., B. William y D. Peter. 1986. Bacillus thuringiensis and related insect pathogens. *Microbiological Reviews* 50(1): 1-24.
- 5.- Asimeg, E. J. y M. J. Mutinga. 1992. Isolation of mosquito toxic bacteria from mosquito-breeding sites in Kenya. *Journal of the American Control Association*. 8(1): 86-88.
- 6.- Bagci, H., S. R. Shareef y K. Ozdamar. 1991. Application of numerical taxonomy in classification of varieties of B. thuringiensis. *Doga Turk Biyoloji Dergisi*. 15(1): 70-81.
- 7.- Barton, W. E., R. Noblet y D. C. Kurtak. 1991. A simple technique for determining relative toxicities of Bacillus thuringiensis var. israelensis formulations against larval blackflies (Diptera : Simuliidae). *Journal of the American Control Association*. 7(2): 313-315.
- 8.- Bellows, T. S., Junior., J. G. Morse y L. K. Gaston. 1992. Residual toxicity of pesticides used for control of lepidopteran insects in citrus to the predaceous mite Euseius stipulatus Athias-Henriot (Acarina, Phytoseiidae). *Journal of Applied Entomology*. 113(5): 493-501.
- 9.- Benedict, J. H., D. W. Altman, P. F. Umbeck y D. R. Ring. 1992. Behavior, growth, survival, and plant injury by Heliothis virescens (F) (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic Bacillus thuringiensis cottons. *Journal of Economic Entomology*. 85(2): 589- 593.
- 10.- Berlijn, J. D. Protección de cultivos. 1990. Ed., Trillas. 36-41 pp.

- 11.- Bernier, R. L., Junior D. J. Gannon, G. P. Moser, M. Mazzarello, M. M. Griffiths, y P. J. Guest. 1990. Development of a novel Bacillus thuringiensis strain for the control of forestry pests. Pests and Diseases. volume 1. British Crop Protection Council. 245-252. pp.
- 12.- Brown, K. L. , H. R. Whiteley. 1992. Molecular Characterization of two novel crystal protein genes from Bacillus thuringiensis ssp. thompsoni. Journal of Bacteriology. 174(2): 549-557.
- 13.- Bulla, L. A. y A. Yousten, 1979. Bacterial insecticides cap. 4 de Microbial Biomass (A. H. Rose, 1979). Economic Microbiology. vol. 4. 91-114 pp.
- 14.- Bulla, L. A., Junior 1990. Larvicidal activity of chimeric Bacillus thuringiensis protoxins. Mol. Microbiol. vol. 4 No. 11. 1967-1973 pp.
- 15.- Cadahia, D. y F. Robredo. 1985. Combate de plagas y enfermedades forestales. Actas del IX Congreso Forestal Mundial. Vol. 11. 117-120 pp.
- 16.- Carlton, C. B. y J. M. Gonzáles. 1984. Plasmid-associated delta edotoxin production in Bacillus thuringiensis . vol 1. Academic Press. Inc. 387-400 pp.
- 17.- Carrillo, S. J. 1983. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el control biológico de plagas. Ed. SARH-INIA. 1-16 pp.
- 18.- Carmona, L. M. y E. M. Espinosa. 1991. Acción larvicida de algunas cepas nativas de Bacillus thuringiensis, Berliner y Bacillus sphaericus, Neide contra Aedes aegypti y Culex pipiens quinquefasciatus, Say en Chiapas, México. XXVI Congreso Nacional de Entomología. Ed. Sandoz. p. 203.

- 19.- Cidaria, D., A. Cappai, A. Vallesi, V. Caprioli y G. Pirali. 1991. A novel strain of Bacillus thuringiensis (NCIMB 40152) active against coleopteran insects. FEMS - Microbiology Letters. 81(2): 129-134.
- 20.- Cohen, E., H. Rozen, T. Joseph, S. Braun y L. Margulies. 1991. Photoprotection of Bacillus thuringiensis kurstaki from UV irradiation. Journal of Invertebrate Pathology. 57(3): 343-351.
- 21.- DeBach, P. 1975. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed., Continental, S. A. de C.V. 610-831 pp.
- 22.- De Barjac, H. 1984. Información técnica sobre el agente de control biológico Bacillus thuringiensis (SH-14) 1978. Serie Ecológica 1. Ed., Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 1-13 pp.
- 23.- De Barjac, H. y Bonnefoi . 1981. The aerobic endospore-forming bacteria: clasification and identification (Berkeley y Goodfellow , 1981). Academic Press; London, New York. 242-245 pp.
- 24.- De Barjac, H. y E. Frachon. 1990. Classification of Bacillus thuringiensis strains. Entomophagha 35(2): 233-240.
- 25.- Departamento de Sanidad Forestal. 1993. Dirección General de Protección Forestal y Fauna Silvestre. Anexo 1; SARH.
- 26.- Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1989. Response of starch encapsulated Bacillus thuringiensis containing ultraviolet screens to sunlight. Environ. Entomol. 6(18) 1035-1041.
- 27.- Ecobichon, D. J. 1990. Chemical management of forest pest epidemics. Biomed. Environ. 3(2): 217-239.

- 28.- Ejiofor, A. O. 1991. Production of *Bacillus thuringiensis* serotype II-14 as bioinsecticide using a mixture of "spent" brewer's yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. *Discovery and Innovation*. 3(2): 85-88.
- 29.- English, L., S. L. Slatin. 1992. Mode of action of delta endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 22(1): 1-7.
- 30.- Ferro, D. N. y S. M. Lyon. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval mortality: operative effects of *Bacillus thuringiensis* ssp *san diego*. *Journal of Economic Entomology*. 84(3): 806-809.
- 31.- Gallegos, M. G. y S. Novoa. A. 1992. Selecting strains of *Bacillus thuringiensis* for lepidoptera control. *Southwestern Entomologist*. 17(1): 63-67.
- 32.- Gelemter, W. D. 1990. *Bacillus thuringiensis* bioengineering and the future of bioinsecticides. Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases. vol. 2. British Crop Protection Council. 617-624 pp.
- 33.- Gibson, T. y Gordon E. Ruth. 1974. *Bacillus*. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (R. E. Buchanan y Gibbons, N. E.) octava ed. Ed. The Williams y Wilkins Company 1974.
- 34.- González, J. M., H. T. Dulmage y B. C. Carlton. 1981. Plasmid-associated delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Genetics and Biotechnology of Bacilli*. (Ganesan y Hoch, 1984). Academic Press, Inc. vol. 1. 387-400.

- 35.- González, J. M., B. J. Brown y B. C. Carlton. 1982. Plasmid-associated delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Genetics and Biotechnology of Bacilli. (Ganesan y Hoch, 1984). Academic Press. Inc. vol. 1. 387-400.
- 36.- Haider, M. Z. y S. Mahmood. 1990. *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: Diversity of crystal proteins and its relatedness to the toxicity spectrum. J. Basic Microbiol.30 (4): 251-258.
- 37.- Hall, A. R. 1975. Ejemplos de éxitos en el uso de microorganismos entomopatógenos. Control biológico de insectos y malas hierbas. (DeBach, 1975). Ed. Continental. S. A. p-727.
- 38.- Heimpel, A. M. y T. A. Angus. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens (Aronson et al . 1986) Microbiological Reviews. 50(1): 1-24.
- 39.- Herrstadt, T. . B. Gilroy, B. Bennett y F. Gaertner. 1988. *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*: properties and sequence of a coleopteran active delta-endotoxin. Genetics and Biotechnology of Bacilli. (Ganesan y Hoch, 1988). vol. 2. 227-238.
- 40.- Hone, G., D. Convents, R. J. Van. Rie, S. Jansens, M. Peferoen, y B. Visser. 1991. The carboxil-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. Molecular Microbiology, 5(11): 2799-2806.
- 41.- Hougard, J. M., H. Escaffre, F. Darriet, L. Lochouarn, F. Riviere, C. Back. 1992. An episode of resistance to permethrin in larvae of *Simulium squamosum* (Diptera : Simuliidae) from Cameroon, after 3.5 years of control. Journal of the American Mosquito Control Association. 8(2): 184-186.

- 42.- Howard, J. B., D. A., MT. 1987. Clinical and Pathogenic Microbiology. Ed. Mosby Company. 428-429 pp.
- 43.- Huber, H. E. y P. Lüthy. 1981. Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: composition and activation. Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. (E. W. Davidson. 1981) Allenheld, Osmun Publishers. Totowa, N. J. 209-234.
- 44.- Hussein, M. E., A. Merdan, N. A. A. Razik, S. Morsy, y M. Botros. 1991. Presence of certain bacteriophages in mosquito larval habitats inhibiting the larvicidal activity of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus. Zentralblatt Fuer Mikrobiologie 146(4): 271-277.
- 45.- Jarret, P. y M. Stephenson. 1990. Plasmid transfer between strains of Bacillus thuringiensis infection Galleria mellonella and Spodoptera littoralis. Applied Environ Microbiol 56(6): 1608-1614.
- 46.- Jones, D. R., V. Karunakaran, H. D. Burges y A. J. Hacking. 1991. U.V.-resistant mutants of Bacillus thuringiensis. Journal of Applied Bacteriology 70(6): 460-463.
- 47.- Karch, S., Z. A. Manzambi y J. J. Salaun. 1991. Field trials with Vectolex (B. sphaericus) and Vectobac (B. thuringiensis H-14) against Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus breeding in Zaire. Journal of the American Mosquito Control Association 7(2): 176-179.
- 48.- Karamanlidou, G. A. F. Lambropoujlos, S. I. Koliais, T. Manousis, D. Ellar y C. Kastritsis. 1991. Toxicity of Bacillus thuringiensis to laboratory populations of the olive fruit fly (Dacus oleae). Applied and Environmental Microbiology. 57(8): 2277-2282.

- 49.- Keill, C. B. 1991. Field and laboratory evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis formulation for control of fly pest of mushrooms. Journal of Economic Entomology. 84(4): 1180-1188.
- 50.- Khovrychev, M. P., A. N. Slobodkin, Z. V. Sakharova y T. P. Blokhina. 1990. Bacillus thuringiensis growth and development under the conditions of multistage continuous cultivation. Mikrobiologija. 59(6): 998-1003.
- 51.- Krieg, A., A. Huger, W. Schnetter. 1990. Plasmids, genes and DNA expressing a Bacillus thuringiensis protein toxic to coleoptera and bacteria transformed thereby. Biotechnology Research Abstract vol. 8, No. 4. p-3.
- 52.- Kuz'min, E. V., A. A. Shadenkov, S. B. Uzbekova, M. F. Shemyakin. 1991. Construction of bifunctional derivatives of insectotoxin gene of Bacillus thuringiensis var. kurstaki for their expression in transgenic plants. Doklady Akademii Nauk SSSR. 321(2): 412-415.
- 53.- Knoweles, B. H., P. J. K. Knight y D. J. Ellar. 1991. N-acetylgalactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from Bacillus thuringiensis. Royal Society of London Series B. Biological Sciences 245(1312): 31-36.
- 54.- Kuppusamy, M. y K. Balaraman. 1991. Fed-batch fermentation studies with Bacillus thuringiensis H-14 synthesising delta endotoxin. Journal of Experimental Biology. 29(11): 1031-1034.
- 55.- Laboratorios Abbott. 1970. Dipel insecticida. Uso de Dipel en América Latina. Shell de México, S.A. de C.V. 1-5 pp.

- 56.- Lee, H. H., K. K. Lee, y M. W. Lee. 1991. Ultrastructure of midgut cell of *Culex pipiens* larvae ingested by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (HL-75) insecticidal endotoxin. Korean Journal of Entomology, 21(1):11-18.
- 57.- Maramorosch, K. 1991. Microbial and viral pest control to preserve the environment. Zeitschrift Fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 98(4):344-350.
- 58.- McGuire, M. R., B. S. Shasha. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 85(3):1813-1817.
- 59.- Merryweather, Alison T., U. Weyer, P. G. Mark H. H. Mark, B. Timothy y D. Robert. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. J. Gen. Virol. 71(7): 1535-1544.
- 60.- Misch, D. W., D. F. Burnside y T. L. Cecil. 1992. A novel bioassay system for evaluating the toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology. 59(3): 286-289.
- 61.- Molina, P., B. Goyenechea, R. Morán, A. Abad, L. Romero, G. de la Riva y S. Pérez. 1991. Larvicidal activity in tobacco transgenic plants. Biotecnología aplicada 8(2): 191-198.
- 62.- Morón, M. A. y R. A. Terrón. 1988. Entomología práctica. Instituto de Ecología, A. C. 10-11. 458. 460 pp.
- 63.- Moser, A. 1991. Tubular bioreactors: Case study of performance for industrial production and scientific research. Biotechnology and Bioengineering. 37(11): 1054-1065.

- 64.- Muratov, V. S., T. F. Bondarenko, Y. P. Uvarov, E. A. Svetlichnyi, O. N. Dobrokhotskii. 1991. Determination of viable biomass concentration in Bacillus thuringiensis. Mikrobiologiya 60(3): 546-551.
- 65.- Novo Biokontrol. 1988. La alternativa biológica. Biotimes. Novo Bioindustrial Group. Num. 4. 8-9 pp.
- 66.- Norris, J. R. 1973. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis. Biosynthesis and physical structure, Cap. 10 de Microbial control of insects and mites (Burges y Hussey, 1973) Academic Press, London, New York. 229-246.
- 67.- Oddou, P., H. Hartmann, M. Geiser. 1991. Identification and characterization of Heliothis virescens midgut membrane proteins binding Bacillus thuringiensis of delta endotoxins. European Journal of Biochemistry. 202(2): 673-680.
- 68.- Ohba, M., H. Iwahana, S. Asano, N. Suzuki, R. Sato y H. Hori. 1992. A unique isolate of Bacillus thuringiensis serovar japonensis with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles. Letters in Applied Microbiology 14(2): 54-57.
- 69.- Ojeda, A.A. y V. Carbajal. 1991. Visión bibliográfica sobre el control biológico de las plagas forestales en México. Memorias de resúmenes del VI Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. Sociedad Mexicana de Entomología. A. C. UACH. p-69.
- 70.- Orduz, S., W. Rojas, M. M. Correa, A. E. Montoya, H. De Barjac. 1992. A new serotype of Bacillus thuringiensis from Colombia toxic to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology 59(1): 99-103.

- 71.- Ortegon, M. J., Q. Martínez. 1990. Effects of *Bacillus thuringiensis* strain GM-10 on depredation of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae (Diptera: Culicidae) by *Buena* sp. (Hemiptera: Notonectidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 0(79): 197-206.
- 72.- Osadchaya, A. I., S. F. Prokopchenko, I. L. Kostychenko, N. D. Mikhnovskaya y I. A. Vasilenkaya. 1990. Choice of optimal aeration conditions for the submerged cultivation of *Bacillus thuringiensis* H-14 266/2-1. *Mikrobiologicheskii Zhurnal (XIEV)* 52(6): 34-39.
- 73.- Osman, G. Y., A. M. Mohamed y K. J. Al-Layl. 1992. Studies on molluscidal activity of different preparations of *Bacillus thuringiensis* as biocidal agents on *Biomphalaria alexandrina* snails as vector of schistosomiasis in Saudi Arabia. *Anzeiger Fuer Schaedlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 65(4): 67-70.
- 74.- Pineda, T. MC. y O. Canseco. 1991. Efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre adultos de la mariposa monarca. Memoria de resúmenes del VI Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. Sociedad Mexicana de Entomología. A. C. UACH. p-70.
- 75.- Pipitgool, V., W. Maleewong, W. W. Daensegaew y K. Thaiklar. 1991. Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti* larvae in the northeast region of Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 22(3): 426-428.

- 76.- Prasad, J. y K. S. Kushwaha. 1990. Role of pathogenic microbes in management of the tobacco Caterpillar, *Spodoptera litura* in cabbage and cauliflower crops. *Indian Journal of Entomology* 52(4): 641-652.
- 77.- Resendiz, B. M. 1993. Bacterias empleadas para el control microbiológico de algunos insectos plaga de interés económico o sanitario para el hombre. Tesis profesional. Facultad de Química. 1993.
- 78.- Reyes, B. y G. B. Luyando. 1988. Situación de la sanidad forestal en México. Desarrollo y Perspectiva. IV Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal y IV Reunión sobre Plagas y Enfermedades Forestales. Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. vol. 1. No. 59. 59-60 pp.
- 79.- Roberts, G. M. 1991. Spreading of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* over water surface by a monolayer carrier. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7(3): 335-342.
- 80.- Rodríguez, L. R. 1990. Plagas forestales y su control en México. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. 15-193 pp.
- 81.- Rodríguez, T. M., R. L. H. Morales, R. Torres, H. Quiroz y M. Culebro. 1991. Laboratory and field evaluation of a formulation using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in larvae of *Culex* sp. (Diptera, Culicidae). *Southwestern Entomologist* 16(3): 277-282.
- 82.- Roth, J. A. 1990. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. *American Society for Microbiology*. 269-270 pp.
- 83.- Salama, H. S., M. M. Ali-A y A. Sharaby. 1991. *Bacillus thuringiensis* Berliner resistant to high temperature and ultraviolet radiation. *Journal Applied Entomology*. 112(5): 520-524.

- 84.- Shakoori, A. R. y M. Mansha. 1991. Analysis and characterization of heat shock proteins in *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1. Pakistan Journal of Zoology. 23(3): 229-237.
- 85.- Slaney, A. C. , H. L. Robbins y L. English. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIIIA an analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (SAY), y *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 22(1): 9-18.
- 86.- Smirnova, T. A., M. N. Poglazova, A. V. Mashkovtseva, L. I. Kulnich, M. Yu. Gal'Perin y R. R. Azizbekyan. 1991. Investigation of the adhesive properties of the spores of *Bacillus thuringiensis* spp. *galleriae* and *Bacillus thuringiensis* spp. *dendrolimus*. Mikrobiologija 60(4): 697-703.
- 87 - Song, S. S. 1991. Resistance of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.: Yponomeutidae: Lepidoptera) against *Bacillus thuringiensis* Berliner. Korean Journal of Applied Entomology 30(4): 291-293.
- 88.- Sundaram, K. M. S. y A. Sundaram. 1992. An insect bioassay method to determine persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* protein in oak foliage following application of a commercial formulation under field and laboratory conditions. Journal of Environmental science and Health Part. B. Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes. 27(1): 73-112.
- 89.- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson y M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol., vol. 83, No. 5. 1671-1676 pp.

- 90.- Tay, Z. J., L. A. Ramón, V. C. Oscar y G. Q. Manuel. 1990. Parasitología médica. Francisco Méndez Cervantes. 381-403 pp.
- 91.- Valenzuela, L. E. 1980. Producción y uso de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas agrícolas. VIII Simposio Nal. de Parasitología Agrícola. 573-580.
- 92.- Valenzuela, L. E. 1987. Microorganismos entomopatógenos, su aprovechamiento en el control de insectos plagas. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. 11-109 pp.
- 93.- Van, F. K., R. Milne, R. Brousseau y L. Masson. 1992. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains to *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* to defoliating forest Lepidoptera. Journal of Invertebrate Pathology. 59(2): 149-154.
- 94.- Walgenbach, J. F. y E. A. Estes. 1992. Economics of insecticide use on staked tomatoes in Western North Carolina. Journal of Economic Entomology. 85(3): 888-894.
- 95.- Wang, C. y C. Y. Sha. 1991. A study on ultrastructural changes of the midgut of *Mythima separata* infected by *Bacillus thuringiensis*. Acta Entomologica Sinica. 34(1): 50-53.
- 96.- Whiteley, H. R. y H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 549-567.
- 97.- Whiteley, H. R., H. E. Schnepf, J. W. Kronstad y H. C. Wong. 1984. Structural and regulatory analysis of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein

- gene. Genetics and Biotechnology of Bacilli. (Ganesan y Hoch, 1988). Academic Press. Inc. vol. 1. 375-386.
- 98.- Whiteley. H. R., W. R. Winder y H. E. Schnepf. 1988. Genes encoding peptides of the small cuboidal crystals of Bacillus thuringiensis. Genetics and Biotechnology of Bacilli. (Ganesan y Hoch, 1988). Academic Press. Inc. vol. 2. 239-244.
- 99.- Whitlock. V. H., M. C. Lo, M. Kuo, y T. S. Soongs. 1991. Two new isolates of Bacillus thuringiensis pathogenic to Spodoptera litura. Journal of Invertebrate Pathology. 58(1): 33-39.
- 100.- Yousten. A. A., F. J. Genthner y E. F. Benfield. 1992. Fate of Bacillus sphaericus y Bacillus thuringiensis serovar israelensis in the aquatic environment. Journal of the American Mosquito Control Association. 8(2): 143-148.